

**“LA ELECTROPORACIÓN MEJORA EL CONTROL  
TUMORAL INDUCIDO POR BNCT MEDIADO POR  
GB-10 EN UN MODELO *IN VIVO* DE CÁNCER ORAL”**

***CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA  
Y APLICACIONES NUCLEARES***

**Alumna: Lic. Marcela A. Garabalino**

**Directora: Dra. Amanda E. Schwint**

**Co-directora: Dra. Verónica A. Trivillin**

**Mes y año: 22 de junio de 2016**



# Indice

	Pág.
Resumen	1
<b>CAPITULO 1</b>	
1. Cáncer y radiaciones	3
1.1 Aspectos generales sobre el cáncer y las terapias actuales	3
1.2 Aspectos generales de las radiaciones	4
2. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)	5
2.1 Radiobiología de BNCT	6
2.2 Compuestos borados	9
2.2.1 Tipos de compuestos borados	10
2.2.1.1 BPA (p-borofenilalanina)	10
2.2.1.2 BSH (Borocaptato de sodio)	12
2.2.1.3 GB-10 (Decahidrodecaborato de sodio)	13
2.2.1.4 Nuevos agentes borados	13
2.2.2 Técnicas de medición de Boro	14
2.2.2.1 Técnicas de medición de B basadas en plasmas	15
2.2.2.2 Técnicas de medición de B no basadas en plasmas	17
2.3 Fuentes de neutrones	18
2.4 Resumen de antecedentes de ensayos clínicos de BNCT	20
2.4.1 Breve reseña histórica de BNCT a nivel mundial	20
2.4.2 BNCT en Argentina	21
3. Electroporación	22
4. Breve reseña de cáncer de cabeza y cuello	24
4.1 Modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster	25
5. Antecedentes del trabajo y objetivos	26

## CAPITULO 2

2.Estudios de biodistribución	29
2.1 Introducción	29
2.2 Materiales y Métodos	31
2.2.1 Generación del modelo experimental de cáncer oral en hámsters	31
2.2.2 Preparación de la solución del compuesto borado	31
2.2.3 Administración de la solución del compuesto borado	31
2.2.4 Procedimiento de la técnica de Electroporación	32
2.2.5 Protocolos ensayados con EP+GB-10	33
2.2.6 Toma de muestras	33
2.2.7 Preparación de las muestras	33
2.2.8 Medición de la concentración de B por ICP-OES/ICP-MS	34
2.2.9 Obtención de las imágenes de las muestras por ARN	34
2.2.10 Análisis estadístico	35
2.3 Resultados	35
2.3.1 Resultados de los estudios de biodistribución con EP+GB-10	35
2.3.2 Resultados de la microdistribución de $^{10}\text{B}$ por ARN	36
2.4 Discusión	37

## CAPITULO 3

3.Estudios de eficacia terapéutica de BNCT	39
3.1 Introducción	39
3.1.1 Modelos de cáncer oral	39
3.1.2 Mucositis	40
3.1.2.1. Clasificación del grado de mucositis en humanos y en hámsters	41
3.1.3. Estudios de eficacia terapéutica de BNCT en el modelo de cáncer oral en hámster realizados en nuestro	

laboratorio	42
3.2 Materiales y Métodos	45
3.2.1. Protocolos ensayados con EP+GB-10 y controles con GB-10 sin EP para estudios de BNCT <i>in vivo</i>	45
3.2.2. Irradiación en el reactor RA-3	46
3.2.3. Seguimiento de los animales	47
3.2.4. Análisis estadístico	48
3.3 Resultados	48
3.3.1. Resultados de los estudios de eficacia terapéutica de BNCT con EP+ GB-10 <i>in vivo</i>	48
3.3.2 Resultados de radiotoxicidad (mucositis)	52
3.4 Discusión	52
Conclusiones y Discusión Final	55
Referencias	57

## Resumen

El presente trabajo final se realizó en el marco del proyecto multidisciplinario de BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) como terapia para tumores, que desarrolla la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), tendiente a realizar aportes en la investigación y el desarrollo tecnológico en el campo de la Salud, las Ciencias Biológicas y la Radiobiología. El grupo de investigación de la División Patología de la Radiación de la CNEA, perteneciente al Departamento de Radiobiología, ha demostrado previamente la eficacia terapéutica de distintos protocolos de BNCT para el tratamiento de cáncer oral en forma experimental en un modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

BNCT ó Terapia por Captura Neutrónica en Boro, se basa en la reacción de captura entre el  $^{10}\text{B}$  localizado preferencialmente en tumor y neutrones térmicos, generando partículas letales de corto alcance que dañan al tumor, preservando el tejido normal. Múltiples estudios han demostrado que la biodistribución de los compuestos borados en tumor, en cuanto a la concentración absoluta y relativa de  $^{10}\text{B}$ , su retención, homogeneidad de targeting y microdistribución, condiciona la eficacia terapéutica de BNCT. Por lo tanto, resulta de particular interés optimizar la biodistribución de compuestos borados autorizados para su uso en humanos ya que esto acortará la brecha entre la investigación y la potencial aplicación clínica.

Por otro lado, se conoce que la técnica de electropermeabilización/electroporación y en particular la electroquimioterapia (ECT-Electrochemotherapy) (aprobada en la comunidad europea para el tratamiento de tumores cutáneos y subcutáneos), ha demostrado ser un excelente facilitador en la biodistribución en tumor de un agente antitumoral. En este contexto, el objetivo de éste estudio fue evaluar 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 en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

En particular, empleando el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, se estudió el potencial efecto terapéutico y/o tóxico de dos protocolos de BNCT combinados con electroporación (EP), tardía y temprana, aplicada en la etapa de la administración del compuesto borado GB-10 vs un grupo tratado con GB-10/BNCT sin electroporación. En éste estudio, se observó un aumento significativo (test t de Fisher,  $p < 0,0001$ ) en las remisiones parciales (RP) + remisiones completas (RC) de los tumores del grupo GB-10/BNCT + EP temprana (92%) vs el grupo GB-10/BNCT (48%), asociado a

mucositis leve-moderada y reversible en tejido precanceroso. En particular, en el caso de los tumores medianos y grandes ( $>10\text{mm}^3$ ), las RP+RC aumentaron significativamente ( $p=0,0067$ ) de 56% (GB-10/BNCT) a 95% (GB-10/BNCT + EP temprana) y en el caso de los tumores chicos ( $<10\text{mm}^3$ ) las RC aumentaron significativamente ( $p=0,0003$ ) de 7% (GB-10/BNCT) a 65% (GB-10/BNCT + EP temprana).

Los resultados obtenidos demuestran que la electroporación temprana mejora la eficacia terapéutica de GB-10/BNCT sin inducir mucositis severa en tejido precanceroso en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

# CAPITULO 1

## 1. Cáncer y radiaciones

### 1.1 Aspectos generales sobre el cáncer y las terapias actuales

El cáncer comprende un grupo de enfermedades que comparten una serie de características comunes, principalmente fallas en la regulación del crecimiento. A pesar de los años de investigación dedicados por la comunidad científica al estudio de esta enfermedad y su tratamiento, no se ha logrado aún una cura definitiva.

Podemos 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). 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 (<http://www.who.int>). En particular, la Argentina, según el Instituto Nacional del Cáncer (INC), se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (<http://www.msal.gov.ar>).

A pesar que se han logrado notables avances hacia la comprensión de las características y tratamiento del cáncer, el manejo clínico de ésta 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 (Wang et al., 2014).

Los tratamientos actuales para el cáncer comprenden la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, las cuales tienen por objetivo eliminar las células cancerosas y/o bloquear su proliferación.

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 (Ej. terapia biológica, terapia hormonal, terapia génica, fototerapia, etc.) (Chaveli-López, 2014). Dentro de éste contexto se encuentra la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT: Boron Neutron Capture Therapy). Esta terapia pertenece al grupo de las denominadas "terapias binarias" debido a que el resultado terapéutico se obtiene al combinar dos componentes que, por separado, no causan daño significativo.

BNCT constituye una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica y se basa en la acumulación selectiva de compuestos portadores de  $^{10}\text{B}$  en el tumor y la subsiguiente irradiación externa con neutrones térmicos o epitérmicos. Cada una de las componentes de ésta terapia binaria puede ser manipulada independientemente, pero sólo cuando ambas se encuentren juntas se obtendrá un resultado terapéutico en el tumor (Barth et al., 1990).

## 1.2 Aspectos generales de las radiaciones

La radiación ionizante es un agente físico que se utiliza para destruir eficazmente células cancerosas de manera no específica (Hellevik y Martinez-Zubiaurre, 2014). Se denomina ionizante ya que forma iones, es decir, partículas eléctricamente cargadas, que depositan su energía en los tejidos que atraviesan. Esta energía depositada puede matar a las células cancerosas o causar cambios genéticos que conlleven a la muerte celular (Baskar et al., 2012).

Las radiaciones ionizantes actúan principalmente sobre el ADN (Acido Desoxirribonucleico) pero también pueden afectar y destruir otras biomoléculas como el ARN (Acido Ribonucleico) y proteínas (Barth et al., 1990; Jham y da Silva Freire, 2006; Lorimore et al., 2003).

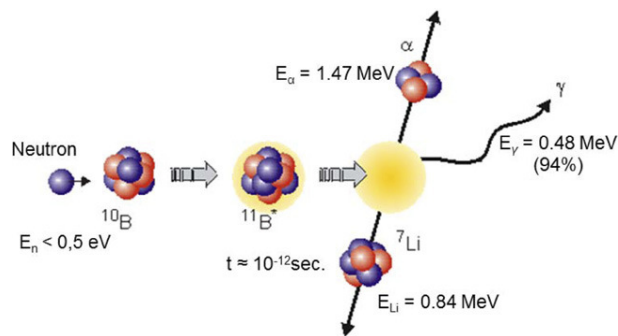
El blanco biológico de la radiación en las células es el ADN. Los daños al ADN pueden ser de doble o simple cadena, mediante la acción de dos efectos principales: efecto directo y/o efecto indirecto (Jham y da Silva Freire, 2006; Baskar et al., 2012). Generalmente, los daños doble cadena en el ADN resultan irreparables y responsables de la muerte celular, tanto de células cancerosas como normales.

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) se entrega desde afuera del cuerpo hacia el lugar donde se encuentra el tumor, conformando el haz de acuerdo a la forma y profundidad del tumor. A diferencia de ésta forma de administración, la radioterapia interna o braquiterapia, se basa en que la radiación se administra desde el interior del cuerpo por medio de fuentes radiactivas selladas en catéteres o semillas, directamente en el sitio del tumor (Baskar et al., 2012).

En el caso de BNCT, la estrategia consiste en que la radiación ionizante que causa la muerte de las células cancerosas, es generada dentro del tumor mediante una reacción de captura neutrónica debida a la interacción del  $^{10}\text{B}$  y los neutrones térmicos. Por lo tanto, aunque el tratamiento de BNCT y la braquiterapia son modalidades de radioterapia interna, se diferencian en el origen de la radiación ionizante.

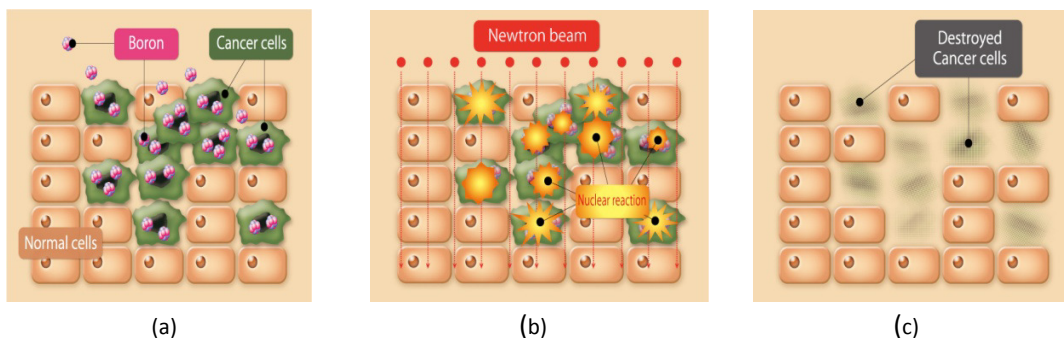
## 2. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) constituye una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica. El concepto de BNCT fue publicado por primera vez por Gordon Locher en el año 1936. Definió BNCT como una modalidad de tratamiento binario que puede actuar selectivamente sobre un tejido neoplásico. BNCT se basa en reacciones nucleares de captura y fisión que se producen cuando un átomo de  $^{10}\text{B}$  (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  $^{11}\text{B}$  que se escinde o fisiona generando una partícula alfa ( $^4\text{He}$ ) y un núcleo de  $^7\text{Li}$ , ambos de alta transferencia lineal de energía (LET), que son emitidas en direcciones opuestas (Coderre y Morris, 1999; Coderre et al., 2003) (Fig. 1).



**Fig. 1** Reacción de captura neutrónica entre  $^{10}\text{B}$  y neutrones térmicos (Byvaltsev et al., 2012).

BNCT posee la capacidad de proporcionar un daño selectivo en tejido neoplásico con menor efecto en el tejido sano circundante (Fig. 2). Dado que los neutrones que se emplean en BNCT son de menor energía que las radiaciones utilizadas en los tratamientos tradicionales (partículas gamma), producen escaso daño en los tejidos que atraviesan. Además, debido a que los neutrones son de naturaleza no ionizante, sólo en las células que contengan isótopos con alta sección eficaz de captura para los neutrones térmicos (por ejemplo,  $^{10}\text{B}$ ) ocurrirá la reacción de captura y posterior fisión nuclear, provocando la destrucción celular. Por lo tanto, suponiendo una irradiación de neutrones adecuada, la eficacia de BNCT está limitada en última instancia por la acumulación selectiva de agentes portadores de Boro en el tumor (Luderer et al., 2015). El alcance de la destrucción de células tumorales está limitada por las longitudes de trayectoria de las partículas de alto LET generadas (alfa y  $^7\text{Li}$ ), las cuales se encuentran en el orden de 5 -9  $\mu\text{m}$  (Coderre et al., 2003).



**Fig. 2.** 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>)

La ventaja de la incorporación selectiva del compuesto borado por las células tumorales es que permite un “targeting biológico” en lugar de un “targeting geométrico” de la radioterapia convencional. De ésta manera, no es necesario conocer *a priori* la localización de las células tumorales para llevar a cabo su destrucción y pueden tratarse células tumorales infiltrantes, micrometástasis no identificables en tejido normal (Barth et al., 2005) y focos precancerosos.

## 2.1 Radiobiología de BNCT

La radiobiología es la ciencia que estudia los fenómenos que se producen en los sistemas biológicos tras la absorción de energía procedente de las radiaciones. La radiobiología de BNCT es compleja debido a la mezcla de radiaciones de alto y bajo LET dentro del campo de irradiación. Sin embargo, gran parte de ésta complejidad ha sido aclarada mediante la combinación de la experimentación 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  $^{10}\text{B}$  con los neutrones térmicos (Componente Boro):
  1. Partículas  $\alpha$  de 1,47 MeV, rango 9 mm, LET: 196 KeV/m
  2. Partículas de  $^7\text{Litio}$  de 0,84 MeV, rango 5 mm, LET: 162 KeV/m

3. Rayos  $\gamma$  de 0,48 MeV (94% de las reacciones)
- b) Componentes de dosis derivadas de otras reacciones (Componente Fondo ó Inespecífica):
  1. Rayos  $\gamma$  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  $\gamma$  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, ya que se encuentra presente en tumor y en tejido normal en magnitudes similares. La dosis de fondo afectará de forma similar al tumor y a los tejidos normales. Por lo tanto, para mejorar la ventaja terapéutica de BNCT se debe maximizar la componente boro de la dosis que será selectiva para tumor. La manera más eficiente de lograr esto es optimizar el “targeting” de boro a tumor. Asimismo, igual relación de concentración de boro en tumor/tejido normal y tumor/sangre, será más favorable tener mayores cantidades absolutas de boro en tumor y así disminuir el tiempo de exposición al haz de neutrones, obteniendo como resultado una reducción de la dosis inespecífica a los tejidos normales (Coderre y Morris, 1999).

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 Joule/Kg.

Con el fin de estimar el efecto de un tratamiento en BNCT, la dosis física necesita ser convertida en dosis biológica (Horiguchi et al., 2015). 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 efectividad biológica. Para el cálculo del mismo, 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. 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., 2015). Un enfoque más reciente de este tema lo constituye el uso del concepto de dosis isoefectiva propuesto por González y Santa Cruz (2012) que permite subsanar algunas falencias en el enfoque clásico.

La microdistribución de 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 Efectividad Biológica del Compuesto ó CBE , en el cual se 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 tamaño 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.

A pesar de que la radiobiología en 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 durante la irradiación. Aún con la última tecnología disponible, es difícil seguir las concentraciones de  $^{10}\text{B}$  en los tumores durante la irradiación con neutrones, generando así un problema en el cálculo de la dosis de radiación recibida en el 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 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:  $^{10}\text{B}$  (con abundancia del 19,8%) y  $^{11}\text{B}$  (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 ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) 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 a ellos mismos o a otros debido a sus estructuras electrónicas (Hawthorne y Lee, 2003; Das et al., 2013). Además, la química del boro permite que sea incorporado en muchas estructuras diferentes (Barth et al., 1990). La mayoría de los reactivos de boro trivalente ( $\text{B}^{+3}$ ) son electrófilos; sin embargo, cuando un átomo de boro trigonal acepta un par de electrones de una especie nucleofílica, adopta una configuración tetraédrica ( $\text{sp}^3$ ), y se completa la regla del octeto (Fig. 3). Esta configuración favorece las aplicaciones biológicas del boro (Das et al., 2013).

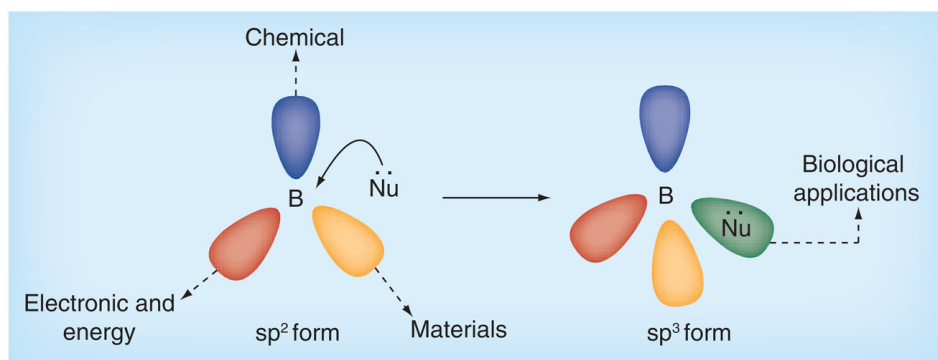


Fig. 3. Modificaciones configuracionales electrónicas del Boro. La configuración  $\text{sp}^3$  favorece las aplicaciones biológicas del átomo de Boro (Das BC et al., 2013).

El desarrollo de compuestos transportadores de  $^{10}\text{B}$  para BNCT comenzó hace unos 50 años y aún es una tarea difícil que continúa siendo de alta prioridad para la eficacia de la terapia (Moss, 2014).

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

- ✓ Presentar baja toxicidad sistémica (Barth et al., 2005).
- ✓ Debe ser un portador eficiente y estable de átomos de boro (Barth et al., 1990).

- ✓ 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  $^{10}\text{B}$ /célula ó  $20 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$  ó  $20 \text{ppm } ^{10}\text{B}$ ) (Barth et al., 2005).
- ✓ La microlocalización del compuesto borado debe favorecer el daño a los blancos subcelulares tumorales más radiosensibles. (Kobayashi y Kanda, 1982; Gabel et al., 1987; Hartman et al., 1994; Barth et al., 2005).
- ✓ El compuesto borado debe poseer un clearance rápido de la sangre y tejidos normales y alta persistencia en tumor durante BNCT (Barth et al., 2005).
- ✓ La solubilidad en agua es un factor importante para un agente transportador de boro que se administra en forma sistémica, ya que es necesaria la característica química de lipofilia para que atravesase en caso de ser necesario, la barrera hematoencefálica (Barth et al., 2005).
- ✓ El peso molecular del agente portador de 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 que, a través de distintas estrategias químicas, biológicas y farmacológicas, se mejore la eficacia terapéutica de BNCT (Ej: Goszczyński et al., 2015; Achilli et al., 2014).

Hasta el presente, pocos compuestos de boro han sido aceptados para su uso en tratamientos clínicos. Solo 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.

## **2.2.1 Tipos de compuestos borados**

### **2.2.1.1 BPA (p-borofenilalanina)**

El BPA ( $^{10}\text{BC}_9\text{H}_{12}\text{NO}_4$ ) ó L-4-dihidroxiborilfenilalanina es un derivado del aminoácido fenilalanina, sintetizado a fines de 1950 (Snyder et al., 1958). El enantiómero L-BPA (Fig. 4) se asemeja estructuralmente al aminoácido L-fenilalanina, y se utiliza clínicamente debido a su mayor acumulación en células de cáncer en comparación con el D-enantiómero o mezcla racémica (Luderer et al., 2015).

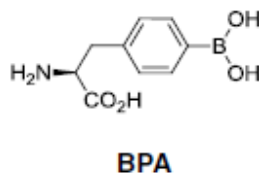


Fig. 4 Estructura química del L-BPA

Dada la analogía entre el BPA y la tirosina, precursora en la síntesis de melanina, se propuso al BPA como compuesto borado para BNCT en melanomas. Sin embargo, se observó que el BPA también se incorporaba selectivamente a otros tumores (Barth et al., 2005). Se demostró que el BPA se incorpora a las células a través de los sistemas transportadores de aminoácidos tipo L, denominados LAT (L-Amino acids Transporters) (Wittig A et al., 2000). En este caso la incorporación preferencial del BPA a las células tumorales podría deberse a que, al estar incrementada la actividad metabólica de dichas células, éstas requerirían mayores concentraciones de aminoácidos tipo L y así el ingreso de BPA a las células se vería favorecido (Coderre y Morris, 1999).

Respecto de su micro-localización, el BPA se distribuye uniformemente entre el núcleo y el citoplasma, según se determinó por microscopía iónica luego de exponer las células al BPA *in vitro* (Bennet et al. 1992, Bennet et al. 1994, Chandra et al. 1997) e *in vivo*, en tejidos de ratas inyectadas con BPA (Smith et al. 1996, Smith et al. 1997).

Actualmente, se encuentran en estudio, diferentes procedimientos orientados a potenciar la incorporación de BPA en las células malignas. Por ejemplo: “precarga” con moléculas estructuralmente análogas al BPA como el L-DOPA y L-tirosina que favorecería el posterior ingreso de BPA por un sistema de intercambio (Capuani et al., 2008; Papaspyrou et al., 1994; Iffland et al., 2011).

Como se describió más arriba, el BPA fue propuesto inicialmente para el tratamiento de melanomas (ej: Mishima et al. 1989; Gonzalez et al., 2004). Posteriormente, se utilizó como portador de boro para el tratamiento del glioblastoma multiforme (Kageji et al. 2011), cáncer de cabeza y cuello (Kankaanranta et al. 2012) y metástasis colorectales en hígado (Zonta et al. 2006).

En cuanto a la toxicidad, los estudios realizados en ratones, hámsters, ratas y conejos no demostraron signos de toxicidad sistémica (Taniyama et al. 1989, Coderre et al. 1987, Kreimann et al. 2001a, Kulvik et al. 2003). Fundamentalmente, no se observó toxicidad asociada a la administración de BPA en humanos (ej.: Liberman et al. 2004, Wittig et al. 2008).

### 2.2.1.2 BSH (Borocaptato de sodio)

El BSH ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ) ó mercaptoundecahidro-*closo*-dodecaborato de sodio es un derivado de boranos polihédricos aniónicos que se administra como una sal de sodio (Fig. 5).

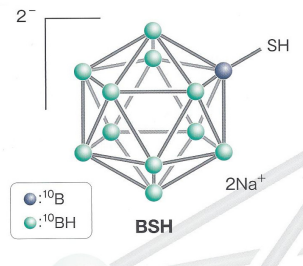


Fig. 5 Estructura química del BSH

El BPA y el BSH son compuestos borados de bajo peso molecular (Barth et al., 2005). Una notable diferencia entre ambos es que el BSH contiene 12 átomos de boro por molécula, mientras que el BPA posee uno solo. Por lo tanto, dada una acumulación equimolar de BSH y BPA dentro de un tumor, el BSH habrá entregado 12 veces más la concentración de átomos de boro en comparación con BPA (Luderer et al., 2015). Otra diferencia entre éstos dos compuestos es que el BSH contiene un grupo sulfhidrilo ( $\text{SH}^-$ ) como parte de su estructura química, el cual puede sufrir un proceso de oxidación y generar el dímero BSSB ( $\text{Na}_4\text{B}_{24}\text{H}_{22}\text{S}_2$ ) y derivados, los cuales podrían producir alteraciones renales, entre otros efectos adversos (ej. Janku et al., 1993; Horn et al., 1997). Otra diferencia radica en el tipo de mecanismo de incorporación a las células. Se ha propuesto para el BSH un mecanismo difusivo-pasivo a diferencia del mecanismo por transporte activo del BPA (Luderer et al., 2015).

Debido a su naturaleza aniónica, el BSH no atraviesa la BHE (Barrera hematoencefálica) intacta pero puede acumularse preferencialmente en tumores cerebrales debido a la disrupción de la BHE en la zona del tumor (Kageji et al., 2002). Sin embargo, Wittig et al. (2011) demostraron que no solo se acumula en bajas concentraciones en cerebro sino también en tejido adiposo, hueso y músculo. A su vez, presenta altas concentraciones en hígado y riñón. Esta acumulación diferencial en diversos órganos indicaría un metabolismo mucho más complejo.

Además de utilizarse para el tratamiento de glioblastoma multiforme, se intentó ampliar su uso en la clínica a tumores de cabeza y cuello, combinado con la administración de BPA (Kato et al., 2004). También se realizaron diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* para estudiar su potencial utilización en otros tipos de tumores como melanoma

(Masunaga et al., 2012), carcinoma hepatocelular (Yanagie et al., 2011), tumores múltiples en hígado (Fujii et al., 2011), y células de glioma (Feng et al., 2009).

### 2.2.1.3 GB-10 (Decahidrodecaborato de sodio)

El GB-10 ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ ) es un compuesto borado difusivo, que contiene 10 átomos de boro por molécula y que en solución acuosa forma el anión  $(\text{B}_{10}\text{H}_{10})^{-2}$  (Laramore et al., 2001) (Fig. 6). Análogamente al BSH, el GB-10 fue propuesto para el tratamiento de tumores de cerebro ya que no atraviesa la BHE intacta. La incorporación preferencial a tumor se debería a que los tumores de cerebro están rodeados de una BHE defectuosa que permite la incorporación de GB-10 (Heber et al. 2004).

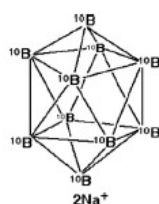


Fig. 6 Estructura química del GB-10

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

### 2.2.1.4 Nuevos agentes portadores de Boro

Considerando que el BPA, GB-10 y BSH no son agentes de entrega de boro ideales, se realizan esfuerzos en el diseño y síntesis de nuevos compuestos borados que favorezcan la incorporación selectiva en las células tumorales (Barth et al., 2005). Contemplando diferentes estrategias para lograr una mayor relación tumor/tejido normal y de esa manera incrementar la eficacia terapéutica de BNCT, en los últimos 20 años se han logrado importantes avances en el desarrollo y síntesis de mejores agentes portadores de boro (Barth et al., 2005; Luderer et al., 2015). En la Fig. 7 se muestran algunos de éstos compuestos desarrollados para BNCT. Entre ellos se encuentran: los nucleósidos y análogos de carbohidratos (ej. Al-Madhoun et al., 2004), aminoácidos no naturales (ej. Kabalka et al., 2009), porfirinas (ej. Evstigneeva et al., 2003; Smilowitz et al., 2013), polímeros catiónicos (ej. Azab et al., 2005), agentes de unión al ADN (Nakanishi et al., 1999), derivados de fosfonatos, anticuerpos monoclonales (ej. Yang et al., 2009),

péptidos de penetración de membrana celular (ej. Michiue et al., 2014), liposomas (ej. Heber et al., 2014) y nanopartículas (ej. Fang et al., 2012).

Cabe destacar que hasta 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  $^{10}\text{B}$  para BNCT solamente puede ser interpretado fehacientemente en estudios radiobiológicos de BNCT *in vivo*, uno de los grandes desafíos es poder no solo desarrollar agentes borados, sino comprobar mediante estudios que pueden brindar una mayor ventaja terapéutica.

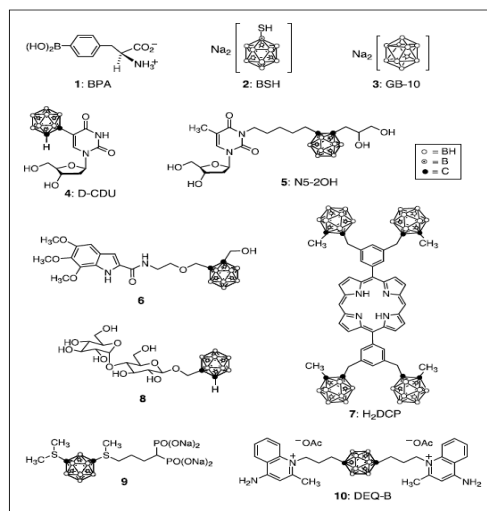


Fig. 7 Diversos agentes portadores de Boro diseñados y sintetizados para BNCT

## 2.2.2 Técnicas de medición de Boro

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 and Brown, 1997).

La mayoría de los métodos anteriores utilizaban espectrofotométrica 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 de B. Sin embargo, la sensibilidad y la precisión de la determinación permanecieron influidas debido a los efectos de memoria y las interferencias en estos métodos (Sah and 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 (en el orden de ppm), que las cuantificaciones por métodos espectrofotométricos.

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

En los últimos años, las nuevas generaciones de instrumentos de fuente de plasma se han desarrollado utilizando métodos espectrométricos alternativos de generación de plasma y de masas de alta resolución. Se espera que estos instrumentos conlleven a nuevas mejoras en los métodos de determinación de B (Sah and Brown, 1997), ya que a pesar de los avances mencionados, todavía hay algunos problemas que deben ser solucionados (ej. efecto memoria, digestión de muestras, etc.).

En la actualidad existen diversas técnicas para la detección y cuantificación de boro y sus isótopos estables basadas o no basadas en plasmas. En éste trabajo final se utilizaron las dos técnicas basadas en plasmas: ICP-OES e ICP-MS y la técnica de autorradiografía electrónica, no basada en plasmas.

### **2.2.2.1 Técnicas de medición de B 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. 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 el 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 (8000-10000K), y es una excelente fuente de ionización para las técnicas de espectrometría de emisión óptica (ICP-OES) como así también para la de masa (ICP-MS) (Sah and 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 ser el argón (Farhat et al., 2013). En un **ICP-OES** (Espectrómetro de Emisión Óptica por Plasma Inductivo) (Fig. 8a) las muestras se preparan en forma líquida y se introducen en el plasma

del instrumento a través de un nebulizador y una cámara de nebulización. El nebulizador es el responsable de la aerosolización de la muestra en finas gotas. 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 permite 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://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-plasma-icp-oes>).

La muestra es analizada en forma cualitativa y cuantitativa. Para el análisis cualitativo, es necesario detectar las longitudes de onda características del elemento y, en general, deben leerse al menos tres líneas espectrales para garantizar que la emisión observada no esté interferida 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 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. 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).

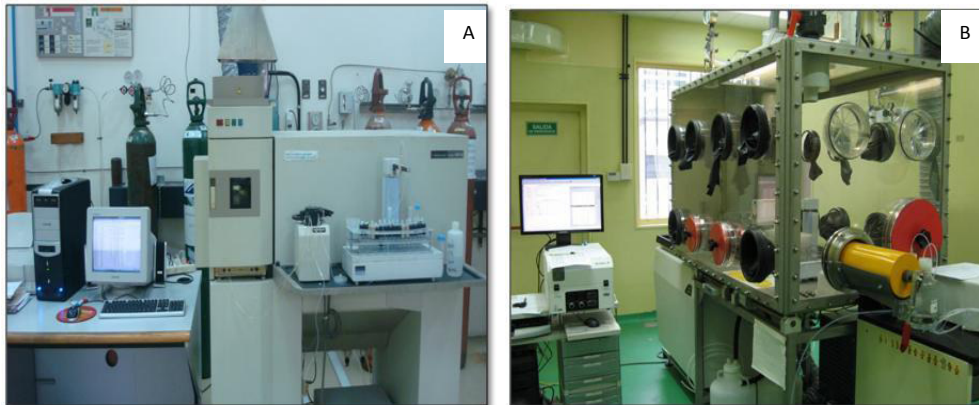


Fig.8. (A) Espectrómetro de Emisión Óptica por Plasma Inductivo (ICP-OES) (Centro Atómico Constituyentes, CNEA); (B) Espectrómetro de Masas con fuente de Plasma Inductivo (ICP-MS) (Centro Atómico Ezeiza, CNEA).

El acoplamiento al ICP de un detector espectral de masas, 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 ( $^{10}\text{B}$  ó  $^{11}\text{B}$ ) de una muestra, lo cual conduce a límites de detección más bajos y mayor sensibilidad (Fig 8b). 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 ( $m/z$ ) consiguiendo de ésta manera medir concentración a niveles de ppb (parte por billón) y en algunos casos hasta ppt (parte por trillón), además de y abundancia isotópica.

### 2.2.2.2 Técnicas de medición de B no basadas en plasmas

Los métodos espectrofotométricos para la determinación de boro están basados en la adición de reactivos específicos para muestras acuosas que desarrollan complejos de boro coloreados. Estos complejos se miden mediante absorbancia de la luz, en longitudes de onda correspondientes a las del reactivo cromóforo utilizado. Estos reactivos incluyen rojo curcumina (550 nm), azul carmín (605 nm) y el amarillo de azometina-H (410 nm). Este último es el método espectrofotométrico de boro más comúnmente empleado, sobre todo porque es rápido, sencillo, sensible, y posee el menor grado de interferencias entre todos los métodos espectrofotométricos (Sah and Brown, 1997).

Además, dentro de los métodos espectrofotométricos, se encuentran los métodos fluorométricos. Estos se basan en la medición de la fluorescencia de las muestras después de la adición de reactivos que causan la formación de compuestos de boro fluorescente.

Los métodos no espectrofotométricos incluyen el método ionométrico, donde boro en la muestra se convierte en tetrafluoroborato ( $\text{BF}_4^-$ ) el cual es medido mediante un electrodo selectivo de iones.

Con el fin de monitorear la concentración de boro, se han desarrollado varios métodos basados en reacciones nucleares analíticas, en las cuales las muestras de boro son bombardeadas con neutrones que causan la producción partículas alfa y partículas gamma, las cuales pueden ser correlacionadas con átomos de  $^{10}\text{B}$  estables. Entre ellas podemos nombrar al análisis por activación de rayos gamma (prompt gamma), análisis por autorradiografía neutrónica, entre otras.

La metodología de Autorradiografía Neutrónica (ARN) consiste en la irradiación de cortes histológicos (obtenidos a partir de estudios de biodistribución), en contacto con detectores de trazas nucleares. Las partículas emitidas en la reacción de captura impresionan el material, revelando la distribución de B-10 en la muestra (Portu et al., 2015). A través de las imágenes generadas en detectores de trazas nucleares (NTD), es posible estudiar la distribución espacial de elementos emisores de partículas pesadas. El isótopo  $^{10}\text{B}$  tiene una alta sección eficaz de captura neutrónica. Así, al exponer a un flujo de neutrones térmicos un corte de tejido que contiene boro en contacto con un NTD, tiene lugar la reacción  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$  y las partículas alfa y Li producen un daño latente en el detector, que puede amplificarse a nivel de microscopía óptica mediante un proceso de ataque químico o etching (Fleischer et al., 1975). Mediante el análisis de la localización y densidad de las trazas nucleares de estas partículas se puede determinar la distribución de boro en el tejido. Por lo tanto, esta metodología puede ser utilizada para generar una "imagen autorradiográfica" de la muestra (sección histológica) que permite conocer la localización de compuestos borados dentro de las estructuras tisulares. Dependiendo del flujo de neutrones con el que se irradian las muestras, la concentración de boro y las condiciones de etching, las trazas pueden observarse lo suficientemente separadas como para permitir la medición de la densidad de trazas (por conteo de las mismas) y a la evaluación de la concentración de boro por medio de un sistema de calibración (autorradiografía cuantitativa, AQT) (Portu et al., 2011). Variando estas condiciones, también es posible obtener imágenes autorradiográficas con una gran densidad de trazas, pudiéndose evaluar en forma cualitativa las diferencias en los niveles de grises, y así brindar información valiosa sobre la distribución espacial de boro (autorradiografía cualitativa, AQL) (Portu et al., 2013). Esta metodología se ha aplicado anteriormente en protocolos de BNCT secuencial y de normalización de vasos en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster (Portu et al., 2015; Molinari et al., 2015).

## 2.3 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. Solo cuando los neutrones térmicos se combinan con el  $^{10}\text{B}$ , 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 solo ha sido generado a partir de reactores nucleares por un proceso de fisión (Burian et al., 1997). Actualmente, se encuentran en desarrollo aceleradores de partículas de baja energía capaces de generar neutrones para BNCT, que podrían ser instalados en hospitales (Kreiner et al., 2011).

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).

Hoy en día, existen sólo unos pocos centros nucleares de investigación donde se llevan a cabo ensayos clínicos ó actividades de investigación para BNCT para el tratamiento de diferentes entidades oncológicas (Moss, 2014). Entre ellos se encuentran los reactores : THOR en la Universidad Nacional Tsing Hua (Taiwán), KURR y JRR-4 en la Universidad de Kyoto (Japón), TRIGA LENA-IT-005 (Italia) y 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, en el caso de China (Beijing) (Moss, 2014).

Hace más de dos décadas se propuso la utilización de aceleradores de partículas de baja energía como fuente de neutrones para BNCT. Existe 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), Finlandia (Yoshioka et al., 2014), Rusia (ej. Kononov et al., 2010; Bayanov et al., 2009) y Argentina (Kreiner et al., 2011). Los aceleradores ofrecen las siguientes 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. 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).

## **2.4 Resumen de antecedentes de ensayos clínicos de BNCT**

### **2.4.1 Breve reseña histórica de BNCT a nivel mundial**

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

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

Desde entonces, se realizaron y/o se encuentran en curso ensayos clínicos de BNCT en varios países (EE.UU., varios países de Europa, Argentina, Taiwan y Japón) para el tratamiento de glioblastoma multiforme, melanoma y más recientemente de cáncer de cabeza y cuello y mesotelioma pleural maligno (Chanana et al. 1999; Busse et al. 2003; Díaz 2003; Gonzalez et al. 2004; Suzuki et al. 2008; Aiyama et al. 2011; Nakai et al. 2011; Kankaanranta et al. 2011, 2012; Haapaniemi et al. 2014; Wang et al. 2014; Kageji et al. 2014; Kato et al. 2014). Podemos concluir que los resultados de estos ensayos clínicos demuestran que BNCT es por lo menos igual de eficaz que las terapias estándar, con la ventaja que involucra una única aplicación (o a lo sumo 2 aplicaciones). Cuando se comparan los resultados de ensayos clínicos y de tratamientos estándar se debe tener en cuenta que los pacientes que se incluyen en los ensayos clínicos son aquellos que son más difíciles de tratar ya que no han respondido a las terapias disponibles y/o no tienen opción terapéutica. Indudablemente hay espacio para optimizar BNCT para distintas patologías y en ese sentido la investigación traslacional en modelos animales adecuados juega un rol central.

## 2.4.2 BNCT en Argentina

En la Argentina, el proyecto BNCT se lleva a cabo en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) con la colaboración de varias instituciones, pudiendo nombrar al Instituto de Oncología Dr. Ángel Roffo, Universidad de Maimónides, Facultad de Odontología UBA, etc., entre otras.

El proyecto BNCT en Argentina comenzó en el año 1996 con el objeto de desarrollar la tecnología, las facilidades y los estudios científicos y médicos que permitan concretar la investigación clínica de la terapia por captura neutrónica en pacientes. BNCT es un proyecto multidisciplinario que representa una conjunción extraordinaria de tecnología nuclear, física médica, química, biología y medicina para tratar el cáncer. En este proyecto multi-institucional participan los tres Centros Atómicos (Constituyentes, Ezeiza y Bariloche) con alrededor de 60 profesionales organizados en distintas áreas temáticas, que colaboran intensamente entre sí.

Durante los años 2003 al 2007, se comenzó el ensayo clínico para el tratamiento en fase I/II de pacientes con melanoma maligno en extremidades en la facilidad de BNCT del reactor RA-6, Centro Atómico Bariloche, demostrando la seguridad y eficacia del protocolo implementado (Menendez et al., 2009). Los resultados obtenidos en los 7 pacientes fueron comparables a los alcanzados con otras formas de radioterapia, pero con una toxicidad más baja y tolerable (Gonzalez et al. 2004, Santa Cruz, 2014).

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

Recientemente, en octubre de 2015, se reinició el ensayo clínico de BNCT para melanoma de extremidades. Los resultados del tratamiento del primer paciente de esta etapa se encuentran en evaluación.

Además del ensayo clínico para melanoma maligno, se encuentran en estudio a nivel experimental 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, osteosarcoma, cáncer de mama, entre otros.

Nuestro grupo realiza estudios de BNCT experimentales y preclínicos en cáncer de cabeza y cuello y estudios experimentales en modelos de metástasis difusas en pulmón e hígado además de investigar la aplicación de BNCT en artritis reumatoidea (Santa Cruz, 2014).

### 3. Electroporación

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 (Kotnik et al., 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. 9). 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).

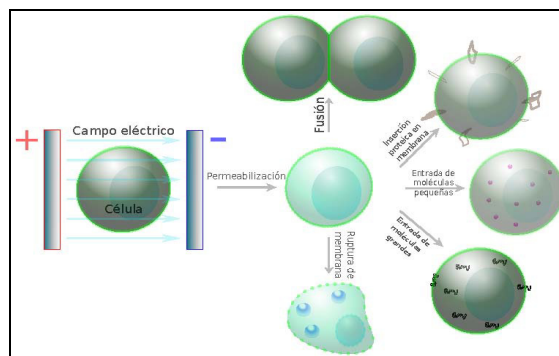


Fig. 9 Representación de diferentes grados de permeabilización de la membrana celular luego de la aplicación de un campo eléctrico, el cual puede generar la fusión celular, la inserción de proteínas a una membrana, la entrada de moléculas pequeñas y/o grandes y hasta la ruptura de la membrana celular.

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 et al., 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 éste 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 citorreductora 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), 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) y ensayos clínicos en pacientes con EP+ radioquimioterapia (ej. Domanico et al., 2015) con resultados ventajosos.

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  $\mu$ 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.

## **4. Breve reseña de cáncer de cabeza y cuello**

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

El carcinoma de células escamosas es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral y orofaringe (OSCC). Representa entre el 0,6 y el 5% de todos los tumores malignos del cuerpo humano (Binnie y Rankin, 1984).

Los carcinomas de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello son la sexta causa más común de muertes por cáncer en el mundo, y su incidencia está aumentando rápidamente en los países en desarrollo. La prognosis es pobre: el 50-70% de los pacientes muere en cinco años debido a las recidivas, metástasis en esófago y pulmón, o segundos tumores primarios en alguna parte de la cavidad oral (cancerización de campo) (Mognetti et al., 2006). En la Argentina, la tasa de mortalidad por cáncer oral se ha incrementado en los últimos años en mayor medida que el cáncer de cualquier otra parte del organismo (Morelato y López de Blanc, 2006).

En general, los tratamientos aplicados a los tumores de cabeza y cuello consisten en cirugía y/o radiación, administrada con o sin quimioterapia. La resección quirúrgica del tumor primario con márgenes patológicos seguros es primordial para el tratamiento de los OSCC. Para estadios tempranos de la enfermedad, esa práctica quirúrgica, incluso sin tratamiento adyuvante, generalmente cura al paciente. Sin embargo, como la cavidad oral tiene muchas funciones importantes como deglución y articulación, una cirugía muy amplia pone en peligro los resultados funcionales y cosméticos para el paciente, lo que resultará en detrimento de la calidad de vida (Chen et al., 2012). En este marco, BNCT podría ofrecer una opción terapéutica con preservación de los tejidos, y actualmente es una alternativa bajo estudio a nivel clínico en algunos centros en el mundo (Kankaanranta et al., 2012).

## 4.1 Modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster

Uno de los mejores modelos caracterizados 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 representa los eventos secuenciales principales involucrados en el desarrollo del cáncer y precáncer oral humano. Se encuentra mundialmente aceptado como modelo de cáncer oral por inducción química por topicación con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA). Las mayores ventajas de este modelo son la similitud 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 hormonas, micronutrientes, entre otros. A su vez, permite el estudio del tejido con lesiones potencialmente malignas alrededor del tumor, tejido con alta relevancia clínica dado el fenómeno de la cancerización de campo, a diferencia de aquellos modelos de implantación de células malignas en tejido normal (Trivillin et al. 2006).

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 (por ej. Dimetilbenzantraceno ó DMBA), sin necesidad de anestésiar el animal durante este proceso (Fig. 10 C). A su vez, bajo una anestesia leve, las bolsas pueden ser extendidas fácilmente para ser irradiadas localmente y evertidas para realizar el seguimiento macroscópico del comportamiento de los tejidos (Fig. 10 A y B). Este modelo provee tumores exofíticos de SCC rodeados de tejido premaligno precanceroso, el cual es limitante de dosis (Fig. 10 D). También 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.

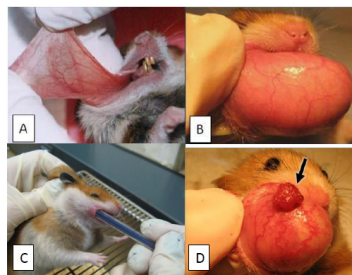


Fig. 10 Bolsa normal de la mejilla del hámster extendida (A), evertida para su observación (B). (C): Topicación con carcinógeno químico. (D): Ejemplo representativo de una bolsa de la mejilla del hámster con tumor exofítico (flecha) rodeado de tejido precanceroso, inducido por el protocolo de cancerización clásico (aplicación de DMBA en aceite mineral 0,5%, 2-3 veces por semana, durante 12 semanas).

## 5. Antecedentes del trabajo y objetivos

A nivel experimental, los estudios iniciales de BNCT con el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster realizados en nuestro laboratorio en el reactor RA-6 (Kreimann et al. 2001a,b) demostraron, a nivel experimental, por primera vez la factibilidad y eficacia de BNCT para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello y precedieron a los ensayos clínicos de BNCT para tumores de cabeza y cuello en Japón (Kato et al. 2004) y más recientemente en Finlandia (Kankaanranta et al. 2007, 2012).

Nosotros propusimos y validamos el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, demostrando la incorporación a tumor de los compuestos BPA, GB-10 y BSH, solos o combinados, todos portadores de boro aceptados para su uso en la clínica (ej. Kreimann et al., 2001a; Heber et al., 2004; Garabalino et al., 2013; Garabalino et al., 2014). Si bien estos estudios arrojaron resultados alentadores en términos de control tumoral, estudios posteriores en los cuales se ensayaron nuevas estrategias de aplicación de BNCT, contribuyeron a optimizar el control tumoral y a reducir la mucositis que se desarrolla en el tejido precanceroso y que limita la dosis que se puede administrar a tumor (ej. Molinari et al., 2011, 2012, 2014; Monti Hughes et al., 2015).

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

Posteriormente, varios ensayos *in vitro*, utilizando diferentes cultivos celulares, se realizaron combinando la EP seguida de la aplicación de BNCT, con resultados alentadores. El empleo de BSH ó Acido Bórico (BA) en líneas celulares de tumores 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 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 en ratones C57BI/6 con tumores desarrollados a partir de la implantación de células de melanoma (B16F1) y en ratones C3H/He con tumores de carcinoma de células escamosas (SCCVII)

utilizando BSH como agente portador de boro mas EP (Cemazar et al., 2000; Ono et al., 2000). Los resultados mostraron una acumulación prolongada y selectiva del compuesto borado en el tumor y una mayor tasa de lavado en sangre en tumores electroporados versus sin EP (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 donde 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).

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 ésta técnica se realizaron estudios *in vivo* en ratones nude con tumores de la línea SAS (SCC) para evaluar la captación de agentes borados (BPA ó BSH) y la eficacia terapéutica de BNCT (mediado por BPA ó 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)

Dado que múltiples estudios han demostrado que la biodistribución de los compuestos borados en tumor, en cuanto a la concentración absoluta y relativa de  $^{10}\text{B}$ , 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 autorizados para su uso en humanos ya que esto acortará la brecha entre la investigación y la potencial aplicación clínica.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo final fue evaluar 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 tumores de carcinoma de células escamosas del modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Asimismo, dado que la optimización en la incorporación del compuesto borado aumentaría la eficacia terapéutica de BNCT, se estudió por primera vez el potencial efecto terapéutico y/o tóxico de dos

protocolos de BNCT mediado por GB-10 con seguimiento *in vivo*, combinados con electroporación aplicada en distintas etapas de la administración del compuesto borado.

## CAPITULO 2

### 2. Estudios de Biodistribución

#### 2.1 Introducción

Resulta indispensable conocer el contenido de boro en los tejidos para realizar los cálculos dosimétricos previos al tratamiento con BNCT. Con este objetivo, se realiza un estudio de biodistribución previo para conocer la concentración de boro en diferentes tejidos y sangre del animal o del paciente. Una vez administrado el compuesto borado, se toman muestras a tiempos pre-determinados de los tejidos de interés, los cuales son procesados para su posterior determinación de concentración de boro ([B]) por medio de técnicas analíticas, como por ejemplo ICP-OES (Espectrometría de emisión óptica por acoplamiento inductivo), ICP-MS (Espectrometría de masa con plasma de acoplamiento inductivo), autorradiografía neutrónica (ARN), prompt gamma, etc. (Farhat et al., 2013).

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/Bolsa 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].

Basados en 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 los compuestos borados BPA, GB-10 y BPA+GB-10 (Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2004; Heber et al., 2004, 2006; Pozzi et al., 2009) nosotros establecimos una guía para la selección de protocolos de administración con posible potencialidad terapéutica, según los siguientes criterios:

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

La selección de un protocolo con potencialidad terapéutica para BNCT, no solo se basa en los criterios anteriores, sino que también depende de la microdistribución del compuesto borado. 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).

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 biodistribución in vivo. En éste sentido, la investigación traslacional en modelos de animales adecuados (ej. tumores de carcinomas de células escamosas (SSC) en hámsters) ocupa un papel central.

En la Fig.11 se muestra el esquema de estudios de biodistribución realizados en nuestro laboratorio en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster con GB-10 +EP.

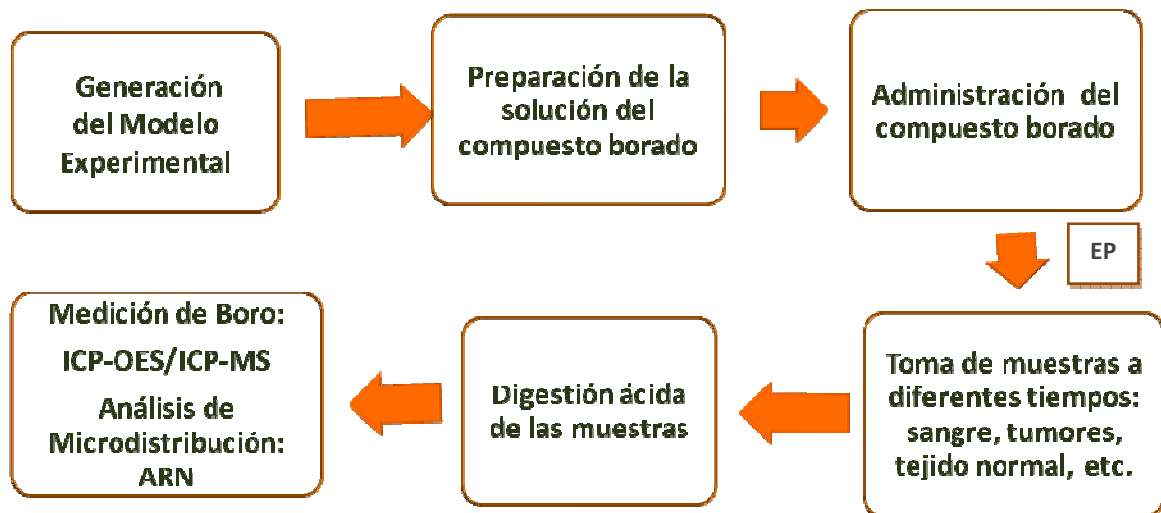


Fig.11. Esquema típicamente utilizado en los estudios de biodistribución en el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster en nuestro laboratorio, para estudios con GB-10+EP.

A continuación se detallarán cada uno de los pasos del esquema de biodistribución utilizados en éste trabajo final.

## 2.2 Materiales y Métodos

### 2.2.1 Generación del modelo experimental de cáncer oral en hámster

La inducción de tumores en la bolsa derecha de la mejilla de hamsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (6-8 semanas), se realizó con el carcinógeno químico DMBA en una solución al 0,5 % en aceite mineral, por medio de la técnica de topicación, 2 veces por semana durante 12 semanas (Fig.10). Una vez que se desarrollaron los tumores exofíticos de SCC los animales fueron usados para los estudios pertinentes.

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

### 2.2.2 Preparación de la solución del compuesto borado

Se utilizó GB-10 proporcionado por Neutron Therapies, L.L.C. EE.UU. con 99% de enriquecimiento de  $^{10}\text{B}$  de concentración 1 mg/ml, diluido 1/10 con agua calidad miliQ (18  $\Omega$ ). Las soluciones utilizadas fueron preparadas el mismo día de cada estudio de biodistribución.

### 2.2.3 Administración de la solución del compuesto borado

La solución del compuesto borado GB-10 fue administrada por vía intravenosa (iv) en la vena yugular a una dosis de 50 mg $^{10}\text{B}$ /kgm.c., bajo sedación con ketamina (140 mg/kg m.c.)/xilacina (21 mg/kg m.c.)(Fig. 12) para los protocolos con EP y el control sin EP.



Fig.12. La fotografía muestra la administración del GB-10 por vía iv a una dosis de 50 mg $^{10}\text{B}$ /kg de peso corporal.

## 2.2.4 Procedimiento de la técnica de Electroporación

Las Electroporaciones se realizaron utilizando un electroporador (BTX ECM 830 Harvard Apparatus) según la secuencia de pulsos típica para ECT (1000 v/cm, 8 pulsos de 100  $\mu$ s). La corriente eléctrica fue medida mediante una sonda de 1 ohm y un osciloscopio digital (Infinii Vision DSO-X 2012A-SGM, Agilent Technologies, USA) (Fig.13).

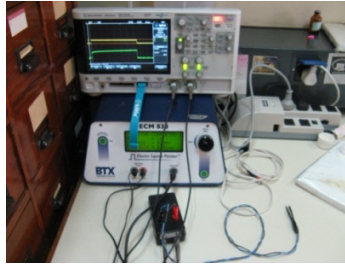


Fig.13. Electroporador (BTX ECM 830 Harvard Apparatus) utilizado en este trabajo final

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.14 A) y medianos y grandes (volumen  $\geq 10 \text{ mm}^3$ ) (Fig.14 B). El tamaño tumoral se determinó utilizando un calibre digital, midiendo el ancho, largo y espesor de los tumores, expresando el resultado como volumen tumoral en unidades de  $\text{mm}^3$ .

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 & 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]), 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.

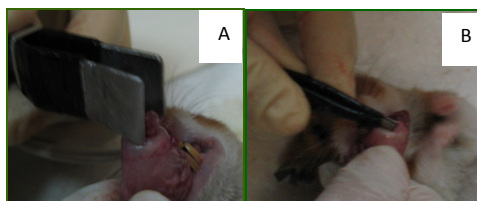


Fig.14. Electrodos del tipo placa paralelas utilizados en el procedimiento de EP en tumores medianos y grandes cuyo volumen tumoral  $\geq 10 \text{ mm}^3$  (A) y tumores chicos con volumen tumoral  $\leq 10 \text{ mm}^3$  (B).

### 2.2.5 Protocolos ensayados con EP+GB-10

Utilizando el compuesto borado GB-10 y variando el momento de aplicación de la EP con respecto a la administración de dicho compuesto, se evaluaron los siguientes protocolos y control para los estudios de biodistribución en tumores de la bolsa del hámster:

**(P1B)** Protocolo de biodistribución con GB-10/EP tardía: GB-10, 50 mg <sup>10</sup>B/kg intravenoso (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 <sup>10</sup>B/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 <sup>10</sup>B/kg iv (t=0 min) – sacrificio y toma de muestras (t=3 hs).

### 2.2.6 Toma de muestras

Luego de administrar la solución de GB-10 y aplicar la EP según los protocolos descritos en el apartado anterior, los animales fueron eutanasiados por decapitación bajo sobredosis de anestesia de ketamina (140 mg/kg m.c.) y xilazina (21 mg/kg m.c.), 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. La masa de las muestras de tumor y tejidos normales estuvieron entre 20 y 50 mg y las de la sangre fueron de alrededor de 300 mg.

A fin de contribuir al estudio de la factibilidad de mejorar el targeting de boro en el modelo de cáncer bucal 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. Mediante la autorradiografía neutrónica cualitativa, se estudió la microdistribución de B-10 en las diferentes estructuras tisulares. Para ello se tomaron muestras de tumor y tejido precanceroso, y se crio-preservaron a -160°C en nitrógeno líquido, hasta el día de su procesamiento.

### 2.2.7 Preparación de las muestras

Para las mediciones de B por la técnica de ICP-OES se realizaron digestiones ácidas utilizando 0,25 ml de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (J.T. Baker) y HNO<sub>3</sub> sub-boiling (Merck) relación 1:1 para las muestras de tumor y tejidos normales y 1,25 ml para las muestras de sangre, a 100°C durante 1 h en un baño térmico de agua. Una vez que alcanzaron temperatura ambiente se adicionaron 0,20 ml de una solución acuosa de Y 0,5 ppm + Sr 25 ppm 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.

Para la medición de  $^{10}\text{B}$  mediante la técnica de ICP-MS se pesaron entre 20 y 50 mg de muestras de tumor y tejidos normales y alrededor de 300 mg de sangre. Estas muestras fueron digeridas de la misma manera que para las de ICP-OES. 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  $^6\text{Li}$  de 1 ppm como estándar interno y completando a volumen final de 10 ml.

Para los estudios de ARN de tejido tumoral y precanceroso se obtuvieron cortes por congelación mediante un criostato Lipshaw USA, o un criostato Thermo Shandon Cryotome E (AS620E), logrando cortes de alrededor de 10  $\mu\text{m}$  y 30-50  $\mu\text{m}$  de espesor consecutivamente. Los más delgados se depositaron sobre portaobjetos para realizar un análisis histológico, tras una tinción estándar de hematoxilina/eosina. Las muestras más gruesas se montaron sobre folias detectoras de trazas nucleares (Lexan<sup>TM</sup> de 250  $\mu\text{m}$  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.

### **2.2.8 Medición de la concentración de B por ICP-OES/ICP-MS**

Las mediciones de boro se realizaron en un equipo ICP-OES (Espectrómetro de Emisión Óptica Acoplada por Plasma Inductivo, Optima 3100 XL, UV, axial, Perkin-Elmer) ó en un ICP-MS (Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma Inductivo de Masa, Elam DRC II, Perkin-Elmer).

La curva de calibración para las mediciones en el ICP-OES comprendieron 7 soluciones patrón utilizando  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , enriquecido en  $^{10}\text{B}$  (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  $^{10}\text{B}$ . Las líneas consideradas para la medición de B fueron 208.889 y 249.677 nm.

Para las mediciones en el ICP-MS se prepararon 5 soluciones patrón para la curva de calibración utilizando  $\text{H}_3\text{BO}_3$  enriquecido en  $^{10}\text{B}$  (Glyconix Corp. >99 % pureza). Estas incluyeron blanco con  $^6\text{Li}$  1 ppm y soluciones de 20 ppb, 10 ppb, 5 ppb, y 2,5 ppb de  $^{10}\text{B}$ .

### **2.2.9 Obtención de las imágenes de las muestras por ARN**

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  $10^{13} \text{n.cm}^{-2}$ .

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 ó 2,5x), con el objeto de obtener imágenes de la totalidad del corte

El daño generado en los detectores se amplificó mediante un ataque químico con solución alcohólica de KOH, durante 4 min. Las muestras se re-exploraron, obteniendo las imágenes autorradiográficas correspondientes.

### **2.2.10 Análisis estadístico**

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, computando el valor de “p” y estableciendo un nivel de significancia en  $p \leq 0,05$ .

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Resultados de los estudios de biodistribución con EP+GB-10**

La Tabla 1 muestra los valores de [B] en ppm 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 (P1B, P2B y P3B). 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 tumoral vs el control solo GB-10 (P3B) ( $p=0,0368$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente). Respecto de los resultados de las relaciones T/S, el protocolo P1B ( $0,5 \pm 0,2$ ) no mostró un aumento significativo ( $p=1,00$ ) comparado con el control sin EP P3B ( $0,5 \pm 0,2$ ). Lo mismo ocurrió en cuanto a las relaciones T/BN, ya que solo se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,0001$ ) entre el protocolo P2B ( $2,3 \pm 0,8$ ) y el control P3B ( $1,0 \pm 0,4$ ) a diferencia del P1B ( $0,9 \pm 0,4$ ), que no mostró una incorporación selectiva a tumor del compuesto GB-10 con EP tardía, al igual que el 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.

	EP Tardía+ BNCT /GB-10 (P1B)	EP Temprana+ BNCT /GB-10 (P2B)	Control Solo GB-10 (P3B)
Sangre	26,5 ± 8,7 (n=3)	21,7 ± 10,7 (n=4)	16,7 ± 3,4 (n=5)
Tumor	11,9 ± 4,6 (n=10)	20,2 ± 9,6 (n=15)	9,5 ± 2,4 (n=31)
Bolsa Normal	12,7 ± 2,4 (n=3)	10,0 ± 4,6 (n=4)	11,4 ± 2,5 (n=5)
Tej. Precanceroso	12,9 ± 4,2 (n=3)	8,9 ± 1,1 (n=4)	12,4 ± 1,4 (n=5)
T/S	0,5 ± 0,2 (n=10)	1,3 ± 0,4 (n=15)	0,5 ± 0,1 (n=31)
T/BN	0,9 ± 0,4 (n=10)	2,3 ± 0,8 (n=15)	1,0 ± 0,4 (n=31)

Tabla 1. Concentración de boro (media ± D.S) (ppm) en sangre y tejidos y relaciones de Tumor/Sangre (T/S) y Tumor/Bolsa Normal (T/BN) para los protocolos con EP+GB-10 (P1B y P2B) y el control solo GB-10 (P3B). (n= número de tumores o número de hamsters)

### 2.3.2 Resultados de la microdistribución de <sup>10</sup>B por ARN

Los resultados de los estudios de autorradiografía neutrónica de las muestras de bolsa de hámster correspondientes a los protocolos de GB-10 con y sin EP se muestran en la Fig. 15. Las diferencias de concentración pueden visualizarse en la imagen autorradiográfica a través de las variaciones en los niveles de gris. Un primer análisis de la microdistribución del compuesto permite inferir una sugerente menor captación de boro de los tumores provenientes del protocolo GB-10+EP tardío (P1B) en relación al protocolo GB-10 sin EP (P3B). A pesar de ésta disminución en la captación, la distribución de boro en tumor fue homogénea, con un leve aumento en la captación del estroma (E) respecto del parénquima (P). Por el contrario, el tumor del protocolo GB-10+EP temprana (P2B) presenta una mayor captación global en comparación con los otros protocolos. Además, las regiones correspondientes al parénquima tumoral presentan niveles de gris mayores que las de estroma en la imagen autorradiográfica, 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).

En relación al tejido precanceroso, ambos protocolos de EP presentan distribuciones similares entre sí y similares al protocolo con GB-10 sin EP. El tejido conectivo (C) acumula una cantidad de boro considerablemente mayor que el músculo y el epitelio (ep), que presentan distribuciones comparables.

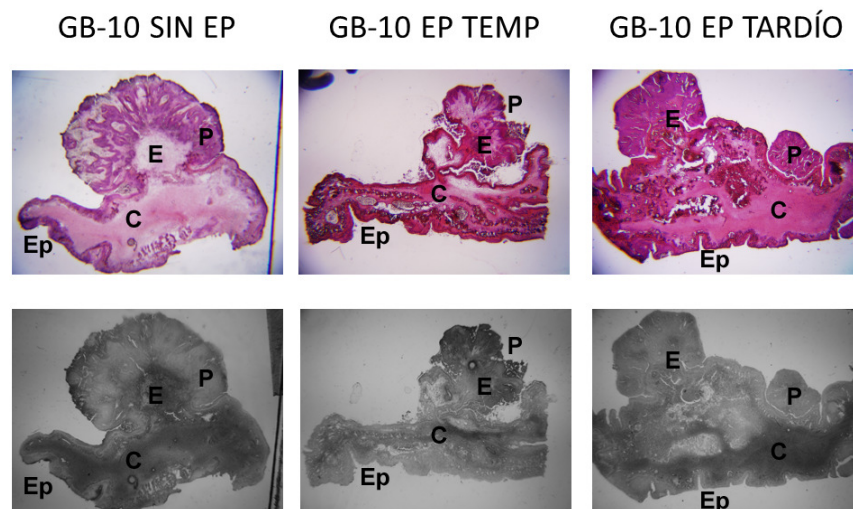


Fig. 15. Imágenes histológicas coloreadas con hematoxilina-eosina (panel superior) y autorradiográficas (panel inferior) de tumor y tejido precanceroso de la bolsa de la mejilla del hámster proveniente de los protocolos GB-10 sin EP, GB-10 + EP temprana y GB-10 + EP tardía. P: parénquima, E: estroma, C: tejido conectivo, ep: epitelio. Magnificación original: 1.25x

## 2.4 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 éstos estudios se observó una acumulación prolongada y selectiva de B en los tumores y una mayor tasa de lavado en sangre en tumores electroporados versus sin EP (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 tumores de SCC 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.

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 (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. En éste contexto y según los resultados del presente estudio, en particular la combinación de la técnica de EP temprana mejoraría el targeting de boro con el compuesto GB-10 en los tumores de SCC versus el control de solo GB-10. De éste 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.

Dado que para obtener una respuesta óptima con la técnica de ECT, la misma debe ser aplicada cuando el agente quimioterapéutico está presente en una concentración apropiada en los tejidos, nosotros ensayamos dos momentos diferentes de aplicación de EP (Temprana y Tardía). 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 8-28 minutos después la administración intravenosa de bleomicina (Mevio et al., 2012). De acuerdo con estos hallazgos, nuestros mejores resultados de biodistribución de  $^{10}\text{B}$  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 un tiempo más prolongado en las áreas electroporadas. De este modo, el tratamiento puede ser más eficaz debido a la persistencia más larga del fármaco en la zona de tumor.

Dentro de las estructuras celulares en el tumor, se demostró 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. De acuerdo a éstos resultados y a los obtenidos en el presente estudio, los tumores con EP temprana presentarían una microdistribución contraria a la esperada para el compuesto. Es decir que habría mayor acumulación en parénquima, al menos en algunas regiones y favorecería el aumento en la eficacia terapéutica de BNCT mediada por el compuesto borado GB-10. La electroporación actuaría, como es de esperar, sólo en el tumor y entorno inmediato. Por lo tanto, parte del trabajo futuro consiste en confirmar estas tendencias en un mayor número de casos y cuantificar la concentración de boro en las diferentes estructuras tisulares.

En este capítulo demostramos la importancia y el aporte al conocimiento de la radiobiología de los protocolos de BNCT que otorgan los estudios de biodistribución y la técnica de autorradiografía neutrónica y por lo tanto, su comprensión es de suma relevancia a la hora de realizar una planificación terapéutica para BNCT.

## CAPITULO 3

### 3. Estudios de eficacia terapéutica de BNCT

#### 3.1 Introducción

##### 3.1.1. Modelos de cáncer oral

Es claro que ningún modelo animal modela exactamente el 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.

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 por topicación con 4-nitroquinolina-1-óxido 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). El tercer modelo resulta de la inoculación de células de línea de cáncer de cabeza y cuello humano en ratones inmunodeprimidos, dando origen a tumores xeno-transplantados subcutáneos y ortotópicos (Chen y Lin, 2010). Entre los mencionados, el modelo de cáncer bucal ideal sería aquel que ocurriera espontáneamente. Sin embargo, los carcinomas de células escamosas bucales espontáneos son muy raros tanto en animales domésticos como de laboratorio (Chen y Lin 2010). El uso de modelos animales inducidos por carcinógenos, en cambio, resulta necesario dado que los agentes químicos parecen ser el factor etiológico dominante en varias áreas de la cabeza y cuello incluyendo la cavidad oral (Vairaktaris et al. 2008). Uno de los mejores modelos caracterizados 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 bucal humano (Vairaktaris et al. 2008, Chen y Lin 2010).

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 cancerígeno completo (es decir como iniciador y promotor). Sin embargo, las etapas de la carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión) no están bien definidas en este modelo (Slaga y Gimenez Conti, 1992). Este modo de carcinogénesis, provee un modelo de tumores rodeado por tejido con alteraciones potencialmente malignas (PMD, por sus siglas en inglés) o tejido precanceroso, permitiendo el estudio de efectos terapéuticos y tóxicos en el mismo. Sin

embargo, la agresividad de este protocolo lo hace inadecuado para el seguimiento de tejidos con PMD a largo plazo. Dado que el control de los tejidos con PMD es crucial para la terapia oncológica (por los segundos tumores primarios que son causa frecuente del fracaso terapéutico), en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo lo suficientemente agresivo para garantizar el desarrollo de tumores en la mayoría de los animales cancerizados, pero que fuera bien tolerado como para realizar un seguimiento a largo plazo (Heber et al., 2010).

### 3.1.2. Mucositis

La mucositis es una reacción inflamatoria que tiene lugar en el epitelio oral. Es un efecto colateral común y doloroso en pacientes con cáncer de cabeza y cuello expuestos a tratamientos antineoplásicos tales como la radioterapia y la quimioterapia con determinadas drogas. La radioterapia no solo causa mucositis oral ulcerativa, similar a la causada por la quimioterapia en alta dosis, sino también puede inducir daños que resulten en una permanente disfunción de la vasculatura, tejido conectivo, glándulas salivales, músculo y hueso (Shih et al., 2003).

La patogénesis de la mucositis oral puede ser dividida en 5 etapas: Iniciación (I), primera respuesta al daño (señalización (II) y amplificación de la señal (III)), ulceración (IV) y cicatrización (V) (Fig. 16) (Sonis 2009).

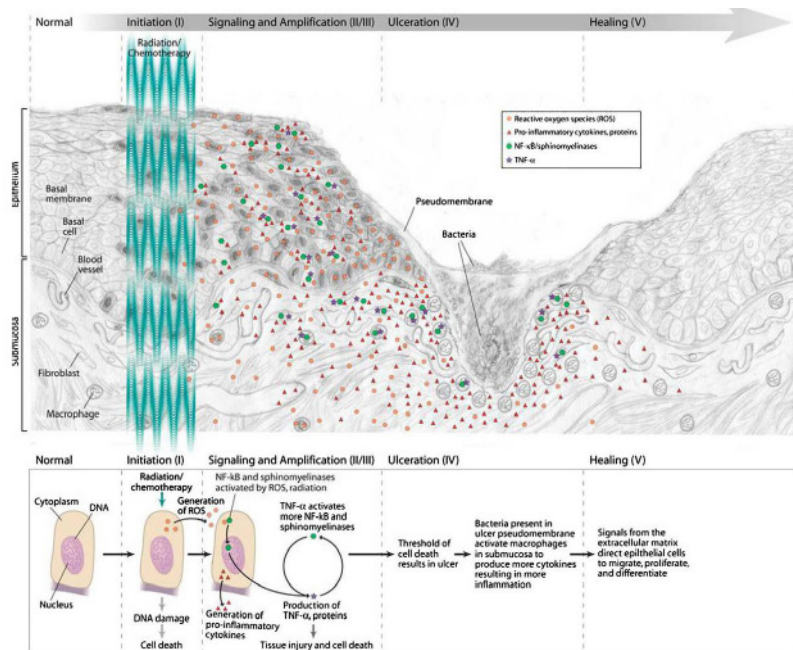


Fig.16. Patobiología de la mucositis como proceso en 5 etapas. La clave del proceso biológico asociado a la patogénesis de la mucositis oral puede ser dividido en 5 etapas: Iniciación (I), primera respuesta al daño (señalización (II) y amplificación (III)), ulceración (IV) y cicatrización (V) (Sonis 2009).

La iniciación ocurre inmediatamente después de la terapia por radiación o quimioterapia y sucede como único evento en el tiempo en pacientes que reciben una terapia “en bolo”. En otros pacientes, como aquellos que reciben dosis fraccionada de radiación, los eventos iniciadores son crónicos. Dos eventos caracterizan esta fase: 1) daño directo al ADN que lleva a la muerte celular inmediata de células del epitelio basal y células de la submucosa, 2) generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Durante la etapa primaria de respuesta al daño, la quimioterapia, radiación y ROS inician el proceso biológico que resulta en la injuria de la mucosa. Las vías de transducción disparadas por daño al ADN y peroxidación lipídica promueven la activación de un número de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, Wnt, p53 y sus vías canónicas asociadas (Sonis 2007, 2009). En cuanto a la etapa de amplificación de la señal, consiste en la habilidad de aquellas moléculas, inducidas en la etapa primera de daño, de desarrollar “feedback loops” (ciclos de retro-alimentación) que magnifican la respuesta a la injuria amplificando y potenciando las señales biológicas originales. Estos “feedback loops” no solo aumentan el daño sino que además lo prolongan mediante la continua señalización durante días luego de la terapia.

La etapa de ulceración resulta la etapa más significativa. Las úlceras son profundas, anchas y dolorosas. Están generalmente recubiertas de una pseudomembrana compuesta de células muertas y fibrina, un ambiente óptimo para la colonización bacteriana (Sonis 2007). En modelos animales, el número de bacterias aumenta más de 300 veces en la transición entre epitelio intacto y ulcerado. Las bacterias en la superficie de la úlcera potencian el proceso de mucositis. La prevención de la ulceración minimiza el dolor y el riesgo a la infección (Sonis 2009). Asimismo, la mucositis favorece la tumorigénesis, contribuyendo al desarrollo de recurrencias locoregionales y el consecuente fracaso terapéutico (Monti Hughes et al., 2013).

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

### **3.1.2.1. Clasificación del grado de mucositis en humanos y en hámsters**

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

del paciente, la capacidad de mantener la ingesta oral y la necesidad de implementar terapias (Ruiz Esquide et al., 2011).

Sonis et al. (2000) publicaron una escala de mucositis para la bolsa de la mejilla del hámster sin cancerizar, para estudiar los mecanismos de la rh-IL-11 como posible atenuador de la mucositis inducida por radiación, 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.

Nosotros adaptamos la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para mucositis oral en humanos y determinamos 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 en 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  $\geq 2$  mm y <4 mm en diámetro y/o áreas de necrosis <4 mm en diámetro;

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

### **3.1.3. Estudios de eficacia terapéutica de BNCT en el modelo de cáncer oral en hámster realizados en nuestro laboratorio**

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

los ensayos clínicos de BNCT para tumores de cabeza y cuello en Japón (Kato et al., 2004) y más recientemente en Finlandia (Kankaanranta et al., 2007, 2012).

Para evaluar, por primera vez, el potencial uso del BNCT en el control de tumores de la mucosa bucal, se empleó el modelo de cáncer bucal en hamster, utilizando el BPA como compuesto borado. Se realizaron estudios de biodistribución (Kreimann et al., 2001a) y seguidamente, los estudios de eficacia terapéutica, los cuales evidenciaron un 78% de remisiones completas y un 13% adicional de remisiones parciales, sin ningún daño significativo a los tejidos normales (Kreimann et al., 2001b).

En base a estos resultados alentadores, se continuaron los estudios de BNCT en este modelo de cáncer bucal, combinando diversos compuestos borados. Se realizaron estudios de biodistribución con GB-10 y con la combinación de GB-10 + BPA (Heber et al., 2004). Luego, se evaluó la respuesta tumoral y la potencial toxicidad de BNCT *in vivo* empleando estos protocolos de administración, demostrando un importante control del desarrollo tumoral, obteniéndose altos porcentajes de remisiones completas y parciales (Trivillin et al., 2004). Lo que resulta quizás más interesante de este trabajo, es que se demostró que en el caso de tumores tratados con BNCT mediado por GB-10, existe un marcado daño en el estroma del tumor (edema, hemorragias), resultado de la rotura de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes. Sin embargo, no se observó daño a los vasos sanguíneos del tejido precanceroso ni del tejido normal. Este efecto se observó en menor medida, cuando se empleó la combinación de compuestos borados (BPA+GB-10) para BNCT, donde se observa un menor daño a las paredes de los vasos tumorales pero un mayor daño a las células tumorales en sí (Trivillin et al., 2004).

En base a los trabajos descritos, y dada la importancia del “targeting” homogéneo en las distintas poblaciones celulares de los tumores para lograr el éxito terapéutico, se evaluaron potenciales diferencias en la homogeneidad en la distribución de boro entregado por el compuesto GB-10, BPA y BPA+GB-10. Se demostró que la administración combinada de GB-10 y BPA mejora significativamente la homogeneidad en la distribución de boro en tumor (Heber et al., 2006). Asimismo, se evaluó la respuesta tumoral a BNCT mediado por cada uno de estos protocolos empleando dosis más altas de BNCT en el RA-6 (Trivillin et al., 2006) que en el trabajo anterior (Trivillin et al., 2004), ya que no se habían observado efectos radiotóxicos importantes en el tejido limitante de dosis (tejido precanceroso ó PMD). Se demostró que BNCT mediado por la combinación de compuestos borados indujo un 93% de control tumoral (remisión completa + remisión parcial), frente al protocolo mediado por GB-10 que indujo un 70% de control tumoral. El único efecto radiotóxico que se observó, y que resulta importante recalcar, fue una mucositis reversible en tejido con PMD para los tres protocolos ensayados. No se observaron efectos radiotóxicos en mucosa normal.

Estos dos trabajos (Trivillin et al., 2004, 2006) describen un nuevo paradigma en BNCT. La hipótesis clásica de BNCT plantea que el daño selectivo en tumor se basa en la acumulación selectiva de boro en tumor. Pero nosotros pudimos demostrar un efecto selectivo de GB-10-BNCT sobre los vasos sanguíneos aberrantes del tumor, preservando los vasos sanguíneos de los tejidos con PMD y normal, a pesar que GB-10 no se deposita selectivamente en tumor. El efecto selectivo sobre los vasos sanguíneos angiogénicos del tumor se debería a su mayor radiosensibilidad debido a su estructura y función alteradas (Carmeliet y Jain, 2000), y redundaría en un daño selectivo al tumor a pesar que el compuesto borado GB-10 no se acumula selectivamente en tumores de la mucosa bucal (Trivillin et al., 2006). Habiendo demostrado la factibilidad del BNCT como tratamiento de carcinomas de células escamosas en la bolsa de la mejilla del hámster, sin daño a tejido normal, continuamos trabajando en un escenario pre-clínico aplicando BNCT como tratamiento para tumores espontáneos de cabeza y cuello en felinos domésticos terminales. Se realizaron estudios de biodistribución con el compuesto borado BPA, y estudios de BNCT en el reactor RA-1 y en el reactor RA-6. Los animales mostraron un control tumoral parcial y mejoras en su condición clínica, sin radiotoxicidad (Rao et al., 2004; Trivillin et al., 2008).

Buscando optimizar la terapia BNCT para el tratamiento de tumores en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, investigamos y demostramos la efectividad terapéutica de un nuevo protocolo de tratamiento de BNCT Secuencial, es decir, la aplicación de BPA-BNCT seguido del protocolo GB-10-BNCT, con un intervalo de 24hs ó 48hs (Molinari et al., 2011). Además desarrollamos una técnica de normalización de vasos sanguíneos aberrantes en este modelo de cáncer oral (Molinari et al., 2012), para demostrar, posteriormente, que la administración de los compuestos borados durante la ventana de normalización de los vasos sanguíneos aberrantes potencia la remisión de los tumores de la bolsa del hámster (Molinari et al., 2012) dado que la normalización temporaria de los vasos sanguíneos tumorales mejora la distribución de los compuestos borados en tumor.

Recientemente, en base a estudios de biodistribución previos realizados con liposomas borados MAC+TAC en el modelo de cáncer oral en hamster (Heber et al., 2012) demostramos un control tumoral entre el 70-88 % sostenido durante 10-16 semanas post primera aplicación de BNCT, sin evidencias de radiotoxicidad aparente en el tejido precanceroso limitante de dosis (Heber et al., 2014).

Basándonos en el éxito terapéutico obtenido por nuestro grupo de trabajo en los estudios de BNCT mediados por diferentes compuestos borados solos o combinados (BPA, GB-10, BPA+GB-10) en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster y asumiendo que la electroporación puede actuar como un sistema no específico de administración de agentes antitumorales, nosotros evaluamos por primera vez el efecto

terapéutico de la combinación de la técnica de Electroporación + BNCT mediado por GB-10 en tumores de carcinoma de células escamosas en la bolsa de la mejilla del hámster, con seguimiento *in vivo*. La hipótesis de trabajo fue que la electroporación mejoraría la incorporación y/o distribución de GB-10 en tumor, aumentando la eficacia terapéutica de GB-10-BNCT.

La Fig. 17 muestra el esquema de estudios de BNCT *in vivo* realizados en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster mediado por GB-10 +EP o en el caso de los controles, mediado por GB-10 sin EP.

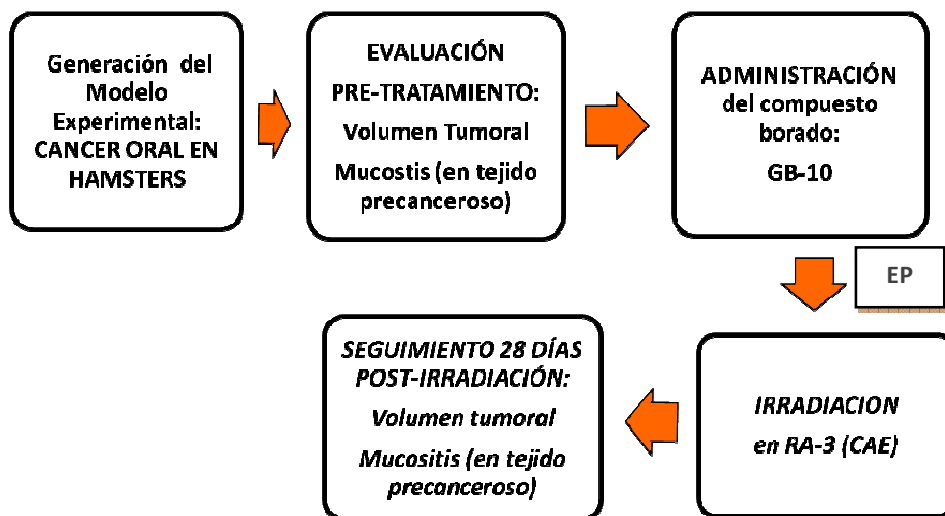


Fig. 17. Esquema típicamente utilizado en los estudios de eficacia terapéutica de BNCT en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, para estudios de BNCT mediado por GB-10+EP.

A continuación se detallarán cada uno de los pasos del esquema de estudios de BNCT *in vivo* utilizados en éste trabajo final.

## 3.2 Materiales y Métodos

La generación del modelo experimental en al bolsa de la mejilla del hámster, la preparación y administración de la solución de GB-10 y el procedimiento de la técnica de EP fueron los mismos que para los estudios de Biodistribución (Ver Cap.2 inciso 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4).

### 3.2.1. Protocolos ensayados con EP+GB-10 y controles con GB-10 sin EP para estudios de BNCT *in vivo*

Para evaluar la eficacia terapéutica de GB-10-BNCT con o sin EP *in vivo* se usaron los siguientes protocolos y controles:

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

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

(P3) Control Solo EP: EP (t=0 min) (n=5 hámsters).

(P4) Control BNCT GB-10 sin EP: GB-10, 50 mg  $^{10}\text{B}$ /kg iv (t=0 min) - irradiación (t=3 hs) (n=4 hámsters).

(P5) Control Solo Haz: irradiación sin administración del compuesto borado (Molinari et al., 2012) (n=6 hámsters).

(P6) Control EP tardía + Irradiación: EP (t=0 min) – Irradiación (t=10 min) (n=5 hámsters).

(P7) Control EP temprana + Irradiación: EP (t=0 min) – Irradiación (t=2:50 hs) (n=5 hámsters).

### 3.2.2. Irradiación en el reactor RA-3

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). Un túnel que penetra la estructura de grafito de la columna térmica permite la inserción de las muestras dentro de la nube isotrópica de neutrones mientras el reactor se encuentra en normal funcionamiento para la producción de radioisótopos (Fig. 18).

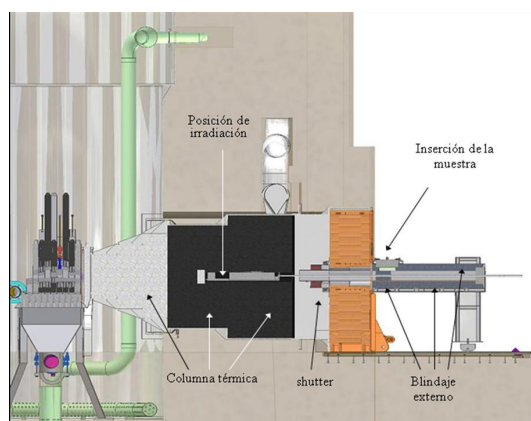


Fig.18. Dibujo en vista lateral de la FCCT (Facilidad de irradiación Central de la Columna Térmica) en corte a la altura del canal de irradiación del RA-3.

Para proteger el cuerpo del animal del flujo de neutrones térmicos se construyó un blindaje que permite exponer la bolsa de la mejilla del hámster a ser irradiada (Pozzi et al., 2009). El recinto fue fabricado con láminas de acrílico rellenas de carbonato de litio enriquecido en un 95% en  $^6\text{Li}$  (Fig. 18).



Fig. 18 Vista de la ubicación final de los animales dentro del blindaje (superior izquierda). Superior derecha: blindaje cerrado, listo para ser colocado en la FCCT. Inferior: se puede observar en detalle como quedan posicionadas las bolsas para el tratamiento.

Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina para luego realizar las irradiaciones con una fluencia de  $1,9 \times 10^{12}$  n/cm<sup>2</sup> para todos los protocolos y controles realizados en este estudio. Por los cortos tiempos de irradiación no fue necesario mantener húmedos los tumores.

### 3.2.3. Seguimiento de los animales

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.

Antes de cada irradiación se calculó el volumen tumoral según lo explicado en el Cap. 2 inciso 2.2.4. En éste caso 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.

La respuesta tumoral fue evaluada por inspección visual, realización de un diagrama de cada bolsa con la ubicación de todos los tumores, toma de imágenes fotográficas y determinación del volumen tumoral a 7, 14, 21 y 28 días post-irradiación, en todos los casos.

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).

La evaluación de la severidad de mucositis en el tejido precanceroso alrededor del tumor se realizó según la escala semi-cuantitativa descrita anteriormente en éste capítulo en el apartado 3.1.1.1. Nosotros agrupamos a los Grados 0-2 como mucositis leve, Grado 3 mucositis moderada y 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 28 días de seguimiento. Ese grado de mucositis se denominó Mucositis Máxima.

Todos los estudios experimentales en animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicado por National Institutes of Health (NIH Publication, 1996).

### **3.2.4. Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los porcentajes de control tumoral, remisiones completas y remisiones parciales de cada uno de los protocolos ensayados con GB-10+EP versus los controles, fue analizada mediante una tabla de contingencia de 2x2, computando el valor de “p” mediante el test exacto de Fisher. El nivel de significancia se estableció en  $p \leq 0,05$ .

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1. Resultados de los estudios de eficacia terapéutica de BNCT con EP+ GB-10 *in vivo***

Los resultados de respuesta tumoral a los 28 días post-tratamiento correspondientes a los distintos grupos se muestran en las Tablas 2A y 2B. En la Tabla 2A se muestran los resultados de todos los tumores, sin discriminar por volumen, mientras que en la Tabla 2B se muestran los resultados discriminando por volumen tumoral en el momento de irradiación según una escala arbitraria (chicos  $<10 \text{ mm}^3$ ; medianos y grandes  $\geq 10 \text{ mm}^3$ ). La discriminación por volumen tumoral se realiza para explorar la potencial influencia del volumen tumoral en el momento del tratamiento sobre la respuesta. La respuesta tumoral se expresa como remisión completa (RC), remisión parcial (RP) o control tumoral (CT: RC + RP).

	EP Tardía+ BNCT /GB-10 (P1)	EP Temprana+ BNCT /GB-10 (P2)	Control Solo EP (P3)	Control BNCT/GB-10 (P4)	Control Solo Haz (P5)	Control EP Tardía + Irradiación (P6)	Control EP Temprana +Irradiación (P7)
RP	40%	46%	26%	42%	18%	31%	28%
RC	30%	46%	8%	6%	0%	19%	10%
SR	30%	8%	66%	52%	82%	50%	62%
CT	<b>70%</b>	<b>92%</b>	<b>33%</b>	<b>48%</b>	<b>18%</b>	<b>50%</b>	<b>38%</b>
n	23	46	38	33	50	16	32

Tabla 2A. 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.

	EP Tardía+ BNCT /GB-10 (P1)		EP Temprana+ BNCT /GB-10 (P2)		Control Solo EP (P3)		Control BNCT/GB-10 (P4)		Control Solo Haz (P5)		Control EP Tardía + Irradiación (P6)		Control EP Temprana +Irradiación (P7)	
	C	M+G	C	M+G	C	M+G	C	M+G	C	M+G	C	M+G	C	M+G
RP	33%	45%	23%	75%	18%	33%	33%	50%	18%	17%	0%	56%	14%	50%
RC	50%	9%	65%	20%	18%	0%	7%	6%	0%	0%	43%	0%	18%	0%
SR	17%	46%	12%	5%	64%	67%	60%	44%	82%	83%	57%	44%	68%	50%
CT	<b>83%</b>	<b>54%</b>	<b>88%</b>	<b>95%</b>	<b>36%</b>	<b>33%</b>	<b>40%</b>	<b>56%</b>	<b>18%</b>	<b>17%</b>	<b>43%</b>	<b>56%</b>	<b>32%</b>	<b>50%</b>
n	12	11	26	20	17	21	15	18	38	12	7	9	22	10

Tabla 2B. Tabla de porcentajes de Respuesta Tumoral de distintos protocolos de EP combinada con BNCT/GB-10 y protocolos control, discriminada por el 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 <10mm<sup>3</sup>); M+G: tumores medianos y grandes (volumen ≥ 10mm<sup>3</sup>).

Considerando la respuesta sin discriminar por volumen tumoral (Tabla 2A), el CT de GB-10-BNCT fue de 48%. Los valores de CT de ambos grupos tratados con GB-10-BNCT + electroporación fueron mayores que el valor de GB-10-BNCT. En el caso de EP tardía/GB-10-BNCT el CT fue del 70%, pero a pesar de la diferencia con GB-10-BNCT sin EP, ésta no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, en el caso de EP Temprana /GB-10-BNCT el CT fue del 92% y la diferencia con el control GB-10-BNCT fue altamente significativa ( $p < 0,0001$ ). En el caso de las remisiones completas (RC), el valor de 30% de EP tardía /GB-10-BNCT fue significativamente mayor que el valor de 6% de GB-10-BNCT ( $p = 0,0244$ ). Asimismo, el valor de RC de 46% de EP temprana/GB-10-BNCT fue significativamente mayor que el valor de 6% del control GB-10-BNCT sin EP ( $p = 0,0001$ ).

Comparando cada protocolo BNCT con su correspondiente protocolo de Solo Haz para evaluar el efecto de la radiación de fondo, se observó que si bien el CT de EP tardía /GB-10-BNCT de 70% fue mayor que el CT de 50% de Solo Haz + EP tardía, esta diferencia no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, en el caso de EP temprana/GB-10-BNCT,

el CT de 92% fue significativamente mayor que el CT de 38% de Solo Haz + EP temprana ( $p < 0,0001$ ). En cuanto a las remisiones completas (RC), el valor de 30% de EP tardía/GB-10-BNCT no fue significativamente mayor que el valor de RC de 19% de Solo Haz + EP tardía. Sin embargo, el valor de RC de 46% de EP temprana/GB-10-BNCT fue significativamente mayor que el valor de RC de 10% de Solo Haz + EP Temprana ( $p = 0,0027$ ).

Se compararon los protocolos de BNCT+EP con el protocolo de Solo EP para evaluar el aporte a la respuesta de la EP sola, como único tratamiento. El CT de 70% en el caso de EP tardía /GB-10-BNCT y el CT de 92 % en el caso de EP temprana/GB-10-BNCT, fueron significativamente mayores que el CT de 33% del grupo solo EP ( $p = 0,0093$  y  $p < 0,0001$ , respectivamente). En cuanto a las remisiones completas (RC), el valor de 30% de EP tardía/GB-10-BNCT fue significativamente más alto que el de 8% de solo EP ( $p = 0,0324$ ). Asimismo, el valor de 46% de EP temprana/GB-10-BNCT fue significativamente más alto que el de 8% de solo 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 Solo 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 Solo Haz) mostró casos de remisiones completas.

Considerando los valores de respuesta tumoral discriminando por tamaño tumoral en el momento de la irradiación (Tabla 2B), se observan diferencias cuando se consideran los tumores chicos (C) o los tumores medianos + grandes (M+G). El valor de CT para tumores chicos de 83% de EP tardía/GB-10-BNCT fue significativamente mayor que el correspondiente valor de CT de 40% para GB-10-BNCT ( $p = 0,0473$ ). Sin embargo, para estos mismos protocolos los valores de CT fueron similares en el caso de tumores medianos + grandes. En el caso de EP temprana/GB-10-BNCT, el valor de CT de 88% para tumores chicos fue significativamente mayor que el correspondiente valor de 40% para GB-10-BNCT ( $p = 0,0030$ ). 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 GB-10-BNCT a 50% para EP tardía/GB-10-BNCT ( $p = 0,0237$ ) y a 65% para EP temprana/GB-10-BNCT ( $p = 0,0003$ ).

Se comparó cada protocolo BNCT con su correspondiente protocolo de Solo Haz 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 EP tardía/GB-10-BNCT, el CT de los tumores chicos de 83% fue mayor que el correspondiente valor de 43% de Solo Haz + EP tardía. 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 EP temprana/GB-10-BNCT, el CT fue significativamente mayor comparado con Solo Haz + EP temprana, tanto para los tumores chicos (88% vs 32%,  $p < 0,0001$ ) como para los medianos + grandes (95% vs 50%, 0,0088). En cuanto a las remisiones completas (RC) en tumores chicos, los valores de EP tardía/GB-10-BNCT fueron similares a los del correspondiente grupo Solo Haz + EP tardía (50% vs 43%). Sin embargo, en las RC de tumores chicos de EP temprana/GB-10-BNCT, el valor de 65% fue significativamente mayor que el correspondiente valor de 18% ( $p = 0,0014$ ).

Discriminando por volumen tumoral, se compararon los protocolos de BNCT+EP con el protocolo de solo EP para evaluar el aporte a la respuesta de la EP como único tratamiento. En el caso del protocolo EP tardía /GB-10-BNCT, el CT fue mayor que para solo 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 EP temprana/GB-10-BNCT, el CT fue significativamente mayor que para solo EP tanto para los tumores chicos (88% vs 36%,  $p = 0,0006$ ) como para los medianos + grandes (95% vs 33%, 0,0001). En las remisiones completas (RC) de tumores chicos, el valor de 50% para EP tardía/GB-10-BNCT fue mayor que el valor de 18% para solo EP, pero esta diferencia no alcanzó significancia estadística. En el caso de EP temprana/GB-10-BNCT, el valor de RC de tumores chicos de 65% fue significativamente mayor que el correspondiente valor de 18% para EP ( $p = 0,0042$ ).

De acuerdo a los resultados obtenidos de respuesta tumoral se puede concluir que tanto la electroporación temprana como la electroporación tardía mejoran la eficacia terapéutica de GB-10-BNCT. Sin embargo, este efecto es más evidente con la electroporación temprana (Fig. 19). 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 GB-10-BNCT + EP.

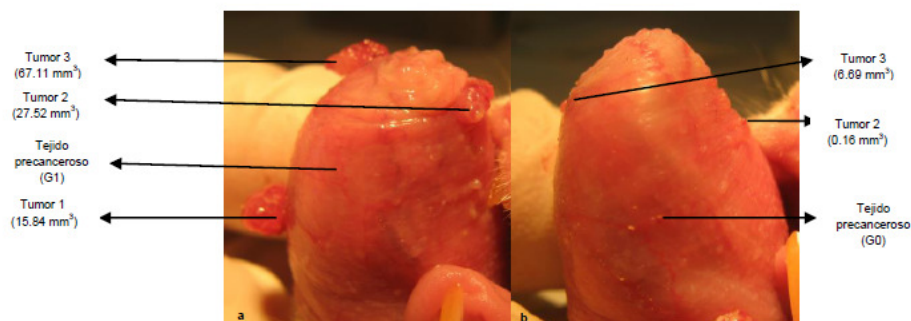


Fig. 19 Imagen macroscópica de la bolsa de la mejilla del hámster cancerizada con DMBA. (a) Pre-tratamiento, con tumores (T1, T2 y T3) rodeados de tejido precanceroso con mucositis Grado 1. (b) 28 días post Protocolo EP temprana/BNCT GB-10 (P2I), exhibiendo RC del T1 y RP de los T2 y T3, rodeados de tejido precanceroso de grado 0.

### 3.3.2 Resultados de radiotoxicidad (mucositis)

La Tabla 3 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.

Protocolo	n	Mucositis Máxima post irradiación			Mucositis 28 días post irradiación		
		G0-G2	G3	G4-G5	G0-G2	G3	G4-G5
EP tardía + BNCT-GB-10	5	100%			100%		
EP temprana + BNCT-GB-10	9	89%	11%		100%		
Solo EP	5	100%			100%		
BNCT-GB-10	4	100%			100%		
Solo Haz	6	100%			100%		
EP tardía +Solo Haz	5	100%			100%		
EP temprana +Solo Haz	5	80%		20%	100%		

Tabla 3. Tabla de porcentajes de mucositis de distintos protocolos de EP combinada con BNCT/GB-10 y protocolos control clasificada en Mucositis Máxima post-irradiación y Mucositis 28 días post-irradiación (n:número de hámsters; G0-G2: mucositis leve, G3: mucositis moderada y G4-G5: mucositis severa).

Ninguno de los protocolos ensayados indujo mucositis severa en tejido precanceroso. 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 la EP + GB-10-BNCT no induce mucositis severa en tejido precanceroso. Este hallazgo tiene gran relevancia clínica ya que el aumento en eficacia terapéutica logrado con EP + GB-10-BNCT vs GB-10-BNCT no está asociado a un efecto tóxico indeseable.

### 3.4 Discusión

En éste trabajo se comprobó 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. Los valores de CT (RC+RP) en general de los dos protocolos de BNCT + EP a los dos tiempos ensayados para la aplicación de la EP (temprano y tardío respecto de la administración del compuesto borado GB-10), fueron mayores que el control tumoral

de BNCT-GB-10. Pero cabe destacar que en con EP temprana+BNCT-GB-10 el control tumoral fue de 92%, significativamente mayor que el control de BNCT-GB-10 de 48% ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, en el caso de EP tardía + BNCT-GB-10 si bien el control tumoral fue mayor que con BNCT-GB-10, la diferencia fue estadísticamente significativa (70% vs 48%,  $p = 0,1708$ ). En particular, se observó un aumento de las RC de los tumores chicos, tanto con el protocolo EP temprana+BNCT-GB-10 (65%) y EP tardía+BNCT-GB-10 (50%) en comparación con el protocolo BNCT-GB-10 (7%). Pero con el protocolo EP temprana, a diferencia del tardío, también se observó un aumento significativo con los controles Solo EP (18%) y Solo Haz + EP temprana (18%). Para el caso del CT en los tumores medianos y grandes, el protocolo EP tardía+BNCT-GB-10 no aumentó significativamente la respuesta vs los controles BNCT-GB-10, Solo EP y Solo Haz + EP tardía. Por el contrario, con el protocolo EP temprana + BNCT-GB-10 se observaron aumentos significativos del CT de tumores medianos y grandes (95%) respecto de los controles BNCT-GB-10 (56%), Solo EP (33%) y Solo Haz + EP temprana (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 este modelo 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 EP temprana+BNCT-GB-10 en el modelo de cáncer oral en hamsters, 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% (EP temprana+BNCT-GB-10). En particular, el CT para los tumores chicos con BNCT-BPA vs EP temprana+BNCT-GB-10 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 EP temprana+BNCT-GB-10 (95%) en comparación al tratamiento BNCT-BPA (61%). Las remisiones completas de los tumores chicos aumentó del 49% con BNCT-BPA a 65% con EP temprana+BNCT-GB-10. Este aumento en eficacia terapéutica de EP temprana+BNCT-GB-10 vs BNCT-BPA se asoció a una ventajosa reducción en la mucositis en tejido precanceroso de 80% Grado 3-4 con BNCT-BPA a 11% Grado 3 con EP temprana+BNCT-GB-10.

Podemos concluir con éstos 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 EP temprana+GB-10 realizados en éste trabajo final (Capítulo 2). En ellos, se observó un aumento significativo en la captación de B en tumor con el protocolo EP temprana + GB-10 vs el protocolo GB-10 sin EP. Además, estos resultados coinciden con los obtenidos por la técnica de autorradiografía neutrónica mostrados previamente (Capítulo 2), en los cuales la microdistribución del boro en el tumor indica, a nivel cualitativo, una mayor densidad de trazas en comparación con el protocolo GB-10. 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 explicaría el aumento de las respuestas tumorales luego del tratamiento con EP temprana +BNCT-GB-10.

## Conclusiones y Discusión Final

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.

Dado que 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, la comunidad internacional ha realizado y continúa realizando importantes esfuerzos para desarrollar y sintetizar el compuesto borado “ideal”. Sin embargo, hasta la fecha, solamente BPA, BSH y GB-10 han sido aprobados para su uso en humanos. Si se identifica un compuesto borado prometedor a partir de estudios *in vitro*, deberá transitar un largo y costoso camino hasta, en el mejor de los casos, ser aprobado para su uso en humanos. 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 de “mesada a la cama del paciente” típicamente lleva 10 años y cuesta más que 1000 millones de dólares (Paul et al., 2010).

En este contexto, una excelente estrategia de corto y mediano plazo es desarrollar métodos que permitan la optimización de BNCT empleando compuestos aprobados para su uso en humanos. El conocimiento generado también podrá ser aplicado a nuevos compuestos borados en un futuro. Gran parte de los esfuerzos de nuestro grupo se han orientado en este sentido. Usando los modelos de cáncer y precancer oral de la bolsa de la mejilla del hámster demostramos el beneficio terapéutico, sin costo en términos de mucositis en el tejido precanceroso, de diversas estrategias tales como la combinación de los compuestos borados BPA y GB-10 (ej. Trivillin et al., 2004, 2006; Pozzi et al., 2009), BNCT Secuencial (Molinari et al., 2011), normalización de los vasos sanguíneos aberrantes del tumor previo a la administración de BPA para BNCT (Molinari et al., 2012 a, b) y la doble aplicación de BNCT (Monti Hughes et al., 2011, 2013).

En este trabajo final exploramos la capacidad de la electroporación de mejorar la incorporación de GB-10 a tumor previo a la irradiación con neutrones para BNCT. Como fuera descrito anteriormente, tanto la electroporación como el compuesto borado GB-10 están aprobados para su uso en humanos. Demostramos que la electroporación aumenta la eficacia terapéutica de BNCT mediado por GB-10 sin costo en términos de mucositis en el tejido precanceroso limitante de dosis. En particular, la electroporación aplicada 10 minutos después de la administración intravenosa de GB-10, aumenta el control tumoral de 48% con GB-10-BNCT a 92% con GB-10-BNCT + Electroporación, con un aumento en remisiones completas de los tumores chicos de 7% a 65%. Los estudios de biodistribución

y de autorradiografía neutrónica sugerirían que este aumento en eficacia terapéutica estaría dado por un aumento en la entrada de GB-10 a las células tumorales y mejoras en la microdistribución de boro en cuanto a homogeneidad en el “targeting” de boro en tumor y a la localización preferencial de GB-10 en parénquima tumoral respecto a estroma.

La reciente iniciación de ensayos clínicos de BNCT empleando aceleradores como fuente de neutrones instalados en hospitales favorecería la realización de nuevos y más numerosos ensayos clínicos de BNCT para diversas patologías. En ese marco, los estudios de BNCT *in vivo* diseñados para optimizar el “targeting” de boro empleando compuestos aprobados para su uso en humanos, cobran particular relevancia.

## Referencias

**Achilli C**, Jadhav SA, Guidetti GF, Ciana A, Abbonante V, Malara A, Fagnoni M, Torti M, Balduini A, Balduini C, Minetti G. 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.* 2014;83(5):532-40.

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

**Al-Madhoun AS**, Johnsamuel J, Barth RF, Tjarks W, Eriksson S. Evaluation of human thymidine kinase 1 substrates as new candidates for boron neutron capture therapy. *Cancer Res.* 2004; 64(17):6280-6.

**Azab AK**, Srebnik M, Doviner V, Rubinstein A. Targeting normal and neoplastic tissues in the rat jejunum and colon with boronated, cationic acrylamide copolymers. *J Control Release.* 2005; 106(1-2):14-25.

**Azavedo E**, Svane G, Nordenstrom B. Radiological evidence of response to electrochemical treatment of breast cancer, *Clin Radiol.* 1991; 33:84-87.

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

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

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

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

**Baskar R**, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012; 9(3):193-9.

**Bayanov B**, Burdakov A, Chudaev V, Ivanov A, Konstantinov S, Kuznetsov A, Makarov A, Malyshkin G, Mekler K, Sorokin I, Sulyaev Y, Taskaev S. First neutron generation in the BINP accelerator based neutron source. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl):S285-7.

**Bennet** BD, Zha XH, Gay I and Morrison GM. Intracellular boron localization and uptake in the cell cultures using imaging secondary ion mass spectrometry (ion microscopy) for neutron capture therapy for cancer. *Biol Cell*. 1992; 74: 105-8.

**Bennet** BD, Mumford-Zisk J, Coderre JA and Morrison GM. Subcellular localization of pboronophenylalanine-delivered boron-10 in the rat 9l gliosarcoma, cryogenic preparation in vitro and in vivo. *Radiat Res*. 1994; 140: 72-8.

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

**Brennan** M, Svehla G. Flow injection determination of boron, copper, molybdenum, tungsten and zinc in organic matrices with direct current plasma optical emission spectrometry Fresenius. *J. Anal. Chem*. 1989; 335:893–899.

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

**Busse** PM, Harling OK, Palmer MR, Kiger III WS, Kaplan J, Kaplan I, Chuang CF, Goorley JT, Riley KJ, Newton TH, Santa Cruz GA, Lu X-Q, Zamenhof RG. A critical examination of the results from the Harvard-MIT NCT program phase I clinical trial of neutron capture therapy for intracranial disease. *J Neuro-Oncol*. 2003; 62:111-121.

**Byvaltsev** V, Kanygin V, Belykh E, Taskaev S. Prospects in boron neutron capture therapy of brain tumors. *World Neurosurg*. 2012; 78(1-2): 8-9.

**Carmeliet** P y Jain. RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407: 249-64.

**Campana** L, Mocellin S, Basso M, Puccetti O, Salvo GD, Chiarion-Sileni V, Vecchiato A, Corti L, Rossi C, Nitti D. Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients, *Ann Surg Oncol*. 2009; 16 (1)191-199.

**Capuani** S, Gili T, Bozzali M, Russo S, Porcari P, Cametti C, D'Amore E, Colasanti M, Venturini G, Maraviglia B, Lazzarino G, Pastore FS. L-DOPA preloading increases the uptake of borophenylalanine in C6 glioma rat model: a new strategy to improve BNCT efficacy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008; 72(2): 562-7.

**Ceberg** CP, Brun A, Mir LM, Persson BR, Salford LG. Enhanced boron uptake in RG 2 rat gliomas by electropermeabilization in vivo--a new possibility in boron neutron capture therapy. *Anticancer Drugs*. 1994; 5(4):463-6.

**Cemazar** M1, Skrk J, Mitrovic B, Sersa G. Changed delivery of boron to tumours using electroporation for boron neutron capture therapy with BSH. *Br J Radiol*. 2000 ;73(866):195-200

**Chanana AD**, Capala J, Chadha M, Coderre JA, Diaz AZ, Elowitz EH, Iwai J, Joel DD, Liu HB, Ma R, Pendzick N, Peress NS, Shady MS, Slatkin DN, Tyson GW, Wielopolski L. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: interim results from the phase I/II dose-escalation studies. *Neurosurgery*. 1999; 44(6):1182-92.

**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.) pp. 315-20. Elsevier, Lausanne.

**Chaveli-López B**. Oral toxicity produced by chemotherapy: A systematic review. *J Clin Exp Dent*. 2014; 6(1):e81-90.

**Chen YK**, Lin LM. DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010; 10(9): 1485-96.

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

**Coderre JA**, Glass JD, Fairchild RG, Roy U, Cohen S, Frand I. Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for boron neutron capture therapy. *Cancer Res*. 1987; 47(23): 6377-83.

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

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

**Das DC**, Thapa P, Karki R, Schinke C, Das S, Kambhampati S, Banerjee SK, Van Veldhuizen P, Verma A, Weiss LM, Evans T. Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future Med Chem*. 2013; 5(6): 653–676.

**Diaz A**, Stelzer K, Laramore G, Wiersema R. Pharmacology studies of Na<sup>210</sup>B<sup>10</sup>H<sub>10</sub> (GB-10) in human tumor patients. In: M.W. Sauerwein, R. Moss and A. Wittig, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division. 2002; p. 993–9.

**Diaz A**. Assessment of the results from the Phase I/II boron neutron capture therapy trials at the Brookhaven National Laboratory from a clinician's point of view. *J Neuro-Oncol*. 2003; 62:101-109.

**Domanico R**, Trapasso S, Santoro M, Pingitore D, Allegra E. 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.* 2015; 9:1185-91.

**Evans** EH, Caruso JA. Low pressure inductively coupled plasma source for mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 1993; 8 427–431.

**Evstigneeva** RP, Zaitsev AV, Luzgina VN, Shevskaya VA, Shtil AA. Carboranylporphyrins for boron neutron capture therapy of cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2003 ;(6):383-92.

**Fang** Y, Guo S, Li D, Zhu C, Ren W, Dong S, Wang E. Easy synthesis and imaging applications of cross-linked green fluorescent hollow carbonnanoparticles. *ACS Nano.* 2012; 6(1):400-9.

**Farhat** A, Ahmad F, Arafat H. Analytical techniques for boron quantification supporting desalination processes: A review. *Desalination.* 2013; 310:9–17.

**Feng** B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kirihata M, Matsui H. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials.* 2009; 30(9): 1746-55.

**Fleischer**, R.L., Price, P., Walker, R.M. Basicsoftracketching. In: *Nuclear Tracks in Solids.* Berkeley, University of California Press 1975.

**Fujii** H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM. Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. *Radiat Oncol.* 2011; 6: 8.

**Fukuda** M, Oka M, Soda H, Terashi K, Kawabata S, Nakatomi K, Takatani H, Tsurutani J, Tsukamoto K, Noguchi Y, Fukuda M, Kinoshita A, Kohno S. Phase I study of irinotecan combined with carboplatin in previously untreated solid cancers. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(12):3963-9.

**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. Biodistribution of sodium borocaptate (BSH) for boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model. *Radiat Environ Biophys.* 2013; 52(3):351-61.

**Garabalino** MA, Heber EM, Monti Hughes A, Pozzi ECC, Molinari AJ, Nigg DW, Bauer W, Trivillin VA, Schwint AE. Boron biodistribution for BNCT in the hamster cheek pouch oral cancer model: Combined administration of BSH and BPA. *Appl Radiat Isot.* 2014; 88:64-68.

**Garabalino**, M.A., Olaiz, N., Pozzi, E.C.C., Thorp, S., Curotto, P., Itoiz, M.E., Aromando, R., Portu, A., Saint Martin, G., Monti Hughes, A., Trivillin, V. A., Marshall G., Schwint A.E. 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. Asociación Argentina de Tecnología Nuclear (AATN) XLI Reunión Anual, Buenos Aires-Argentina.

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

**Gimbel MI**, Delman KA, Zager JS. Therapy for unresectable recurrent and in-transit extremity melanoma. *Cancer Control.* 2008;15(3):225-32.

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

**González SJ y Santa Cruz GA.** The Photon-Isoeffective Dose in Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat Res.* 2012; 178:609-621.

**Goszczyński TM**, Kowalski K, Leśnikowski ZJ, Boratyński J. Solid state, thermal synthesis of site-specific protein-boron cluster conjugates and their physicochemical and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(2):411-8.

**Haapaniemi A**, Kankaanranta L, Koivunoro H, Saarilahti K, Mäkitie A, Atula T, Joensuu H. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in the Management of Recurrent Laryngeal Cancer. 2014. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland.

**Hartman T**, Carlsson JJ. Radiation dose heterogeneity in receptor and antigen mediated boron neutron capture therapy. *Radiother Oncol.* 1994; 31(1): 61-75.

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

**Heber E**, Trivillin VA, Nigg D, Kreimann EL, Itoiz ME, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE. Biodistribution of GB-10 (Na<sup>210</sup>B<sup>10</sup>H<sup>10</sup>) compound for boron neutron capture therapy (BNCT) in an experimental model of oral cancer in the hamster cheek pouch. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(4):313-24.

**Heber EM**, Trivillin VA, Nigg DW, Itoiz ME, Gonzalez BN, Rebagliati RJ, Batistoni D, Kreimann EL, Schwint AE. Homogeneous boron targeting of heterogeneous tumors for boron neutron capture therapy (BNCT): chemical analyses in the hamster cheek pouch oral cancer model. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(10): 922-9.

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

**Heber** EM, Kueffer PJ, Lee MW Jr, Hawthorne MF, Garabalino MA, Molinari AJ, Nigg DW, Bauer W, Monti Hughes A, Pozzi EC, Trivillin VA, Schwint AE. Boron delivery with liposomes for boron neutron capture therapy (BNCT): biodistribution studies in an experimental model of oral cancer demonstrating therapeutic potential. *Radiat Environ Biophys.* 2012; 51(2): 195-204.

**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. Therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy mediated by boron-rich liposomes for oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(45):16077-81.

**Hellevik** T, Martinez-Zubiaurre I. Radiotherapy and the tumor stroma: the importance of dose and fractionation. *Front Oncol.* 2014; 4:1.

**Hopewell** JW, Morris GM, Schwint A, Coderre JA. The radiobiological principles of boron neutron capture therapy: a critical review. *Appl Radiat Isot* 69(12):1756-1759, (2011).

**Hopewell** JW, Morris GM, Schwint A, Coderre JA. The radiobiological principles of boron neutron capture therapy: a critical review. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12):1756-9.

**Horiguchi** H, Sato T, Kumada H, Yamamoto T, Sakae T. Estimation of relative biological effectiveness for boron neutron capture therapy using the PHITS code coupled with a microdosimetric kinetic model. *Journal of Radiation Research.* 2015; 56:382-390.

**Horn** V, Slánský J, Buchar E, Janku I, Sourek K, Tovarýs F. The diuretic effect of borocaptate sodium in rats and in patients with brain tumors *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1997; 19(8):559-66.

<http://www.who.int>

<http://www.msal.gov.ar>

<http://bnct.kek.jp/eng/target.html>

<http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>

<http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-plasma-icp-oes>

**Iffland** D, Grunewald C, Schütz C, Kratz JV, Langguth P, Hampel G. Determination of boron concentration in liver and colon cancer cells after trans-stimulation with L-tyrosine. 2011. Proceedings of 6th Young Researchers BNCT Meeting, Hsinchu, Taiwan.

**Jankú** I, Buchar E, Jiricka Z. Nephrotoxicity of borocaptate after short-term administration in rabbits. *Toxicology.* 1993; 79(2):99-108.

**Jham** BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006; 72(5): 704-8.

**Kabalka** GW, Yao ML, Marepally SR, Chandra S. Biological evaluation of boronated unnatural amino acids as new boron carriers. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl):S374-9.

**Kageji** T, Nagahiro S, Otersen B, Gabel D, Nakaichi M, Nakagawa Y. Subcellular biodistribution of sodium borocaptate (BSH: Na<sup>2</sup>B<sup>12</sup>H<sup>11</sup>SH) in a rat glioma model in boron neutron capture therapy. *J Neurooncol.* 2002; 59(2):135-42.

**Kageji** T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H. Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12):1823-5.

**Kageji** T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H. Correlation between radiation dose and histopathological findings in patients with glioblastoma treated with boron neutron capture therapy (BNCT). *Appl Radiat Isot.* 2014; 88:20-22.

**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. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 69(2): 475-82.

**Kankaanranta** L, Seppälä T, Koivunoro H, Välimäki P, Beule A, Collan J, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Kotiluoto P, Auterinen I, Serèn T, Paetau A, Saarilahti K, Savolainen S, Joensuu H. L-boronophenylalanine-mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a Phase I study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 80(2):369-76.

**Kankaanranta** L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Välimäki P, Mäkitie A, Seppänen M, Minn H, Revitzer H, Kouri M, Kotiluoto P, Seren T, Auterinen I, Savolainen S, Joensuu H. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/ II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012; 82(1):e67-75.

**Kato** I, Ono K, Sakurai Y, Ohmae M, Maruhashi A, Imahori Y, Kirihata M, Nakazawa M, Yura Y. Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot.* 2004; 61(5):1069-73.

**Kato** I, Fujita Y, Ohmae M, Sakurai Y, Suzuki M, Murata I, Horiike H, Sumi T, Iwai S, Nakazawa M, Yoshiaki Yura and Ono K. Boron Neutron Capture Therapy in Patients with Recurrent Head and Neck Cancers Who Have No Other Treatment Options. 2014. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland.

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

**Kononov O**, Bokhovko M, Kononov V, Glotov A, Sevastianov V. Results of Multipurpose KG-2,5 Accelerator Based Neutron Source Certification and Measured Epithermal Neutron Source Characteristics. 2010. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010 (Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy)*, Buenos Aires, Argentina.

**Kotnik T**, Kramar P, Pucihar G, Miklavcic D, Tarek M. Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. *Electrical Insulation Magazine, IEEE*. 2012; 28(5):14–23.

**Kreimann EL**, Itoiz ME, Dagrosa A, Garavaglia R, Farías S, Batistoni D, Schwint AE. The hamster cheek pouch as a model of oral cancer for boron neutron capture therapy studies: selective delivery of boron by boronophenylalanine. *Cancer Res*. 2001a; 61(24):8775-81.

**Kreimann EL**, Itoiz ME, Longhino J, Blaumann H, Calzetta O, Schwint AE. Boron neutron capture therapy for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Cancer Res*. 2001b; 61(24):8638-42.

**Kreiner AJ**, Castell W, Di Paolo H, Baldo M, Bergueiro J, Burlon AA, Cartelli D, Vento VT, Kesque JM, Erhardt J, Ilardo JC, Valda AA, Debray ME, Somacal HR, Sandin JC, Igarzabal M, Huck H, Estrada L, Repetto M, Obligado M, Padulo J, Minsky DM, Herrera M, Gonzalez SJ, Capoulat ME. Development of a Tandem-Electrostatic-Quadrupole facility for Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy. *Appl Radiat Isot*. 2011; 69(12):1672-5.

**Kulvik M**, Vähätalo J, Buchar E, Färkkilä M, Järviluoma E, Jääskeläinen J, Kriz O, Laakso J, Rasilainen M, Ruokonen I, Kallio M. Clinical implementation of 4- dihydroxyborylphenylalanine synthesised by an asymmetric pathway. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 18(2):155-63.

**Laramore GE**, Stelzer KJ, Risler R, Schwartz JL, Douglas JJ, Einck JP, Nigg DW, Wemple CA, Hartwell JK, Hawthorne MF. Neutron capture therapy (NCT) enhancement of fast neutron therapy: Application to non small cell lung cancer. 2001. In: *Application of accelerators in research and industry-sixteenth international conference (JL Duggan y IL Morgan, Eds.)* pp 881-884. American Institute of Physics, Denton, TX.

**Liberman SJ**, Dagrosa A, Jiménez Rebagliati RA, Bonomi MR, Roth BM, Turjanski L, Castiglia SI, González SJ, Menéndez PR, Cabrini R, Roberti MJ, Batistoni DA. Biodistribution studies of boronophenylalanine-fructose in melanoma and brain tumor patients in Argentina. *Appl Radiat Isot*. 2004; 61(5):1095-100.

**Lorimore SA**, Coates PJ, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003; 22(45):7058-69.

**Luderer MJ**, de la Puente P, Azab AK. Advancements in Tumor Targeting Strategies for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm Res*. 2015; 32(9):2824-36.

**Marty M**, Sersa G, Garbary J, et al..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". 2006; 4,3-13.

**Masunaga S**, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Liu Y, Kondo N, Maruhashi A, Kinashi Y, Ono K. Effects of employing a 10B-carrier and manipulating intratumour hypoxia on local tumour response and lung metastatic potential in boron neutron capture therapy. Br J Radiol. 2012; 85(1011):249-58.

**Menéndez PR**, Roth BM, Pereira MD, Casal MR, González SJ, Feld DB, Santa Cruz GA, Kessler J, Longhino J, Blaumann H, Jiménez Rebagliati R, Calzetta Larrieu OA, Fernández C, Nievas SI , Liberman SJ. BNCT for skin melanoma in extremities: updated Argentine clinical results. Appl Radiat Isot. 2009; 67(7-8 Suppl):S50-3.

**Mevio N**, Bertino G, Occhini A, Scelsi D, Tagliabue M, Mura F, Benazzo M. Electrochemotherapy for the treatment of recurrent head and neck cancers: preliminary results. Tumori. 2012; 98(3):308-13.

**Michiue H**, Sakurai Y, Kondo N, Kitamatsu M, Bin F, Nakajima K, Hirota Y, Kawabata S, Nishiki T, Ohmori I, Tomizawa K, Miyatake S, Ono K, Matsui H. The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide. Biomaterials. 2014; 35(10):3396-405.

**Miller M**, Quintana J, Ojeda J, Langan S, Thorp S, Pozzi E, Sztejnberg M, Estryk G, Nosal R, Saire E, Agrazar H, Graiño F. New irradiation facility for biomedical applications at the RA-3 reactor thermal column. Appl Radiat Isot. 2009; 67(7-8 Suppl): S226-9.

**Mir L**, Orłowski S, Mechanisms of electrochemotherapy, Adv Drug Deliv Rev 35.1999; 107-118.

**Mir LM**. Bases and rationale of the electrochemotherapy. European Journal of Cancer Supplements. 2006; 4:38-44.

**Mishima Y**, Ichihashi M, Hatta S, Honda C, Yamamura K, Nakagawa T. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma. Melanogenesis-seeking 10B molecular-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial. Pigment Cell Res. 1989; 2: 226-34.

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

**Molinari AJ**, Pozzi EC, Monti Hughes A, Heber EM, Garabalino MA, Thorp SI, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Quintana J, Santa Cruz GA, Trivillin VA, Schwint AE. "Sequential" boron neutron capture therapy (BNCT): a novel approach to BNCT for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch model. Radiat Res. 2011; 175(4): 463-72.

**Molinari** AJ, Pozzi EC, Monti Hughes A, Heber EM, Garabalino MA, Thorp SI, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Tumor blood vessel "normalization" improves the therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy (BNCT) in experimental oral cancer. *Radiat Res.* 2012 a; 177(1): 59-68. 247

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

**Molinari** AJ, Thorp SI, Portu AM, Saint Martin G, Pozzi EC, Heber EM, Bortolussi S, Itoiz ME, Aromando RF, Monti Hughes A, Garabalino MA, Altieri S, Trivillin VA, Schwint AE. Assessing advantages of sequential boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model with normalized blood vessels. *Acta Oncol.* 2014 ; 1:99-106.

**Molinari** AJ, Thorp SI, Portu AM, Saint Martin G, Pozzi EC, Heber EM, Bortolussi S, Itoiz ME, Aromando RF, Monti Hughes A, Garabalino MA, Altieri S, Trivillin VA, Schwint AE. Assessing advantages of sequential boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model with normalized blood vessels. *Acta Oncol.* 2015; 54(1):99-106.

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

**Monti Hughes** A, Pozzi E, Thorp S, Garabalino M, Farías R, González S, Heber E, Itoiz M, Aromando R, Molinari A, Miller M, Nigg D, Curotto P, Trivillin V, Schwint A. Boron Neutron Capture Therapy for oral precancer: proof of principle in an experimental animal model. *Oral Dis.* 2013; 19(8):785-95.

**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. Histamine reduces boron neutron capture therapy-induced mucositis in an oral precancer model. *Oral Dis.* 2015; 21(6):770-7

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

**Moss** RL. Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) *Appl Radiat Isot.* 2014; 88:2-11.

**Nakai** K, Yamamoto T, Aiyama H, Takada T, Yoshida F, Kageji T, Kumada H, Isobe T, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A. Boron

neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma: a recursive partitioning analysis of BNCT patients. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12):1790-2.

**Nakanishi A**, Guan L, Kane RR, Kasamatsu H, Hawthorne MF. Toward a cancer therapy with boron-rich oligomeric phosphate diesters that target the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci .US A* .1999; 96:238-41.

**Ono K**, Kinashi Y, Masunaga S, Suzuki M, Takagaki M. Electroporation increases the effect of borocaptate (10B-BSH) in neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998 ;42(4):823-6.

**Ono K**, Masunaga S, Suzuki M, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M. The combined effect of boronophenylalanine and borocaptate in boron neutron capture therapy for SCCVII tumors in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999; 43(2): 431-6.

**Ono K**, Kinashi Y, Suzuki M, Takagaki M, Masunaga S. The Combined Effect of Electroporation and Borocaptate in Boron Neutron Capture Therapy for Murine Solid Tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000; 91, 853–858.

**Papaspyrou M**, Feinendegen LE, Müller-Gärtner HW. Preloading with L-tyrosine increases the uptake of boronophenylalanine in mouse melanoma cells. *Cancer Res.*1994; 54(24):6311-4.

**Paul SM**, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR , Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2010; vol. 9, pp. 203-14.

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

**Portu, A.**, Carpano, M., Dagrosa, A., Cabrini, R.L., Saint Martin, G. Qualitative autoradiography with polycarbonate foils enables histological and track analyses on the same section. *BiotechHistochem.* 2013; 88(5):217-221.

**Portu, A.**, Molinari, A.J., Thorp, S.I., Pozzi, E.C.C., Curotto, P., Schwint, A.E., Saint Martin, G. Neutron autoradiography to study boron compound microdistribution in an oral cancer model. *Int J Radiat Biol.* 2015; 91(4): 329–335.

**Pozzi E**, Nigg DW, Miller M, Thorp SI, Heber EM, Zarza L, Estryk G, Monti Hughes A, Molinari AJ, Garabalino M, Itoiz ME, Aromando RF, Quintana J, Trivillin VA, Schwint AE. Dosimetry and radiobiology at the new RA-3 reactor boron neutron capture therapy (BNCT) facility: application to the treatment of experimental oral cancer. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl): S309-12.

**Rao M**, Trivillin VA, Heber EM, Cantarelli M de L, Itoiz ME, Nigg DW, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE. BNCT of 3 cases of spontaneous head and neck cancer in feline patients. *Appl Radiat Isot.* 2004; 61(5): 947-52.

**Ruiz-Esquide G**, Nervi B, Vargas A, Maíz A. Treatment and prevention of cancer treatment related oral mucositis. *Rev Med Chil.* 2011; 139(3): 373-81.

**Sah R**, Brown P. Boron determination: a review of analytical methods. *Microchem. J.* 1997; 56:285–304.

**Salford LG**, Persson BR, Brun A, Ceberg CP, Kongstad PC, Mir LM. A new brain tumour therapy combining bleomycin with in vivo electroporation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 ; 194(2):938-43

**Santa Cruz GA**. Reporte General Proyecto BNCT año 2014. Depto Coordinación BNCT, G Quím Nuclear y Cs de la Salud, GAATEN, CNEA.

**Sersa G**, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D, Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(3):863-7.

**Sersa G**, Miklavcic D. Electrochemotherapy of tumours. *J Vis Exp.* 2008;22.

**Sheppard BS**, Caruso JA. Plasma mass spectrometry: consider the source. Invited lecture, *J. Anal. At. Spectrom.* 1994; 9: 145–149.

**Shih A**, Miaskowski C, Dodd MJ, Stotts NA, MacPhail L. Mechanisms for radiation-induced oral mucositis and the consequences. *Cancer Nurs.* 2003; 26(3): 222-9.

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

**Smilowitz HM**, Slatkin DN, Micca PL, Miura M. Microlocalization of lipophilic porphyrins: non-toxic enhancers of boron neutron-capture therapy. *Int J Radiat Biol.* 2013; 89(8):611-7.

**Smith DR**, Chandra S, Coderre JA, Morrison GH. Ion microscopy imaging of <sup>10</sup>B from pboronophenylalanine in a brain tumor model for boron neutron capture therapy. *Cancer Res.* 1996; 56: 4302–6.

**Smith DR**, Chandra S, Coderre JA, Barth RF, Yang W, Liu L, Wilson JL, Micca PL, Nawrocky MM, Rotaru JH, Morrison GH. Quantitative ion microscopy imaging of Boron-10 in rat brain tumors models for BNCT. 1997. In: *Advances in Neutron Capture Therapy. Vol II, Chemistry and Biology* (B. Larsson, J. Cranford and R. Weinreich, Eds.) pp. 308-14. Elsevier, Lausanne.

**Snyder** HR, Reedy AJ, Lennarz WJ. Synthesis of aromatic boronic acids. Aldehyde boronic acids and boronic acid analog of tyrosine. *J Am Chem Soc.* 1958; 80: 835-8.

**Sonis** ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, Login G, Ymamkawa M, Moses G, Bouchard P, Hayes LL, Bedrosian C, Dorner AJ. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol.* 2000; 36(4): 373-81.

**Sonis** ST. Pathobiology of Oral Mucositis: Novel Insights and Opportunities. *J Support Oncol.* 2007; 5: 3-11.

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

**Stelzer** KJ, Gavin PR, Risler R, Kippenes H, Hawthorne MF, Nigg DW, Laramore GE. Boron neutron capture-enhanced fast neutron therapy (BNC/FNT) for non-small cell lung cancer in canine patients. 2001. In: Hawthorne MF, editor. *Frontiers in neutron capture therapy.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p.735-9.

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

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

**Tanaka** T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011; Volume 2011, Article ID 603740, 10 pages.

**Taniyama** K, Fujiwara H, Kuno T, Saito N, Shuntoh H, Sakane M, Tanaka C. Acute and subacute toxicity of 10B-paraboronphenylalanine. *Pigment Cell Res.* 1989; 2(4): 291-6.

**Tozon** N, Pavlin D, Sersa G, Dolinsek T, Cemazar M. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2014; Vol. 16(4) 291–299.

**Trivillin** VA, Heber EM, Itoiz ME, Nigg D, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE. Radiobiology of BNCT mediated by GB-10 and GB-10+BPA in experimental oral cancer. *Appl Radiat Isot.* 2004; 61(5): 939-45.

**Trivillin** VA, Heber EM, Nigg DW, Itoiz ME, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE. Therapeutic success of boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by a chemically non-selective boron agent in an experimental model of oral cancer: a new paradigm in BNCT radiobiology. *Radiat Res.* 2006; 166(2):387-96.

**Trivillin** VA, Heber EM, Rao M, Cantarelli MA, Itoiz ME, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE. Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of spontaneous nasal planum squamous cell carcinoma in felines. *Radiat Environ Biophys.* 2008; 47(1): 147-55.

**Urasa** IT. Determination of arsenic, boron, carbon, phosphorus, selenium, and silicon in natural waters by direct current plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chem.* 1984; 56: 904–908.

**Vairaktaris** E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 2008; 44(4): 315-24.

**Wang** LW, Chen YW, Ho CY, Hsueh Liu YW, Chou FI, Liu YH, Liu HM, Peir JJ, Jiang SH, Chang CW, Liu CS, Wang SJ, Chu PY, Yen SH. Fractionated BNCT for locally recurrent head and neck cancer: experience from a phase I/II clinical trial at Tsing Hua Open-Pool Reactor. *Appl Radiat Isot.* 2014; 88:23-7.

**Wittig** A, Sauerwein WA, Coderre JA. Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res.* 2000; 153(2): 173-80.

**Wittig** A, Michel J, Moss RL, Stecher-Rasmussen F, Arlinghaus HF, Bendel P, Mauri PL, Altieri S, Hilger R, Salvadori PA, Menichetti L, Zamenhof R, Sauerwein WA. Boron analysis and boron imaging in biological materials for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008; 68(1):66-90.

**Wittig** A, Stecher-Rasmussen F, Hilger RA, Rassow J, Mauri P, Sauerwein W. Sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH), a boron carrier that merits more attention. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12): 1760-4.

**Xiong** H, Qi Y, Zhang Z, Zhou D, Jing X, Huang Y. Borane-conjugated poly(ester-carbonate) amphiphilic block copolymers as potential agents for boron neutron capture therapy. *J Control Release.* 2015; 213:e39-40.

**Yamatomo** N, Iwagami T, Kato I, Masunaga S, Sakurai Y, Iwai S, Nakazawa M, Ono K, Yura Y. Sonoporation as an enhancing method for boron neutron capture therapy for squamous cell carcinomas. *Radiation Oncology.* 2013; 8:280.

**Yanagie** H, Kumada H, Nakamura T, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Shinohara A, Fijihara M, Suzuki M, Sakurai Y, Sugiyama H, Kajiyama T, Nishimura R, Ono K, Nakajima J, Ono M, Eriguchi M, Takahashi H. Feasibility evaluation of neutron capture therapy for hepatocellular carcinoma using selective enhancement of boron accumulation in tumour with intra-arterial administration of boron-entrapped water-in-oil-in-water emulsion. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12): 1854-7.

**Yang** Y, Ge J-P, Zhou Z-T. Effects of thalidomide on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster with respect to angiogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38: 455–62.

**Yoshioka** M, Kurihara T, Kobayashi H, Matsumoto H, Matsumoto N, Kumada H, Matsumura A, Sakurai H, Tanaka S, Sugano T, Hashirano T, Nakashima H, Nakamura T, Kiyanagi Y, Hiraga F, Ohba T, Okazaki K. Construction of Accelerator-based BNCT facility at Ibaraki Neutron Medical Research Center. 2014. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland.

**Zonta** A, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Zonta S, Clerici AM, Zonta C, Pinelli T, Fossati F, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Nano R, Barni S, Chiari P, Mazzini G. Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases. JPCS. 2006; 41:484-495.