

UNIVERSIDAD NACIONAL DE GENERAL SAN MARTÍN
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA
INSTITUTO DE TECNOLOGÍA
Prof. Jorge A. Sabato

**Estudio y caracterización de los distintos aspectos físicos para
el tratamiento del cáncer de mama HER2+ y sus metástasis
empleando liposomas como transportadores de boro (*)**

Autor
Ing. Mario Alberto Gadan

Directora
Dra. Sara Josefina González

Co-director
Dr. Manuel Leonardo Sztejnberg Gonçalves-Carralves

(*) Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología
mención Física

República Argentina

2022

A Santiago.

“You can’t always get what you want...”

M. Jagger and K. Richards, del disco Let it Bleed (1969).

Agradecimientos

Esta tesis se forjó bajo el aporte de numerosas personas. Sería en vano el ejercicio de nombrar a todas y cada una de ellas sin cometer la injusticia que trae consigo el olvido, por lo cual ofrezco mis disculpas. A todas ellas, quisiera agradecerles por su generoso aporte, tanto en el plano profesional como en el personal.

No obstante lo dicho, quisiera detenerme en aquellas personas que han sido determinantes en la confección de esta tesis. En primer lugar quiero agradecerles a Julia por su paciencia, comprensión y por haber sido tantas veces mi sostén; a mi madre y a mi padre, por apoyarme siempre e inculcarme el valor del esfuerzo; y a mi hermana, por sus consejos y apoyo incondicional. También les quiero agradecer:

A Marcelo Miller, por darme libertad y confianza en este proyecto, y a Silvia Thorp, porque siempre me alentó en este camino.

A Milena Batalla, Belén Cerda, Julia Gallino, Elena Sanmarco, Florencia Giannoni, Rodrigo Lloyd, Álvaro Conde y María Silvina Olivera, por transmitirme sus conocimientos, por haber colaborado en los diferentes experimentos desarrollados y por haber contestado cada una de mis preguntas con significativa paciencia.

A Isabel Frahm, Aníbal Nuñez de Pierro y Daniel Allemand, quienes con gran dedicación, generosidad y amabilidad, me han ayudado en diferentes aspectos relacionados al trabajo desarrollado en esta tesis.

A Luigi Panza, por su generoso aporte, por haberme recibido siempre de forma tan cálida en cada una de nuestras reuniones y por haber respondido con gran amabilidad cada consulta realizada.

A Saverio Altieri, con quien he compartido hermosas estadías en Pavia y a través de nuestra amistad, siempre me ha transmitido pasión y compromiso por nuestro trabajo.

A Silva Bortolussi, con quien me une tantos momentos preciosos, y además de compartir una entrañable amistad comparto grandes pasiones, siempre ha sabido escucharme y aconsejarme, y cuyo aliento y apoyo fue sustancial.

A Rubén Farías, por su dedicación y sensible paciencia, y por ayudarme en el desarrollo de una importante parte de esta tesis.

A Agustina Portu, por su dedicación y colaboración extrema, y por ayudarme a crecer en nuestro campo de estudio, pero también por lo que más valoro, nuestra profunda amistad.

A Lucía Policastro y a Gustavo Santa Cruz, quienes con gran pasión por su trabajo pusieron a disposición su tiempo y dedicación, y han sido esenciales en la confección de esta tesis.

A Sara y a Manuel, mis directores, que además de estar presentes hasta en los más mínimos detalles durante todo este proceso, me han transmitido en todo momento seguridad y confianza, con una calidez humana que pondero por sobre todo.

Finalmente a Santiago, en quien encuentro la tan ansiada calma, y porque todos los días me recuerda que, después de todo, nada es tan importante.

Índice general

Figuras	XIII
Tablas	XVII
Resumen	XIX
Abstract	XXI
1. Introducción	1
1.1. Marco conceptual	1
1.2. Objetivos y alcances de la tesis	5
1.3. Organización	6
2. Cáncer de mama	9
2.1. Definición y clasificaciones	9
2.2. Epidemiología	12
2.3. Tratamiento	13
2.3.1. Abordaje quirúrgico	14
2.3.2. Rol de la radioterapia en el tratamiento del cáncer de mama	15
2.3.2.1. Radioterapia posmastectomía	17
2.3.2.2. Radioterapia postratamiento conservador	18
2.4. Recaída de la enfermedad	22
2.4.1. Definición y clasificación	22
2.4.2. Recaída local posmastectomía	23
2.4.3. Recaída local postratamiento conservador	24
2.4.4. Recaída regional	26
2.5. Cáncer de mama subtipo HER2+	27
2.5.1. Familia de receptores ErbB. Receptor ErbB2	27
2.5.2. Definición, detección y tratamiento	28
2.5.3. Metástasis en sistema nervioso central	31
3. Estudio de dosimetría computacional	35
3.1. Base racional del presente estudio	35
3.1.1. Casos clínicos identificados y casos de estudio	36
3.2. Conceptos de dosimetría	38

3.2.1. Energía impartida y dosis absorbida	38
3.2.2. Relación entre dosis absorbida y kerma	40
3.3. Dosimetría en el campo mixto de irradiación en BNCT	42
3.3.1. Componentes de dosis	42
3.3.2. Consideraciones radiobiológicas en el cálculo de dosis	43
3.4. Herramientas y estrategia de cálculo	45
3.4.1. Facilidad de irradiación	45
3.4.2. Fantomas antropomórficos computacionales	46
3.4.3. Código computacional de transporte de partículas	47
3.4.4. Programa computacional desarrollado para el análisis dosimétrico	48
3.4.5. Estrategia de cálculo implementada	48
3.5. Análisis dosimétrico computacional	54
3.5.1. Consideraciones sobre el análisis propuesto	54
3.5.2. Caracterización del haz de irradiación	62
3.5.3. Resultados contemplando la incorporación de ^{10}B sólo en tumor	63
3.5.4. Resultados contemplando la incorporación de ^{10}B en tumor y órganos sanos	68
3.5.4.1. Casos de recaída postratamiento conservador - haz frontal	70
3.5.4.2. Casos de recaída postratamiento conservador - haz oblicuo	73
3.5.4.3. Caso de recaída posmastectomía - haz frontal	76
3.5.4.4. Caso de recaída posmastectomía - haz oblicuo	77
3.5.5. Comentarios finales	78
4. Diseño y desarrollo de nanomedicinas conteniendo compuestos borados	81
4.1. La nanomedicina como estrategia para la entrega de fármacos	81
4.1.1. Definiciones y conceptos generales	81
4.1.2. Vías de administración y barreras biológicas	83
4.1.3. Direccionamiento o <i>targeting</i> pasivo y activo de las nanomedicinas	85
4.1.4. Desafíos y oportunidades en el campo de las nanomedicinas	87
4.1.5. Liposomas como nanovehículos para el transporte de fármacos	88
4.1.5.1. Métodos de obtención de liposomas	89
4.2. Desarrollo de liposomas como nanovehículos transportadores de compuestos borados empleando tecnología microfluídica	91
4.2.1. Formulación lipídica y compuestos borados empleados	91
4.2.2. Fabricación y caracterización del chip micromezclador	92
4.2.3. Obtención y caracterización de liposomas	94
4.2.4. Ensayos de incorporación de liposomas en cultivo celular	98
5. Estudio experimental de la microdistribución de compuestos borados en cultivos celulares	101
5.1. Aplicación de técnicas de imágenes como herramientas para el estudio de la distribución de compuestos borados	101
5.1.1. Conceptos de autorradiografía neutrónica	101
5.1.1.1. Mecanismos de formación de la traza	103
5.1.2. Procesos involucrados en la sensibilización por radiación UV-C	107

5.2. Combinación de la autorradiografía neutrónica y la sensibilización UV-C para la localización espacial de trazas y estructuras celulares	109
5.2.1. Fundamentos	109
5.2.2. Estudio de formación de improntas celulares	111
5.2.3. Generación de trazas en Lexan y efecto de la exposición UV-C en la técnica propuesta	113
5.2.4. Protocolo establecido	122
5.3. Estudio de incorporación de liposomas en la línea celular SKBR-3	123
5.3.1. Análisis cualitativo. Exploración de las muestras generadas	124
5.3.2. Análisis cuantitativo	127
5.3.2.1. Herramientas computacionales desarrolladas	127
5.3.2.2. Determinación de las distribuciones de concentración de ^{10}B en compartimentos celulares	129
6. Evaluación microdosimétrica del desempeño de transportadores de compuestos borados	137
6.1. Algunos conceptos de microdosimetría	137
6.2. Fundamentos	143
6.3. Modelado de la estructura celular	144
6.3.1. Definiciones	144
6.3.2. Algoritmo computacional para la obtención de la distribución de longitudes de cuerdas de un objeto de interés bajo estudio	146
6.3.3. Algoritmo computacional para el ajuste del histograma de cuerdas a la función de densidad de cuerdas de un esferoide	147
6.3.4. Obtención de los parámetros de ajuste de un esferoide a estructuras celulares de interés	151
6.4. Modelo computacional estocástico-análogo para el cálculo de deposición de energía en el núcleo celular	156
6.4.1. Determinación de la energía específica z_F para diferentes distribuciones de fuentes de reacciones de captura neutrónica en ^{10}B	161
7. Conclusiones y trabajo futuro	165
7.1. Conclusiones	165
7.2. Trabajo futuro	169
A. Anexo	171
A.1. Propuesta y diseño de experimentos para la obtención de curvas de sobrevida celular	171
A.2. Formalismo BED	176
A.3. Obtención de fracciones funcionales de anticuerpos monoclonales	178
A.4. Técnica bootstrap	180
A.5. Relación entre la energía específica para eventos únicos y la energía lineal	184
Bibliografía	187

Figuras

1.1. Esquema de la reacción de captura neutrónica en ^{10}B	2
3.1. Vistas de la sala de tratamiento de BNCT del reactor RA-6	46
3.2. Interfaz de usuario del programa computacional de análisis dosimétrico desarrollado	49
3.3. Fantomas antropomórficos computacionales	51
3.4. Factores de kerma empleados en el cálculo dosimétrico	53
3.5. Contribución promedio del ^1H y del ^{14}N al kerma neutrónico	53
3.6. Influencia en el kerma calculado en distintos órganos por el empleo de diferentes factores de kerma	54
3.7. Espectro neutrónico y composición espectral del haz de tratamiento RA-6	63
3.8. Perfiles de flujo de neutrones térmicos en fantoma de agua	64
3.9. Distribución de flujo neutrónico térmico en fantomas antropomórficos para los casos clínicos de estudio con incidencia frontal del haz de irradiación	64
3.10.DVH para el caso clínico BCT300 sin boro en órganos sanos	66
3.11.DVH de las componentes de dosis para el caso BCT300 para una concentración de ^{10}B en tumor de 90 ppm y asumiendo una concentración igual a cero en órganos sanos	67
3.12.DVH del tumor para los distintos casos propuestos y esquemas de dosis prescrita en el caso en que los órganos sanos no concentran ^{10}B	68
3.13.DVH para el caso BCT300 evaluando diferentes esquemas de irradiación	71
3.14.DVH para el caso BCT600 evaluando diferentes esquemas de irradiación	72
3.15.Comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz en la mama contralateral para el caso BCT300	74
3.16.Comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz en la mama contralateral para el caso BCT600	75
3.17.Comparación de la dosis máxima entregada por distintos esquemas de BNCT evaluados en mama contralateral con esquemas de radioterapia fraccionada con modalidad SAPBI	76
3.18.DVH para el caso MAST300 evaluando diferentes esquemas de irradiación	77
3.19.Comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz en la mama contralateral para el caso MAST300	78
4.1. Estructura cristalográfica de la inmunoglobulina IgG1	86
4.2. Representación esquemática de un liposoma	88
4.3. Distintas etapas de la fabricación del chip micromezclador	93
4.4. Conexión del chip micromezclador	94

4.5. Evaluación cualitativa del chip micromezclador fabricado	95
4.6. Distribución de tamaños de liposomas a diferentes valores de TFR	96
4.7. Distribución de tamaños y PDI de liposomas a TFR 2 ml min ⁻¹ y FRR variable	96
4.8. Comparación de tamaños de liposomas en distintos medios	97
5.1. Trazas generadas con fuente de ²²² Cf en CR-39	103
5.2. Parámetros del mecanismo de formación de la traza	105
5.3. Impronta celular en Lexan	108
5.4. Esquema de aplicación de la autorradiografía neutrónica y sensibilización UV-C.	110
5.5. Condiciones de tratamiento para el pegado de células	112
5.6. Células fijadas en Lexan con el protocolo de pretratamiento con PBS y tinción con hematoxilina	112
5.7. Efecto de la exposición a UV-C y del ataque químico en la formación de improntas celulares	114
5.8. Efecto de la tinción con hematoxilina y del tiempo de exposición a la radiación UV-C	115
5.9. Efecto del tiempo de exposición UV-C en la velocidad de bulk	116
5.10. Efecto del tiempo de exposición a UV-C en el fenómeno de desvanecimiento del número de trazas en Lexan	117
5.11. Efecto del tiempo de exposición UV-C en la densidad de trazas	117
5.12. Imagen de autorradiografía neutrónica de trazas en células SKBR-3 sin sensibilización UV-C	119
5.13. Imagen de autorradiografía neutrónica de trazas en improntas de células SKBR-3	119
5.14. Densidad de trazas nucleares bajo diferentes condiciones experimentales	120
5.15. Imagen de autorradiografía neutrónica de trazas en improntas de células SKBR-3 con distintos tiempos de exposición a UV-C	121
5.16. Densidad de trazas nucleares bajo diferentes condiciones experimentales	121
5.17. Flujo de trabajo del protocolo establecido para la visualización de improntas y trazas celulares en Lexan en la línea celular de cáncer de mama SKBR-3	122
5.18. Improntas y trazas en la línea SKBR-3	123
5.19. Improntas y trazas en la línea MCF-7	123
5.20. Autorradiografía del estudio de incorporación de liposomas en línea SKBR-3	125
5.21. Autorradiografía del estudio de incorporación de liposomas en línea SKBR-3 bajo una fluencia neutrónica de 10 ¹³ n cm ⁻²	126
5.22. Autorradiografía del estudio de incorporación de liposomas en línea SKBR-3. Hallazgo 1	126
5.23. Autorradiografía del estudio de incorporación de liposomas en línea SKBR-3. Hallazgo 2	127
5.24. Diagrama en bloques de la herramienta computacional desarrollada para la determinación de la ubicación espacial de trazas en compartimentos celulares	128
5.25. Herramienta computacional para el segmentado de compartimentos celulares y trazas	129
5.26. Distribución normalizada del cociente entre el área nuclear y el área celular	131
5.27. Eventos nulos de trazas en células y sus compartimentos	131
5.28. Distribución normalizada de la densidad de trazas en compartimentos celulares	133
5.29. Estimación de las distribuciones de concentración de ¹⁰ B en compartimentos celulares a diferentes tiempos de incubación	134

5.30. Estimación de las distribuciones de concentración de ^{10}B en células a diferentes tiempos de incubación	134
6.1. Concepto de evento único y multievento	139
6.2. Esferoide oblado y prolado y sus respectivas funciones de densidad	146
6.3. Definición de una cuerda C bajo la aleatoriedad S -randomness	147
6.4. Histograma de longitudes de cuerdas de la imagen binaria de un disco	148
6.5. Ajuste del histograma de longitudes de cuerdas a la $f_{\mu}(x)$ de un esferoide	149
6.6. Interfaz de usuario de la aplicación de ajuste de la función de densidad de probabilidad $f_{\mu}(x)$	149
6.7. Resultados del ajuste automático aplicado sobre el histograma de longitudes de cuerdas para un esferoide oblado y otro prolado.	150
6.8. Ajuste automático de la $f_{\mu}(x)$ para secciones de esferoides en una imagen	152
6.9. Corte histológico de una muestra de tumor de cáncer de mama HER2+ y la correspondiente segmentación de estructuras celulares de interés	154
6.10. Cuerdas obtenidas en núcleos celulares segmentados correspondientes a un tumor de cáncer de mama HER2+	154
6.11. Ajuste automático de $f_{\mu}(x)$ obtenido a partir de células segmentadas <i>tumor 1</i>	155
6.12. Ajuste automático de $f_{\mu}(x)$ obtenido a partir de células segmentadas <i>tumor 2</i>	156
6.13. Modelo de estructura celular de un tumor de cáncer de mama HER2+	156
6.14. Esquema de trabajo empleado para la determinación del modelo de estructura celular	157
6.15. Módulos que componen el código de simulación computacional	158
6.16. Distribuciones de reacciones de captura neutrónica simuladas	160
6.17. Esquema de eventos relativos al volumen de interés	160
6.18. Geometría, generación de fuentes y transporte de partículas	161
A.1.1 Modelo computacional del tubo contenedor con pélet de células	173
A.1.2 Modelo del soporte de tubos contenedores para la irradiación de pélets de células	174
A.1.3 Modelo computacional del posicionamiento del soporte para la irradiación de células en la FCCT RA-3	174
A.3.1 Representación esquemática de la obtención de fragmentos funcionales del anticuerpo monoclonal trastuzumab	178
A.3.2 Gel de poliacrilamida para la evaluación de la obtención de fragmentos funcionales del anticuerpo monoclonal trastuzumab	179
A.4.1 Comparación de los tres métodos probados para el cálculo de los intervalos de confianza del 95 % en distintas distribuciones.	183

Tablas

2.1. Clasificación histopatológica del cáncer de mama.	10
2.2. Subtipos de cáncer de mama de interés clínico.	11
2.3. Estratificación por edades de la tasa de incidencia del cáncer de mama en Argentina.	13
3.1. Criterios establecidos para los límites de dosis (o dosis de tolerancia, $D_{tol.}$) de diferentes órganos sanos contemplados en el estudio de aplicación de BNCT para el tratamiento del cáncer de mama.	61
3.2. Criterios establecidos para los límites de dosis (o dosis de tolerancia, $D_{tol.}$) en mama ipsilateral y contralateral junto con prescripción de dosis en tumor contemplados en el análisis dosimétrico.	62
3.3. Esquemas definidos en términos de concentraciones de ^{10}B y prescripción de dosis contemplados en el análisis de dosimetría propuesto.	70
3.4. Resumen de resultados obtenidos en el análisis realizado para los esquema B y D y para los diferentes casos clínicos estudiados con incidencia oblicua del haz de irradiación.	80
4.1. Resultados de la caracterización de los liposomas obtenidos a TFR 2 ml min^{-1} y diferentes FRR, en términos de la concentración de B y P.	97
4.2. Resultados del ensayo de captación a distintos tiempos de incubación y concentración de la solución de incubación de 125 ppm.	99
5.1. Condiciones experimentales estudiadas para analizar el efecto de la tinción con hematoxilina y el tiempo de exposición a UV-C en la visualización simultánea de improntas celulares y trazas nucleares.	120
6.1. Parámetros de los modelos de estructuras celulares evaluados en los cálculos microdosimétricos	162
6.2. Energía promediada en frecuencia (z_F) y número promedio de reacciones (n) para alcanzar una dosis absorbida de 5.2 Gy, que conforma la componente D_B de la dosis prescrita de 21 Gy-Eq, en el núcleo celular de acuerdo a distintas distribuciones de reacciones de captura y contemplando diferentes modelos de estructuras celulares.	163
6.3. Concentraciones de ^{10}B requeridas en cada tipo de distribución para entregar una dosis absorbida de 5.2 Gy en el núcleo de la célula.	163

Resumen

La presente tesis describe el estudio de aplicación de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT, por sus siglas en inglés) para el tratamiento del cáncer de mama y sus recaídas con especial atención en el subtipo HER2+, contemplando la facilidad de irradiación de BNCT del reactor RA-6 y empleando nanovehículos como transportadores de compuestos borados. Se propuso realizar un abordaje abarcativo del problema, estudiando los diferentes aspectos relacionados a la implementación de esta modalidad de radioterapia para los casos clínicos propuestos junto al desarrollo y caracterización de liposomas para la administración de compuestos borados.

En referencia a dicho abordaje, por un lado se establecieron los casos clínicos de interés para aplicación de BNCT y, en base a ellos, se realizó el estudio de dosimetría computacional para establecer los parámetros y requisitos para la irradiación. Se definieron como casos clínicos los tumores primarios de cáncer de mama y las recaídas postratamiento conservador y/o posmactomía. Los resultados de este análisis mostraron la factibilidad de aplicación en los casos de tumores primarios y aquellas recaídas postratamiento conservador, logrando entregar la dosis de prescripción en tumor obteniendo, a su vez, un importante gradiente de dosis respecto a los tejidos sanos involucrados.

Por otra parte, en dicho abordaje, se desarrollaron liposomas encapsulando dos compuestos borados empleando tecnología microfluídica. Los mismos fueron caracterizados en términos físicos y químicos y se realizaron estudios de incubación en una línea celular de cáncer de mama probando su efectiva incorporación. Vinculado a este desarrollo, se propuso establecer un método experimental y otro teórico para la evaluación de los liposomas como transportadores de compuestos borados. De esta forma, se estableció un novedoso protocolo de trabajo experimental basado en la combinación de la autorradiografía neutrónica y la radiografía UV-C para la determinación intracelular de trazas nucleares originadas en la reacción de captura neutrónica en ^{10}B . Esta técnica permitió establecer la concentración intracelular de ^{10}B en núcleo y citoplasma. Por otro lado, se propuso un método teórico-computacional, basado en un enfoque microdosimétrico, para evaluar diferentes distribuciones de reacciones de captura neutrónica en ^{10}B sobre la deposición de energía en el núcleo celular. Junto al desarrollo de una herramienta computacional para modelar estructuras celulares, se desarrolló un modelo estocástico-análogo para el cálculo de cantidades microdosimétricas a partir de la deposición de energía por la reacción de interés en el núcleo de la célula. Los resultados obtenidos mostraron que la distribución intranuclear es la más eficiente para alcanzar la dosis prescrita en el núcleo celular. Se mostró, además, que los valores de concentración de ^{10}B que surgen del cálculo microdosimétrico se encuentran dentro del rango establecido experimentalmente con la técnica desarrollada previamente.

Los resultados obtenidos son muy alentadores y establecen la base de estudio para futuros desarrollos tendientes a concretar la aplicación de BNCT para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ y sus recaídas.

Abstract

This dissertation describes the feasibility study of the application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) to the treatment of breast cancer and its recurrences with special attention on HER2+ subtype, considering the BNCT irradiation facility at RA-6 reactor and using nanovehicles as boron compound carriers. This work presents the comprehensive approach to this study, that includes the analysis of the different aspects related to the implementation of BNCT for the clinical candidate cases, together with the development and characterization of liposomes for the administration of boron compounds.

As part of this approach, an exhaustive study was first conducted to identify candidate clinical cases. Based on the selected cases, the computational dosimetry study was performed aimed at evaluating ^{10}B distribution requirements and irradiation conditions. Identified clinical cases include primary breast cancer tumors and local relapses arising after breast conserving therapy or after mastectomy. Results showed the feasibility of treatment of primary tumors and those relapses after breast conserving therapy, administering the prescription dose to tumor and achieving a sharp dose gradient between tumor and healthy tissues.

Regarding the synthesis of the nanocarriers, liposomes were developed encapsulating two boron compounds by means of microfluidic technology. After physical and chemical characterization of the obtained liposomes was accomplished, *in vitro* studies showed an effective incorporation of the boron-loaded nanovehicles in a breast cancer cell line.

In relation to this development, and with the aim of introducing a suitable method for boron intracellular determination, a novel experimental approach was established based on the combination of neutron autoradiography and UV-C radiography. The proposed methodology enables to obtain high-resolution autoradiographic images of cellular structures imprints together with nuclear tracks coming from the ^{10}B neutron capture reaction. Moreover, it allowed to determine the intracellular ^{10}B concentration within the main cell structures and compartments, such as nucleus and cytoplasm. In addition to the experimental development, a theoretical-computational method based on a microdosimetric approach was proposed for the evaluation of the energy deposition in the cellular nucleus considering different ^{10}B neutron capture reaction distributions. Along with the development of a computational tool for modeling cellular structures, an analog-stochastic model was developed for the calculation of microdosimetric quantities from the deposition of energy by the reaction of interest in the cell nucleus. Obtained results showed that intranuclear ^{10}B distribution proves the most effective for reaching the prescribed dose in cell nucleus. The ^{10}B concentration values arising from microdosimetric calculation were shown to be within the range determined experimentally in the breast cancer cell line with the mentioned technique.

The presented studies suggest that, obtained results are very encouraging and constitute the basis

for future developments towards the application of BNCT for the treatment of HER2 + breast cancer and its relapses.

1 | Introducción

1.1. Marco conceptual

La Terapia por Captura Neutrónica (NCT, por sus siglas en inglés) es una forma de terapia radiante propuesta para el tratamiento de ciertos tumores malignos, que se basa en la reacción nuclear de captura neutrónica por parte de un isótopo estable con alta sección eficaz microscópica para dicha reacción.

El isótopo estable más ampliamente empleado en la aplicación clínica de la NCT es el boro-10 (^{10}B), cuyo uso le confiere el nombre específico de Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT, por sus siglas en inglés). Éste es un isótopo estable del boro, se encuentra con una abundancia relativa del 19.9 % y posee una sección eficaz microscópica para la captura de neutrones térmicos de 3837 barns a 0.0253 eV (varios órdenes de magnitud mayor respecto a las reacciones que pueden ocurrir con los elementos que componen el tejido, como el hidrógeno-1 (^1H) con 0.332 barns o el nitrógeno-14 (^{14}N) con 1.769 barns, para la misma energía de neutrones)¹. Como productos de la reacción de captura neutrónica en ^{10}B se generan un núcleo de helio-4 (^4He), o partícula α , y un núcleo de litio-7 (^7Li), los cuales, dada la conservación del momento, se emiten en la misma dirección pero en sentidos opuestos. Tal como se esquematiza en la figura 1.1, con mayor frecuencia, junto con estas partículas, se emite un fotón de 478 keV.

Las partículas producidas en la reacción $^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha)^7\text{Li}$ depositan toda su energía a lo largo de un trayecto de longitud comparable con el diámetro de una célula, del orden de los 10 μm , teniendo la capacidad de provocar un daño letal [1]. Es así que la acumulación preferencial del ^{10}B en las células tumorales brinda la posibilidad de ofrecer un tratamiento radioterapéutico selectivo a nivel celular, confiriendo de esta forma la principal ventaja radiobiológica de BNCT. Así, esta forma de radioterapia ofrece el potencial de alcanzar una conformación de dosis que permita una alta probabilidad de control tumoral logrando, a su vez, el resguardo de los tejidos sanos circundantes. Por otra parte, en estas condiciones, BNCT permite tratar incluso aquellas regiones tumorales que no son detectables con las técnicas de imágenes que se emplean actualmente para el diagnóstico de la enfermedad. A los fines prácticos del tratamiento, al paciente se le administra un compuesto borado con acumulación selectiva en tumor y, posteriormente, se realiza la irradiación neutrónica de la región tumoral.

Si bien BNCT fue propuesta inicialmente por Locher en 1936 [2], poco después del descubrimiento del neutrón realizado por Chadwick [3] y de la descripción de procesos de captura de neutrones

¹Tabla de nucleídos, Centro de Datos Nucleares, Instituto de Investigación de Energía Atómica de Corea (KAERI). <https://atom.kaeri.re.kr/old/ton/index.html> (consultado el 10 de octubre de 2021).

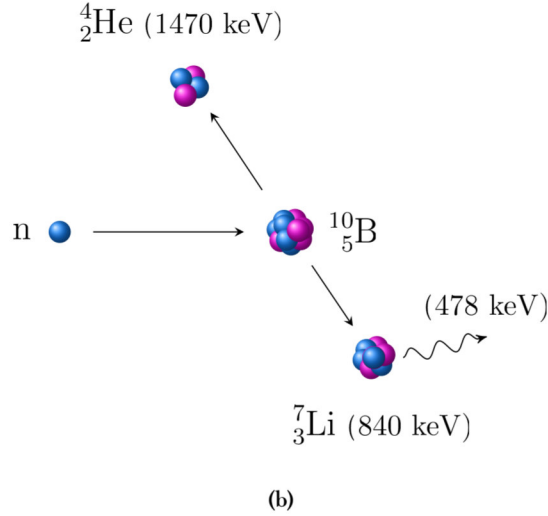
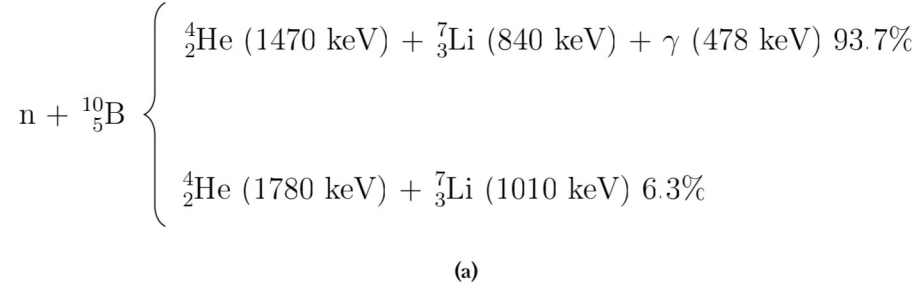


Figura 1.1: Representación de la reacción de captura neutrónica en boro ${}^{10}\text{B}(n, \alpha){}^7\text{Li}$. En la figura (1.1a) se muestra el esquema de los productos junto con su energía y la tasa de ocurrencia, mientras que en la figura (1.1b) se puntualiza la representación gráfica de la reacción más frecuente.

de baja energía por parte de ciertos núcleos [4, 5], los primeros ensayos pudieron llevarse a cabo recién en la década del año 1950, impulsados gracias al fuerte avance tecnológico en términos del desarrollo de reactores nucleares que permitieron contar con haces neutrónicos con características energéticas adecuadas para esa aplicación. Estos primeros estudios de aplicación clínica se concentraron en el tratamiento del glioblastoma multiforme y fueron llevados a cabo por el equipo de William Sweet, neurocirujano del Hospital General de Massachusetts (MGH, por sus siglas en inglés), empleando el haz de neutrones térmicos del reactor de investigación del Laboratorio Nacional de Brookhaven (BNL, por sus siglas en inglés), y el compuesto borato de sodio, comúnmente conocido como bórax [6].

A mediados de la década de 1950 y comienzos de 1960, fueron sintetizados distintos compuestos borados por diversos grupos y evaluados en modelos para estudiar su biodistribución en los diferentes tejidos. El descubrimiento de nuevas especies químicas boradas dio el impulso a una intensiva exploración de aplicación en BNCT. De esta serie de compuestos, cabe mencionar el decahidrodecaborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) conocido también como GB-10, sintetizado en 1959 [7] y empleado por Sweet y col. en 1962 [8] en estudios clínicos para el tratamiento del glioblastoma. Si bien este compuesto mostró ser no tóxico, los resultados evidenciaron una mayor acumulación de boro en la pared vascular en comparación al tumor, lo que marcó la necesidad de estudiar y desarrollar compuestos con afinidad tumoral. En este sentido, otros dos compuestos se destacaron por sobre el resto de los sintetizados en

esta generación y, gracias a los ensayos realizados, se afianzaron en su uso clínico en BNCT. El boro-captato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$), conocido como BSH, fue sintetizado por primera vez en 1964 por Miller y col. [9] y ensayado en estudios posteriores por Soloway y col. en 1967 [10]. Este compuesto fue empleado por el neurocirujano Hiroshi Hatanaka, quien formó parte del grupo de Sweet en MGH, en los ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con glioblastoma multiforme realizados en Japón a fines de la década del 1960. Estos estudios permitieron demostrar que el BSH podía ser empleado como un compuesto para el tratamiento de este tipo de tumor, lo cual estimuló el desarrollo de trabajos en otros grupos de investigación [11]. Otro de los compuestos destacados de esa generación fue el L-4-dihidroxiborofenilalanina conocido como BPA, sintetizado por Snyder y col. en 1958 [12]. En particular, la estructura del BPA es similar a los precursores de la melanina, sustancia empleada en el metabolismo de los melanocitos, y fue recién en los primeros años de la década de 1980 cuando Ichihashi y col. descubrieron la eficacia de este compuesto en modelos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento del melanoma [13], luego llevándose a cabo los primeros ensayos clínicos [14]. En especial, el compuesto BPA se administra formando un complejo con fructosa, denominado BPA-f, incrementando su solubilidad de forma de facilitar su administración intravenosa a los pacientes [15]. Posteriores estudios mostraron que también se concentra con cierta selectividad en otros tumores diferentes a los melanomas, mostrando un mecanismo de transporte activo [16], lo que llevó a realizar pruebas de su aplicación para el tratamiento del glioblastoma multiforme [17].

Los trabajos pioneros de aplicación de BNCT por parte de los equipos de Sweet, Hatanaka y Mishima para el tratamiento del glioblastoma multiforme y de melanomas cutáneos fueron esenciales para que el concepto de aplicación se haya extendido para el tratamiento de tumores que no responden a otras formas de terapia. Estos estudios fueron conducidos en reactores nucleares dotados de facilidades de irradiación para uso en ensayos clínicos, algunos de los cuales situados en países como Estados Unidos, Japón, China, Finlandia, Suecia, Países Bajos, Taiwan, República Checa y Argentina, y han permitido afianzar las bases del conocimiento dentro de esta disciplina y han promovido especialmente la aplicación de BNCT para el tratamiento del glioblastoma multiforme [18-22], el tratamiento de tumores de cabeza y cuello inoperables y sus recurrencias [23-26] y el tratamiento del melanoma cutáneo [27-30]. Además de los mencionados, también se ha propuesto y estudiado la aplicación de BNCT en otros tipos de tumores tales como metástasis hepáticas [31, 32], cáncer de pulmón [33], mesotelioma pleural [34], osteosarcoma [35, 36], cáncer de mama [37, 38], entre otros.

Por otra parte, retomando la línea de fuentes de neutrones, gracias al trabajo de investigación y sus consecuentes avances tecnológicos, se han logrado diseñar aceleradores de partículas acoplados a blancos para la producción de neutrones con características energéticas adecuadas para su aplicación en BNCT. Los aceleradores propuestos son del tipo ciclotrones, aceleradores lineales (LINACs, por sus siglas en inglés) y aceleradores electrostáticos, y dependiendo del diseño implementado, estos se basan en la aceleración de protones o núcleos de deuterio (^2H) que inciden en blancos de berilio (Be), litio (Li) o carbono (C) [39, 40]. Los aceleradores de partículas con aplicación en BNCT se caracterizan por ser máquinas más compactas, simples de operar y de mantener, en comparación con las facilidades de BNCT asociadas a reactores nucleares. Estas características, sumado a que las normas regulatorias relacionadas a la operación de reactores nucleares son más estrictas, hacen que los aceleradores sean más adecuados para su instalación en un hospital clínico, brindando el ambiente óptimo para el tratamiento de pacientes. Es así que la instalación de aceleradores como fuentes de neutrones para la aplicación de BNCT abre la posibilidad de incrementar el número de ensayos que permitan sumar evidencia científica

y clínica sobre la eficacia de aplicación de esta forma de radioterapia. De acuerdo a los datos provistos por la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, por sus siglas en inglés), en el mundo hoy en día existen 29 facilidades asociadas a la aplicación de BNCT que se encuentran instaladas en 11 países, distribuidas en Europa, Asia y América, y de las cuales 21 corresponden a instalaciones asociadas a aceleradores (8 LINACs, 9 electrostráticos y 4 ciclotrones) y 7 de ellas a reactores nucleares, de los cuales 2 se encuentran en nuestro país (el reactor RA-3 en la localidad de Ezeiza, Pcia de Buenos Aires, y el reactor RA-6, ubicado en la ciudad de San Carlos de Bariloche, Pcia. de Rio Negro)^{II}. En particular, Japón se destaca de entre los demás países con 9 aceleradores y 1 reactor nuclear. En este sentido, este país ha sido el primero en comenzar los ensayos clínicos fase II para el tratamiento de tumores malignos de cerebro y tumores de cabeza y cuello empleando aceleradores [41, 42]. Además también en ese país, se propuso el ensayo clínico fase I de aplicación de BNCT para el tratamiento del melanoma maligno y angiosarcoma con acelerador en el Hospital del Centro Nacional de Cáncer (NCCH, por sus siglas en inglés) ubicado en Tokio.

Retomando los conceptos relacionados a los compuestos borados, por lo expresado anteriormente, la distribución del ^{10}B y su acumulación selectiva en células tumorales juegan un rol preponderante para lograr un tratamiento efectivo con BNCT, siendo este un aspecto crítico y de amplio estudio. Los compuestos borados empleados para BNCT deben cumplir una serie mínima de requisitos: alto grado de especificidad tumoral, de manera de alcanzar una alta concentración diferencial en tumor respecto al tejido sano; retención prolongada en tumor, de modo que la concentración intracelular de boro no sufra grandes variaciones en los tiempos que se realiza la irradiación; depuración completa de la sangre y los tejidos normales y baja toxicidad de manera que sean bien tolerados por los pacientes [43, 44].

Desde sus inicios, en BNCT se ha buscado incrementar la selectividad de los compuestos borados, y en lo que se conoce como la tercera generación de compuestos, se propuso hacer énfasis en los aspectos biológicos, químicos y fisiológicos de la naturaleza del tumor. La investigación y el diseño de esta generación de compuestos se ha podido desarrollar gracias a los avances logrados en los campos de la biología celular y de la bioquímica. Dentro de esta generación se pueden mencionar el estudio y desarrollo de compuestos borados asociados a precursores de ácidos nucleicos, aminoácidos, carbohidratos, lipoproteínas, liposomas, porfirinas, agentes ligados a fracciones con blanco en el DNA celular, agentes ligados a receptores y antígenos [45]. En especial, de particular interés en esta propuesta, los liposomas son vesículas cuyas estructuras se pueden describir como esferas conformadas por una o varias bicapas lipídicas cuyo interior queda aislado del medio externo. Gracias a su conformación lipídica, los liposomas pueden ser absorbidos por las células mediante la fusión con sus membranas. Debido a estas características se los ha propuesto como estructuras que pueden actuar como vehículos para la distribución de fármacos o agentes terapéuticos [46]. En el ámbito de aplicación de BNCT, diferentes grupos de trabajo han explorado el desarrollo y evaluación de liposomas como transportadores de compuestos borados [47-51].

Dado el creciente interés por el empleo de liposomas como transportadores de fármacos, se han creado diferentes estrategias para mejorar su especificidad. Los conocimientos en el campo de la biología celular del cáncer, como los descubrimientos y avances relacionados con la señalización en las

^{II}Se recomienda revisar la interesante infografía interactiva puesta a disposición por la IAEA en la página web: [https://nucleus.iaea.org/sites/accelerators/Pages/Interactive – Map – of – Accelerators.aspx](https://nucleus.iaea.org/sites/accelerators/Pages/Interactive%20Map%20of%20Accelerators.aspx) (consultado el 20 de octubre de 2021).

células normales y tumorales, han permitido desarrollar diferentes estrategias para elevar el grado de especificidad de estos transportadores. Entre las estrategias empleadas se encuentra el uso de ligandos direccionados a blancos específicos de porciones expresadas en las células tumorales, como los anticuerpos para antígenos asociados a estas células, y moléculas glicoconjugadas, como polisacáridos y glicoproteínas [52]. Relacionado al empleo de anticuerpos como ligandos en liposomas para su uso en BNCT, Kullberg y col. han estudiado el uso de anticuerpos monoclonales en liposomas cargados con acridina borada soluble y probados en cultivos celulares, obteniendo resultados muy alentadores [53, 54]. En esta misma línea estratégica, y de especial interés en esta propuesta, en 2006 Mundy y col. propusieron el tratamiento del subtipo de cáncer de mama HER2+, basado en la aplicación de BNCT empleando anticuerpos monoclonales como ligandos para el transporte de compuestos borados [37]. Brevemente, este subtipo de cáncer de mama se caracteriza por sobreexpresar una proteína, denominada HER2, confiriendo a las pacientes un peor pronóstico asociado a una reducción de la supervivencia global y a un corto período hasta la recaída de la enfermedad. Si bien la sobreexpresión de esta proteína permite el uso de anticuerpos monoclonales específicos en combinación con otras modalidades de tratamiento, existe un cierto grupo de pacientes que no responde en forma completa a este tipo de tratamiento [55-57].

Antes de cerrar el marco conceptual en el cual se desarrolla esta tesis, es importante mencionar el rol de nuestro país en la investigación en esta disciplina. El proyecto para el desarrollo de BNCT en nuestro país se inició formalmente en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) en el año 1996, con el objetivo de generar la tecnología, las instalaciones y los estudios científicos y médicos para llevar el tratamiento al campo clínico. En el año 2003 se obtuvo la aprobación del protocolo de ensayo clínico para el tratamiento de melanoma en extremidades. En octubre de ese mismo año en la facilidad de irradiación de BNCT del reactor RA-6, se realizó la primera irradiación como parte de los ensayos clínicos de BNCT en seres humanos en Argentina y en toda Latinoamérica. Además de la mencionada, entre las líneas de investigación propuestas se encuentran el estudio para el tratamiento del cáncer intratable de tiroides, de metástasis pulmonares difusas, de metástasis hepáticas multifocales y el tratamiento del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello. La investigación para el desarrollo de BNCT en nuestro país tiene un enfoque multidisciplinario que abarca, entre otras actividades, los estudios radiobiológicos que permiten determinar los efectos en diferentes líneas celulares y en animales de experimentación; desarrollo y estudios de dosimetría computacional y planificación de tratamientos; la aplicación de técnicas que permiten cuantificar la concentración de boro en diferentes muestras biológicas; el diseño, construcción y estudio de facilidades de irradiación, principalmente en los reactores RA-3 y RA-6, y el acelerador con aplicación en BNCT, que se encuentra actualmente en desarrollo.

1.2. Objetivos y alcances de la tesis

El cáncer de mama HER2+, junto a sus recaídas, conforman un caso paradigmático en el desarrollo de la presente propuesta de aplicación de BNCT. La biología característica de este tipo de cáncer, es decir, la sobreexpresión de la proteína HER2, abre el camino para la exploración de aplicación de BNCT con el objetivo de mejorar y potenciar la capacidad selectiva de los mecanismos de entrega de compuestos borados. Como fue mencionado, la característica radiobiológica de BNCT se basa en la entrega de una dosis de control tumoral en forma selectiva resguardando a los tejidos sanos. Es importante poder determinar aquellos casos de aplicación donde esta característica resulte en una clara ventaja

terapéutica y que pueda ser ofrecida a las pacientes bajo una base racional de estudio. En el camino exploratorio que se aborda en este trabajo de tesis, y teniendo en cuenta los aspectos mencionados, confluyen el estudio y aplicación de tecnologías que mejoren la selectividad en la entrega de compuestos borados, el desarrollo de herramientas para la evaluación de las mismas y la integración con los requisitos que surjan del estudio de dosimetría computacional.

A partir de lo expuesto, en búsqueda de nuevas propuestas de tratamiento y teniendo en cuenta la experiencia adquirida por el grupo argentino de BNCT en el tratamiento de melanoma cutáneo empleando el haz de neutrones del reactor RA-6, este trabajo de tesis contempla el estudio de factibilidad dosimétrica para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ y sus recaídas con la aplicación de BNCT, junto con el estudio de las características del vehículo transportador de boro a partir de los requerimientos macrodosimétricos y microdosimétricos empleando liposomas combinados con anticuerpos monoclonales anti-HER2 como transportadores de compuestos borados.

Los objetivos generales de la tesis están vinculados a la contribución en el desarrollo de la aplicación de BNCT como una opción de tratamiento contra el cáncer de mama HER2+ y sus recaídas dentro del abordaje multimodal, con el fin de aumentar la probabilidad de control de la enfermedad minimizando la probabilidad de complicaciones en tejidos sanos, contribuir al estudio y desarrollo de nuevos compuestos borados y vehículos transportadores que optimicen la entrega selectiva, como así también al crecimiento y desarrollo de la aplicación de BNCT en nuestro país.

Como objetivos específicos de la tesis se encuentran, por una parte, la identificación de casos clínicos que puedan ser contemplados en dicha propuesta, y a partir de los mismos, la evaluación de factibilidad dosimétrica de aplicación de BNCT para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ y sus recaídas empleando fuentes de neutrones existentes en nuestro país. Por otra parte, contribuir al desarrollo y caracterización de liposomas como vehículos transportadores. En este caso, se aborda el problema desde dos aspectos: un aspecto experimental, por medio del análisis de la distribución de boro en cultivos celulares empleando las técnicas de autorradiografía neutrónica y radiografía UV; y otro aspecto teórico, mediante estudios microdosimétricos para evaluar los efectos de diferentes distribuciones de reacciones de captura y vinculadas al desempeño de los liposomas en la entrega de compuestos borados.

1.3. Organización

La concepción de la escritura de esta tesis tuvo como eje que los temas desarrollados en los diferentes capítulos conserven un hilo conductor que permita al lector comprender esta propuesta de manera integral. Con este espíritu, además del presente capítulo introductorio, esta tesis se conforma por cinco capítulos autocontenidos donde se expone el trabajo de investigación realizado junto a un capítulo de conclusiones donde, además, se propone el posible trabajo a futuro, y un anexo, que contiene el desarrollo en detalle de aquellos conceptos empleados en el abordaje de los capítulos anteriores.

El capítulo 2 tuvo como objetivo proveer el marco que permita comprender los principales aspectos relacionados al cáncer de mama y sus recaídas junto a su tratamiento, abordando específicamente el desarrollo y estado de la aplicación de la radioterapia en sus diferentes modalidades. Se hizo especial énfasis en el subtipo de cáncer de mama HER2+, su presentación y tratamiento.

A partir de lo expuesto en el capítulo anterior, el capítulo 3 se presenta con el objetivo de definir los casos clínicos de interés y, a partir de ello, realizar el análisis de dosimetría computacional con el fin de proporcionar de información dosimétrica que sirva de herramienta de análisis y que permita

evaluar la aplicación de BNCT como una opción de tratamiento. El abordaje contempla la evaluación de factibilidad, en términos de requerimientos de distribución de ^{10}B y tiempos de irradiación, de la aplicación de BNCT en el tratamiento del cáncer de mama empleando la facilidad de irradiación de BNCT del reactor argentino RA-6.

El capítulo 4 aborda el concepto de la nanomedicina y explora su aplicación en BNCT a partir del desarrollo local de nanovehículos transportadores de compuestos borados empleando tecnología microfluídica. En este capítulo se explican los detalles del trabajo realizado empleando un diseño particular de micromezclador para la obtención de liposomas junto a su caracterización y posterior ensayo en cultivos celulares de interés para evaluar su incorporación celular.

En el capítulo 5 se describe el desarrollo de un método experimental para la evaluación de la incorporación celular de los liposomas desarrollados. El método propuesto se basa en la mejora de la combinación de dos técnicas de imágenes: la autorradiografía neutrónica y la radiografía con UV-C, permitiendo visualizar en forma simultánea las improntas de la célula y su núcleo junto con las trazas de las partículas productos de la reacción de captura neutrónica. Junto al protocolo y aplicación del método experimental, se describen las herramientas computacionales desarrolladas para la determinación de las distribuciones de la densidad de trazas en compartimentos celulares.

En el capítulo 6 se expone el trabajo de estudio microdosimétrico que, vinculado al desarrollo y ensayo de liposomas presentado en el capítulo 4 y 5, tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes distribuciones de reacciones de captura en la deposición de energía en el núcleo de la célula. En primera instancia, se abordan los principales conceptos de microdosimetría requeridos para dar el marco teórico necesario. A continuación, vinculado a este estudio y basado en trabajos previos, se presenta el desarrollo de una herramienta para el modelado de la geometría de estructuras celulares basada en el análisis de la distribución de cuerdas de células y núcleos celulares contenidos en una imagen de un corte histológico tumoral y que se emplea en el modelo geométrico para el estudio de microdosimetría. Finalmente, se presenta el modelo computacional estocástico-análogo desarrollado para la determinación de la deposición de energía por los productos de la reacción de captura neutrónica en ^{10}B y el cálculo de cantidades microdosimétricas asociadas.

2 | Cáncer de mama

Introducción

El cáncer de mama es una enfermedad que, dada su incidencia, es considerada un problema de salud global. Gracias a los avances realizados principalmente en el área de la biología molecular, hoy en día se sabe que el cáncer de mama no es una enfermedad única sino que está compuesta por un grupo de subtipos. Cada uno de ellos poseen características particulares que los diferencian en términos de presentación clínica y de tratamiento. Sin pretender abarcar en forma completa a esta enfermedad tan compleja, en este capítulo se describe brevemente el cáncer de mama y sus diferentes clasificaciones y, en base a ello, se realiza un abordaje de las distintas modalidades de tratamiento, con especial énfasis en la aplicación de radioterapia. Se contemplan, además, los casos especiales que presenta la recaída de la enfermedad en diferentes escenarios postratamiento. Por otra parte, se realiza una descripción del cáncer de mama subtipo HER2+, de especial interés en el desarrollo de esta tesis.

2.1. Definición y clasificaciones

La glándula mamaria está compuesta por tejido glandular rodeado de estroma fibroso denso y tejido adiposo, ubicándose anatómicamente en la mama o seno. Estructuralmente, ésta se compone de lóbulos independientes que desembocan a través de los conductos galactóforos en las papilas mamarias o pezones. Antes de llegar al pezón, el conducto galactóforo se ensancha formando los senos lactíferos que sirven como reservorio de leche y se encuentran ubicados a nivel de la aréola. A su vez, cada lóbulo está compuesto por varios lobulillos, cada uno con un conducto terminal independiente, conformando la unidad funcional de la mama denominada *unidad ducto-lobulillar terminal* [58, 59].

El cáncer de mama tiene su origen con mayor frecuencia en el parénquima de la unidad funcional, precisamente en las células de los lobulillos y en los conductos, y con menor frecuencia, en las células del estroma mamario asociado a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos. Existen diferentes formas de describir y clasificar el cáncer de mama: a partir de su histopatología (tiene en cuenta las células de origen y extensión), el grado del tumor (describe qué tan diferentes son las células del tumor respecto del tejido normal), el estadio y la biología molecular que presenta. Una primera gran diferenciación contempla la extensión del tumor a tejidos de la mama circundante: se los denomina *carcinoma in situ*, cuando el tumor no se extendió a otros tejidos circundantes, o *carcinoma invasor o infiltrante*, cuando efectivamente el tumor se ha extendido más allá de su lugar de origen. De acuerdo a esta definición y teniendo en cuenta las células que con mayor frecuencia le dan origen, surge la clasificación histopatológica [58], que

No infiltrante
carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)
carcinoma lobulillar <i>in situ</i> (CLIS)
Infiltrante
carcinoma ductal infiltrante (CDI)
carcinoma lobulillar infiltrante (CLI)

Cuadro 2.1: Clasificación histopatológica del cáncer de mama.

se muestra en el cuadro 2.1.

Existen otros tipos de carcinomas infiltrantes que se presentan con menor frecuencia, como los carcinomas del tipo tubular, mucinoso, medular, papilar, filoides, y presentaciones especiales como la enfermedad de Paget o el cáncer de mama inflamatorio.

La estadificación del cáncer de mama tiene como objetivo brindar información sobre el pronóstico de la enfermedad y así poder evaluar las posibles opciones de tratamiento, y su definición contempla la extensión del tumor junto con los parámetros anatómicos al momento del diagnóstico. Como parámetros se definen el tamaño y extensión del tumor (T), presencia en nódulos linfáticos (N) y presencia de metástasis (M). A cada uno de estos parámetros se les asigna un número que dan detalle de las características que presenta el tumor. A medida que estos números se incrementan, el cáncer se presenta más avanzado: la escala abarca desde 0 (carcinoma no infiltrante) a IV (carcinoma infiltrante que se presenta con metástasis en otros órganos del cuerpo). La combinación de todos estos parámetros conforma la *clasificación* TNM, dentro de la cual existen la *clasificación clínica* TNM (cTNM), que se confecciona con los datos iniciales al diagnóstico y se emplea para el tratamiento primario, y la *clasificación patológica* TNM (pTNM), que se confecciona con los datos anatomopatológicos luego de la cirugía. En el año 2018, la octava edición del manual de estadificación del cáncer de mama emitido por la *American Joint Commission on Cancer* (AJCC, por sus siglas en inglés) [60] realizó una actualización de este sistema de estadificación. En ella, se agregaron nuevos parámetros que describen características biológicas específicas del tumor como el grado tumoral, la tasa de proliferación, el estado de expresión de receptores hormonales y de la proteína HER2. De esta forma, se agrupa la información TNM con el grado tumoral, el estado de receptores hormonales de estrógeno (ER) y progesterona (PR) y el estado HER2, dando lugar a la definición de nuevos grupos (0, IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV). Dado que estos biomarcadores tienen un gran impacto en el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad, esta nueva definición permite hacer una clasificación más precisa permitiendo un mejor abordaje del tratamiento.

De acuerdo a su extensión al tiempo del diagnóstico, el cáncer de mama se puede clasificar como *cáncer de mama temprano* y *cáncer de mama avanzado*. La primera clasificación se refiere a aquellos tumores que al momento del diagnóstico se encuentran contenidos en el volumen de la mama o que sólo se han expandido hasta los nódulos linfáticos axilares, y se los define como el conjunto de grupos I, IIA, IIB y IIIA de la clasificación pTNM [61]. Por otra parte, el *cáncer de mama avanzado* comprende a aquellos tumores que al momento del diagnóstico se han extendido fuera del volumen de la mama y más allá de los ganglios. Hoy en día, el cáncer de mama temprano se considera curable en el 70-80 % de los casos, mientras que la presentación avanzada se considera una enfermedad tratable pero no curable [62]. En este último caso las pacientes reciben tratamientos paliativos con el fin de disminuir los

<i>Luminal A-like</i>
alta expresión de ER+ y PR+, HER2-, bajo índice Ki-67, baja tasa de proliferación, bajo grado histológico, buen pronóstico
<i>Luminal B-like HER2-</i>
ER+ pero expresión ER y PR más baja que Luminal A-like, HER2-, alto índice Ki-67, alto grado histológico, pronóstico intermedio
<i>Luminal B-like HER2+</i>
ER+ pero expresión ER y PR más baja que Luminal A-like, HER2+, alto índice Ki-67, alto grado histológico, responde a terapias dirigidas, pronóstico intermedio
<i>HER2-enriched (non-luminal) (HER2+)</i>
ER-, PR-, HER2+, alto índice Ki-67, alto grado histológico, enfermedad agresiva, responde a terapias dirigidas, pronóstico intermedio
<i>Triple-negativo</i>
ER-, PR-, HER2-, alto índice Ki-67, alto grado histológico, mal pronóstico excepto en algunos casos especiales
+: con expresión; -: sin expresión; ER: receptor de estrógeno; PR: receptor de progesterona; HER2: receptor HER2; Ki67 index: marcador de proliferación.

Cuadro 2.2: Subtipos de cáncer de mama de interés clínico.

síntomas y dar una mejor calidad de vida. Por lo expuesto, es importante remarcar la importancia de lograr un diagnóstico temprano de la enfermedad, dado que las posibilidades de curación disminuyen con el incremento del estadio.

Como fue mencionado anteriormente, gracias al avance en el campo de la biología molecular, se ha determinado que el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea, existiendo varios subtipos con diferentes características biológicas intrínsecas. A partir del estudio de diversas muestras tumorales y de tejido normal de diferentes pacientes se logró una primera clasificación del cáncer de mama de acuerdo a la variación de los patrones de expresión génica: a partir de un grupo de genes, al que denominaron subgrupo *intrínseco*, se identificaron cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama: *estrogen-receptor(ER)+/luminal-like*, *basal-like*, *Erb-B2+* y *normal breast* [63, 64]. Esta clasificación resultó ser una verdadera revolución en el concepto que se tenía sobre la enfermedad y tuvo un gran impacto en el manejo de su tratamiento. Estudios posteriores permitieron expandir el subtipo *luminal* en *luminal-A* y *luminal-B*, incluyendo además nuevos subtipos [65]. A partir de la clasificación molecular y teniendo en cuenta la histología del tumor, se definen cinco subgrupos de interés clínico [62, 66], los cuales se muestran en el cuadro 2.2.

La distinción de estos subtipos posee implicancias en el manejo del tratamiento de la enfer-

medad, el cual también depende de varios factores, como el estadio al momento del diagnóstico. Por otra parte, se ha comprobado que el perfil molecular influye en las características metastásicas del cáncer de mama, tanto en el sitio de metástasis como en su tiempo de aparición [67]. Como ejemplo de esto, los nódulos linfáticos axilares presentan mayor frecuencia de metástasis para los subtipos *luminal A-like*, *luminal B-like* y *HER2+*, seguidos por la cadena mamaria interna y por último los nódulos supraclaviculares. Los demás sitios comprometidos por metástasis por cáncer de mama son: los huesos, con mayor frecuencia por subtipos *luminal A-like*, *luminal B-like* y *HER2+*; el hígado, donde los subtipos *triple-negativo* y *HER2+* son los más frecuentes; pulmón *HER2+*, *basal-like*, *luminal B-like* y el cerebro *HER2+*, *basal-like* [62].

2.2. Epidemiología

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por neoplasia en mujeres en todo el mundo, siendo un problema de salud global. A partir de datos estadísticos, se puede observar que este tipo de cáncer afecta a pacientes de diferentes estratos sociales y que, cuando se compara de acuerdo al nivel de ingreso^I o el índice de desarrollo humano^{II}, el cáncer de mama se mantiene entre los de mayor tasa de incidencia [69]. En los países cuya población posee mayores ingresos, el cáncer de mama es diagnosticado en estadios tempranos de la enfermedad, lo que usualmente conlleva un buen pronóstico para las pacientes. Por otra parte, en los países con ingresos medios o bajos, el cáncer de mama es diagnosticado de forma más tardía y, en consecuencia, las pacientes poseen un peor pronóstico. Pero además, en general, estas pacientes cuentan con un limitado acceso al tratamiento, lo cual se evidencia en las estadísticas de mortalidad [62]. Tanto desde el aspecto del diagnóstico como desde el tratamiento del cáncer de mama, se han realizado sustanciales progresos. En especial, relacionado a este último, se han alcanzado importantes avances en las terapias dirigidas junto con una mejora significativa de la calidad del tratamiento radiante dictado, principalmente, por los avances tecnológicos. Sin embargo, entre los grandes desafíos planteados para la salud pública en la lucha contra esta enfermedad, se encuentra el hacer llegar estos avances en forma equitativa a las pacientes de los diferentes estratos sociales. Igualar las condiciones de acceso, tanto al diagnóstico como al tratamiento y posterior seguimiento, es fundamental para eliminar las disparidades no solo en la sobrevida sino también en la calidad de vida de las pacientes mientras cursan esta enfermedad.

En todo el mundo, en 2018 hubieron más de 18 millones de nuevos casos de cáncer de todo tipo, contemplando ambos sexos, de los cuales el cáncer de mama representó el 11.6% (para todas las edades, rango etario de 0 a 85 años) mientras que la mortalidad por este tipo de cáncer representó el 6.6% respecto del total. A nivel mundial, la Argentina se encuentra entre los países con mayor tasa de incidencia y mortalidad por cáncer de mama, siendo incluso el país con mayor tasa de incidencia de Sudamérica (tomando la tasa estandarizada por edad)^{III}. En el mismo año, en nuestro país hubieron más de 129 mil nuevos casos de cáncer de todo tipo contemplando ambos sexos, de los cuales el cáncer de mama representó el 16.7% y su tasa de mortalidad fue del 9.3% respecto del total [68]. Teniendo en cuenta todos los tipos de cáncer en mujeres de todas las edades, la tasa de incidencia fue del 31.8%. En el cuadro 2.3 se muestran las tasas de incidencia de acuerdo a la estratificación por edades [68].

^IIL: Income Level, proporcionado por el Banco Mundial (World Bank)[68].

^{II}HDI: Human Development Index. Elaborado por el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas (UNDP)[68].

^{III}ASR: Age-Standardised Rate [68].

0-34 años	35-54 años	55-69 años	70+ años
18.1 %	40.1 %	36.8 %	24.2 %

Cuadro 2.3: Estratificación por edades de la tasa de incidencia del cáncer de mama en Argentina.

En el año 2016, el Grupo Colaborativo para el Estudio del Cáncer de Mama en la Argentina presentó un trabajo de caracterización del cáncer de mama en mujeres con el objetivo de describir el perfil epidemiológico, clínico y anatomopatológico de pacientes que concurren a centros públicos y privados durante el período 2012-2014 en nuestro país [61]. Este trabajo presenta un amplio espectro de información estadística asociada a las características sociodemográficas, antecedentes de salud, antecedentes personales, antecedentes familiares, características del tumor y diagnóstico de la enfermedad. En cuanto a la distribución de casos por edades, del mismo se desprende que el grupo etario de 50 a 54 años comprende el mayor porcentaje de casos (12.3 %) seguidos muy de cerca por los grupos 55 a 59 años (12.1 %) y 60 a 64 años (12.2 %). Mientras que, por debajo de los 30 años, los casos fueron poco frecuentes (1.1 %), a partir del siguiente grupo, 30 a 34 años, la frecuencia aumenta alcanzando un acumulado del 17 % para el grupo de 40 a 44 años. Por otra parte, del total de diagnósticos se encontró la forma infiltrante en el 80.8 % de los casos y se reportó un predominio del carcinoma ductal tanto para la forma no infiltrante (97 %) como infiltrante (87 %). Respecto a la clasificación cTNM del tumor, al momento del diagnóstico se presentó un 9.4 % en estadio 0, predominando los estadios I y II (70.9 %), estadio III (11.5 %) y el 2.4 % de los casos presentó un estadio IV. Por otra parte, teniendo en cuenta la clasificación pTNM, se encontraron un 7.9 % de los casos en estadio 0 y un 2.9 % en estadio IV, con el estadio I presentándose con mayor frecuencia (34.8 % de los casos). Asimismo, el 77.2 % de los casos pertenecen al conjunto de estadios tempranos de la enfermedad. Por último, caben mencionar los tiempos entre la aparición de síntomas, la consulta, el diagnóstico y el tratamiento: el promedio de días entre la aparición del primer síntoma y la primera consulta fue de 152 días siendo menor a 30 días en el 48.3 % de los casos; el promedio de días entre la primera consulta y el diagnóstico fue de 91 días y en el 35.0 % de los casos fue menor a 30 días; el promedio de días transcurridos entre el diagnóstico y el tratamiento fue de 83 días y el 43.7 % de los casos fue menor a 30 días.

2.3. Tratamiento

En términos generales, el manejo de la enfermedad se administra de acuerdo al estadio y clasificación que presenta la enfermedad al momento del diagnóstico y puede incluir distintas modalidades de tratamiento como cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida [66]. Estas últimas se contemplan en el caso de algunos subtipos de cáncer de mama determinados en la clasificación molecular. Estas modalidades pueden aplicarse siguiendo diferentes estrategias. De acuerdo a ello, y teniendo en cuenta el orden en que son aplicadas, se pueden clasificar como: tratamiento de primera línea, tratamiento neoadyuvante, tratamiento adyuvante y tratamiento de segunda línea. El tratamiento de primera línea se refiere al tratamiento principal de la enfermedad, el tratamiento adyuvante se aplica luego del tratamiento primario, mientras que el neoadyuvante se aplica antes del mismo (por ejemplo, con el objetivo de reducir el volumen del tumor previo a la cirugía). Por último, el tratamiento de segunda línea se refiere al tratamiento administrado luego del fracaso del tratamiento inicial.

Cabe destacar que se entiende como manejo de la enfermedad a la combinación de las diferentes modalidades de tratamiento. Hoy en día, la enfermedad no se trata con una única modalidad, existiendo algoritmos para la toma de decisiones que combinan estas modalidades de acuerdo al estadio de la enfermedad [70].

2.3.1. Abordaje quirúrgico

La modalidad de tratamiento primario es el quirúrgico en sus distintas técnicas (mastectomía radical, mastectomía radical modificada, cirugía conservadora). Junto con el tratamiento quirúrgico se aplica terapia sistémica y, generalmente, distintos esquemas de terapia radiante.

Durante muchos años, la *mastectomía radical* propuesta por Halsted [71] fue el tratamiento quirúrgico estándar para el cáncer de mama de cualquier estadio y sin importar la edad de la paciente. Con el correr de los años se fueron realizando modificaciones relacionadas a la variación de los márgenes quirúrgicos de manera que permitiesen el resguardo de estructuras críticas, como los músculos pectorales, estableciéndose así la *mastectomía radical modificada*. Estas modalidades fueron empleadas para el tratamiento del cáncer de mama principalmente hasta la década del 80 y, hoy en día, se continúan aplicando de acuerdo a la presentación de la enfermedad.

En 1969 el equipo del doctor Umberto Veronesi del Instituto del Cáncer de Milán, propuso una nueva técnica quirúrgica denominada *cuadrantectomía o cirugía conservadora de la mama* que consistía en la escisión del volumen confinado al cuadrante de la mama que contiene al tumor preservando, de esta forma, el volumen mamario. En esta propuesta la nueva técnica quirúrgica era acompañada por la disección de los nódulos axilares y por la posterior aplicación de radioterapia, y a esta combinación se la denominó *terapia conservadora de la mama*. La principal característica del tratamiento conservador es el impacto que tiene la preservación de la mama en la calidad de vida de la paciente, asociada principalmente a la reducción del trauma psicológico y emocional que conlleva la extirpación de la mama completa en la mastectomía. La aplicación de radioterapia en esta técnica tiene como objetivo tratar los posibles focos subclínicos de la enfermedad que pueden permanecer luego de la cirugía conservadora. Entre los años 1973 y 1980 se realizó el estudio randomizado que permitía comparar esta nueva técnica con la mastectomía radical. A partir de este primer estudio se pudo establecer que no existían diferencias en la tasa de supervivencia entre pacientes tratadas con mastectomía radical y la terapia conservadora para el tratamiento del cáncer de mama en estadio temprano y tumores de hasta 2 cm de tamaño [72]. En otro estudio posterior, se realizó la misma comparación para cáncer de mama en estadio I-II y tumores de hasta 5 cm, obteniendo la misma conclusión: la cirugía conservadora en combinación con el tratamiento radiante logra tasas de supervivencia similares a las alcanzadas en el tratamiento radical [73, 74]. Incluso estudios con 20 años de seguimiento han mostrado que la tasa de aparición de metástasis distantes, el tiempo a la aparición de las metástasis y la supervivencia general de las pacientes no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambas técnicas [75-77].

Si bien la radioterapia cumple un rol primordial en el tratamiento conservador, y muestra de ello es que se ha observado un incremento de la recaída de la enfermedad en aquellas pacientes que no recibieron radioterapia luego de la cirugía conservadora, los resultados de algunos estudios randomizados sugieren que en aquellas pacientes que presentan bajo riesgo (basados en el tamaño del tumor, compromiso ganglionar, edad y perfil molecular) la aplicación del tratamiento radiante, para la misma reducción de riesgo relativo, podría ofrecer un menor beneficio en términos absolutos. A la luz de estos resultados se ha planteado que puede existir un grupo de pacientes que, dada las características

particulares de la presentación de su enfermedad, pueden presentar una baja probabilidad de recaída y no verse beneficiadas con la aplicación del tratamiento radiante [62, 78]. El punto sensible es cómo detectar a este grupo de pacientes que no se benefician de la aplicación de la radioterapia convencional. Éste es un tema de debate aún abierto en el cual se sugiere que es esencial realizar avances en el estudio y comprensión de nuevos marcadores moleculares y genéticos predictivos de recaídas locorregionales, respuesta al tratamiento y la supervivencia global, como así también poder incluir factores predictivos de la radionsensibilidad del tumor [79].

2.3.2. Rol de la radioterapia en el tratamiento del cáncer de mama

La evolución de la radioterapia ha sido acompañada por los diferentes avances tecnológicos que han impulsado su desarrollo introduciendo constantes mejoras que ofrecen una mayor calidad de entrega del tratamiento radiante. El uso de la radiación para el tratamiento del cáncer de mama fue reportado por primera vez luego de que en 1896 se emplearan fotones con un haz de ortovoltaje para tratar un carcinoma mamario inoperable [80]. Con el mismo objetivo, y un enfoque completamente diferente en cuanto a la forma de aplicación, en 1932 H. Keynes reportó el uso de agujas de radio implantables para el tratamiento del cáncer de mama [81]. Más allá de estos primeros reportes, ya en las etapas tempranas del desarrollo de la radioterapia, la definición de la extensión de la enfermedad se basaba en exámenes clínicos típicamente subestimando la extensión de la enfermedad; las técnicas de imágenes que se empleaban se realizaban con haces de kilovoltaje que poco permitían identificar los tejidos blandos, comprometiendo de esta manera volúmenes importantes de tejido en el tratamiento. Por otra parte, los haces de bajas energías disponibles en la radioterapia causaban complicaciones en tejidos sanos, principalmente la piel. Con el correr de los años y en especial en las últimas décadas, han habido avances significativos en la forma de entrega de la radioterapia. Esto incluye importantes avances en las técnicas de diagnóstico por imágenes, que han permitido mejorar apreciablemente la precisión en la definición del volumen blanco. Junto a ello, se han realizado avances que ofrecieron notables mejoras en la tecnología de aceleradores y el posicionamiento del paciente, todo esto acompañado por el desarrollo de la dosimetría computacional que ha generado programas especializados en la planificación de tratamientos. Estos avances han permitido lograr una gran precisión en la conformación de las distribuciones de dosis para cumplir con las principales metas de la radioterapia: lograr la mejor conformación en la entrega de dosis al tumor y disminuyendo al mismo tiempo la dosis en tejidos sanos. La posibilidad de poder reconstruir computacionalmente la forma y el volumen del tumor y de los órganos en riesgo permite obtener la distribución de dosis en todo el volumen de interés logrando optimizar la conformación y entrega de dosis en la planificación del tratamiento. Esta información sirve de parámetro de entrada para emplear otro tipo de figuras de mérito más complejas y de gran importancia en la evaluación de los tratamientos como son la *probabilidad de control tumoral* (TCP, por sus siglas en inglés) y la *probabilidad de complicación de tejidos sanos* (NTCP, por sus siglas en inglés).

Hoy en día, las principales formas de radioterapia incluyen la *radioterapia de haces externos* (EBRT, por sus siglas en inglés) y la *braquiterapia*. La radioterapia de haces externos es la forma más difundida y consiste en la entrega de diferentes campos externos de radiación con distintos grados de orientación con el objetivo de conformar la dosis prescrita en el volumen de tratamiento, que puede ser el tumor mismo o el lecho tumoral en el caso de una irradiación poscirugía. Dentro de las tecnologías asociadas a las diversas técnicas empleadas en la radioterapia de haces externos se pueden mencionar la radioterapia tridimensional conformada (3D-CRT), la radioterapia de intensidad modulada (IMRT), la radioterapia

guiada por imágenes (IGRT) y la radioterapia modulada de arco (VMAT). Todas las técnicas buscan mejorar la precisión de entrega de dosis en tumor minimizando a su vez la exposición de los órganos de riesgo y los tejido sanos circundantes. Como se mencionó anteriormente, para alcanzar este objetivo la evolución tecnológica del diagnóstico por imágenes tiene un rol preponderante: las diferentes técnicas de EBRT requieren la información de la forma y ubicación del tumor, como así también de los tejidos sanos circundantes provista, principalmente, por la tomografía computada y la resonancia magnética. Con esta información es posible recrear la geometría anatómica tridimensional del tumor y de los tejidos sanos implicados y emplear las mismas en la planificación del tratamiento, permitiendo encontrar la mejor configuración de haces para el tratamiento de cada paciente en particular.

En la EBRT tradicional la mayoría de los tratamientos se entregan con haces de radiación que poseen una intensidad uniforme en el campo de irradiación. Se pueden emplear diferentes dispositivos externos como cuñas o compensadores que permiten modificar la intensidad del haz y corregir irregularidades de acuerdo a lo requerido en el tratamiento, produciendo así distribuciones de dosis uniformes. En particular, la IMRT toma este principio de la 3D-CRT y tiene la capacidad de modular la intensidad del haz entregando una fluencia no uniforme de radiación al paciente desde cualquier posición del haz de tratamiento. Esto se logra empleando un colimador multihojas, las cuales se mueven en forma independiente con el objetivo de subdividir el haz de radiación en haces independientes más pequeños cada uno con una intensidad variable. El colimador multihojas puede variar su configuración a medida que la máquina rota alrededor del paciente generando de esta forma una conformación que se ajusta con mayor precisión a la forma del tumor. Otra tecnología, la IGRT, emplea imágenes que sirven de guía para el procedimiento de localización del blanco antes y durante el tratamiento. Este procedimiento emplea técnicas avanzadas para identificar y corregir problemas originados por posicionamiento del paciente, cambios en la anatomía, cambios de volumen y forma del blanco de tratamiento, órganos en riesgo y tejidos sanos circundantes.

Por otra parte, en cuanto al desarrollo de la braquiterapia, las primeras aplicaciones se realizaron empleando implantes intersticiales. Este procedimiento consiste en el posicionamiento temporal de una serie de agujas o catéteres (multicateter) en la mama de manera de abarcar la cavidad de la tumorectomía, y se lo denomina *braquiterapia multicateter*. Los catéteres luego son cargados con fuentes radioactivas y se entrega una dosis en la región de la cavidad en pocos días consecutivos. La dosis puede entregarse empleando baja o alta tasa de dosis (LDR o HDR, por sus siglas en inglés, respetivamente). Esta modalidad tiene asociada la complejidad de la introducción de cada uno de los catéteres con la consecuente incomodidad asociada de la paciente. Diferentes estudios han mostrado la efectividad de esta modalidad. En vistas de que la braquiterapia sea más accesible, y gracias a diferentes avances, se han desarrollado nuevas técnicas que hacen más sencilla su aplicación resultando en un mayor confort para la paciente. Estas técnicas se engloban en lo que se denomina *braquiterapia con aplicadores*, en la cual el aplicador se inserta por una única entrada en el lecho de la tumorectomía y se expande de forma de completar la cavidad. La inserción del aplicador es más sencilla para el operador y menos traumática que la braquiterapia multicateter. Existen diferentes marcas y modelos de estos aplicadores aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos como Mammosite®, Contura® o SAVI®, entre otros.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento del cáncer de mama depende de muchos factores, entre ellos, principalmente de su estadio, que determinarán la técnica quirúrgica a emplear y, dependiendo de esta última, la posterior aplicación de radioterapia.

El principal rol de la radioterapia en el cáncer de mama es el tratamiento de la enfermedad subclínica subsistente luego del tratamiento quirúrgico, con lo cual su aplicación e indicación dependen del tipo de cirugía empleada y de los factores de riesgo asociados a la recurrencia del tumor. Los volúmenes de interés en el tratamiento radiante pueden comprender entonces (siempre y cuando estos estén indicados)[66]:

- el lecho de mastectomía,
- el volumen mamario luego de la cirugía conservadora,
- la región de ganglios supraclaviculares, que tanto en mastectomía como en la terapia conservadora ha mostrado disminuir los riesgos de recaída,
- la región axilar, si bien tiene una baja indicación de radioterapia debido a la cirugía de vaciamiento de ganglios axilares,
- y en menor medida, y dependiendo de pautas institucionales, pueden incluirse o no los ganglios de la cadena mamaria interna.

Cabe destacar que tanto en la radioterapia posmastectomía como aquella que se aplica luego de la cirugía conservadora, se puede entregar un tratamiento adicional denominado *boost*, en el que se concentra mayor dosis en el sitio de la tumorectomía.

2.3.2.1. Radioterapia posmastectomía

Luego de la mastectomía puede aplicarse o no un esquema de radioterapia. Esta aplicación se aconseja en aquellas pacientes con alto riesgo de presentar una recaída de la enfermedad, principalmente las pacientes con tumores de más de 5 cm, con invasión de piel o pared torácica, o compromiso de más de 4 ganglios positivos. El esquema estándar de radioterapia con fotones contempla una dosis total de 45 a 50 Gy en fracciones de 1.8 a 2 Gy por día. En algunas pacientes puede indicarse la aplicación de un boost adicional en el lecho de mastectomía. A partir de numerosos estudios quedó demostrado que la *radioterapia posmastectomía* reduce el riesgo de recaída y de mortalidad en mujeres con nódulos positivos, siendo un estándar de tratamiento [82-85]. Por el contrario, en estos estudios el rol de la radioterapia en el grupo de pacientes con 1 a 3 nódulos positivos no era lo suficientemente claro. Con este motivo se condujo un estudio de metaanálisis que incluyó 8135 pacientes enroladas en diferentes ensayos clínicos entre los años 1964 y 1986, que recibieron radioterapia en pared torácica y ganglios linfáticos luego de la mastectomía y cirugía axilar comparado con pacientes a las cuales se les aplicó la misma cirugía pero sin radioterapia [86]. El total de las pacientes se dividió en 3 grupos de acuerdo a la presentación de nódulos axilares negativos (pN0, grupo 1), entre 1 a 3 nódulos positivos (pN1-3, grupo 2) y 4 o más nódulos positivos (pN4 o +, grupo 3). Con un seguimiento de hasta 10 años para la presentación de recaídas y hasta 2009 para la mortalidad, se evaluaron el riesgo de desarrollar recaídas locorregionales a 5 y 10 años, el riesgo de desarrollar recaídas globales (aparición de recaídas locorregionales o distantes) a 5 y 10 años y la mortalidad a 10 y 20 años. En este estudio se pudo observar que para las pacientes con nódulos negativos no hay diferencias estadísticamente significativas entre la aplicación de radioterapia y su no aplicación para los distintos índices mostrados. Por otra parte, se observó que en el grupo de pacientes con (pN1-3) la aplicación de radioterapia disminuyó el riesgo de aparición de recaídas locorregionales y globales y también disminuyó la mortalidad. Lo mismo ocurre para el grupo de pacientes

(pN4 o +), como ya había sido observado a partir de estudios anteriores. Los resultados de este trabajo muestran y confirman el beneficio que se logra con la aplicación de radioterapia posmastectomía tanto en pacientes (pN4 o +) como en el grupo de pacientes (pN1-3) que, como se mencionó de acuerdo a estudios anteriores, generaba controversias. En este sentido, las guías de tratamiento del Instituto Roffo sugieren la misma dirección: si bien no es un tratamiento estándar recomiendan su consideración [66]. El trabajo también resalta el hecho de que los efectos tóxicos de la aplicación de radioterapia pueden ser disminuidos o evitados con las técnicas de radioterapia moderna. Referido a esto último, cabe destacar que en los estudios randomizados del trabajo citado se han aplicado técnicas de radioterapia anteriores a las actuales [86] .

2.3.2.2. Radioterapia postratamiento conservador

El tratamiento más empleado en el cáncer de mama de estadio temprano es el tratamiento conservador con *irradiación de la mama completa* (o WBI, por sus siglas en inglés). Los beneficios de la radioterapia adyuvante en la sobrevida general y el control local de la enfermedad para mujeres con cáncer de mama temprano han quedado evidenciados en la revisión sistemática de numerosos ensayos clínicos involucrando un total de más de 10 mil pacientes. La irradiación de la mama completa con un esquema de fraccionamiento convencional de 25 fracciones completando una dosis total de 50 Gy en 5 semanas, con o sin un boost adicional [87], ha sido un estándar de tratamiento logrando disminuir el riesgo relativo de recurrencia en la mama ipsilateral en un 70 % a 5 años y produciendo una mejora absoluta del 5 % en la sobrevida general a 15 años [88]. La aplicación de este esquema de fraccionamiento se basa en que una menor dosis por fracción disminuye el riesgo de toxicidad tardía en tejidos normales sin comprometer el control del tumor debido a la diferente sensibilidad de los tejidos normales y las células tumorales al tamaño de la fracción.

A pesar de su probada efectividad, el esquema mencionado posee algunas desventajas como el tiempo de duración del tratamiento, que repercute en la asistencia de la paciente al centro de médico como así también en el costo logístico. Por otra parte, basados en datos del análisis retrospectivo de estudios clínicos, surgió la idea de que el cáncer de mama podría ser mucho más sensible a la dosis por fracción que otros tipos de tumores. Con esta base racional en los ensayos realizados en el Reino Unido denominados *START Trials A y B* (START A y START B) [89, 90] se propuso estudiar el efecto de la aplicación de esquemas de *radioterapia hipofraccionada*, es decir el empleo de dosis diarias mayores disminuyendo el total de fracciones que se deben administrar. Los resultados a 5 y a 10 años de seguimiento mostraron que disminuir la dosis total entregada en menos fracciones y aumentando la dosis por fracción es tan seguro y efectivo como la administración del regimen estándar de 50 Gy en 25 fracciones. El seguimiento a 10 años mostró la equivalencia en términos de efectividad, tolerancia y resultados cos-méticos de los esquemas de tratamiento de los ensayos START A y B respecto al tratamiento estándar, y en base a estos resultados en el Reino Unido se adoptó el esquema de 40 Gy en 15 fracciones como el estándar de radioterapia adyuvante [91]. Cabe mencionar que en la guía de consenso de irradiación de la mama completa publicada por la *American Society for Radiation Oncology* (ASTRO, por sus siglas en inglés) publicada en el año 2018 [92], para las pacientes de cualquier edad con carcinoma de mama invasor de cualquier estadio y que reciben tratamiento conservador con irradiación de la mama completa, con o sin inclusión de la zona axilar baja, y con cualquier tratamiento sistémico, se recomienda el esquema de hipofraccionamiento en 15 o 16 fracciones para completar una dosis total de 40 Gy o 42,5 Gy. Es importante destacar cómo evolucionan estas recomendaciones a partir de la información

recabada de los diferentes estudios que se realizan: en 2011 estas mismas guías sólo recomendaban la radioterapia hipofraccionada en pacientes mayores de 50 años, de estadios T1-2 N0 y sin quimioterapia [88].

El enfoque de la irradiación de la mama completa con o sin boost luego de la escisión del tumor se basa en dos principios: primero, se entrega mayor dosis al lecho tumoral en busca de controlar focos microscópicos de cáncer que pudieron haber sido dejados luego de la cirugía; y segundo, la irradiación se aplica con el fin de controlar posibles zonas ocultas de cáncer multicéntrico infiltrante en áreas remotas de la mama. Sin embargo, se ha cuestionado la necesidad de la irradiación de la mama completa: la evidencia recolectada en diferentes estudios ha mostrado que la mayoría de las recurrencias o recaídas de la enfermedad ocurren cerca de la ubicación del tumor primario (esto contempla el lugar de la tumorectomía y los tejidos inmediatamente adyacentes) y que la tasa de desarrollo de nuevos tumores en áreas remotas de la mama fue independiente de la administración de la irradiación en mama completa. Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, la irradiación de la mama completa como tratamiento estándar se administra durante varias semanas consecutivas, lo cual puede ocasionar problemas logísticos a las pacientes que trabajan, o que viven lejos de la clínica de tratamiento, o que poseen barreras socioeconómicas, entre otros. La preferencia de las pacientes por tratamientos de radioterapia administrados en menor tiempo se ha vuelto evidente desde la introducción del esquema hipofraccionado de irradiación de la mama completa, el cual reduce la duración del tratamiento a tres o cuatro semanas consecutivas. Como alternativa, surgió la propuesta de irradiar la mama en forma parcial, sólo el cuadrante de la tumorectomía. Esta propuesta se sumó a la idea de que sería posible identificar un grupo de pacientes con bajo riesgo de presentar recaídas y, junto con el hecho de que los avances tecnológicos permiten administrar la radiación en forma más localizada y precisa (recordar las definiciones de 3D-CRT, IMRT e IGRT), se confluó en el concepto de que la entrega de un esquema de radioterapia hipofraccionado acelerado más radical podría ser tolerado si sólo se trata una parte de la mama: al irradiar un volumen menor es posible administrar una dosis diaria aún mayor que la administrada en el volumen total pudiendo completarse el tratamiento según el esquema de fraccionamiento empleado en tiempos de entre una a dos semanas. De esta forma también se reduciría la toxicidad de los tejidos adyacentes normales y órganos en riesgo como por ejemplo el corazón, la pared torácica, el pulmón y la mama contralateral. Esto forma la base racional de lo que se conoce como *irradiación parcial acelerada* de la mama (IPA o APBI, por sus siglas en inglés) [93].

En la actualidad, el esquema de tratamiento y técnica de aplicación óptimos de la modalidad IPA no están completamente definidos, con lo cual aún no es considerado un tratamiento estándar. En este sentido, existen varios ensayos clínicos que poseen como objetivo evaluar diferentes parámetros relacionados al control de la enfermedad, la toxicidad en tejidos sanos, la supervivencia libre de recurrencia, la supervivencia general y la calidad de vida de las pacientes luego de la irradiación parcial acelerada de la mama ipsilateral con diferentes técnicas. En los diferentes ensayos estas técnicas se comparan con la técnica aceptada de irradiación completa de la mama con fraccionamiento estándar o hipofraccionado, siendo este último el esquema aconsejado en los diferentes consensos. A continuación se muestra una breve reseña de algunos de los principales ensayos clínicos asociados a la modalidad IPA.

El ensayo clínico *RTOG95-17* se diseñó para evaluar la factibilidad técnica y toxicidad asociada de la aplicación de braquiterapia confinada a la región de la cavidad de la tumorectomía en pacientes de cáncer de mama con estadio temprano tratadas con el tratamiento conservador de la mama. Entre los años 1997 y 2000 se enrolaron 100 pacientes que fueron tratadas con braquiterapia intersticial

multicateter, HDR o LDR, entregada dentro de las seis semanas luego de la cirugía. A las pacientes que recibieron el tratamiento HDR se les administró un esquema de 34 Gy en un total de 10 fracciones, 2 fracciones diarias con 6 horas o más entre fracciones durante 5 días, mientras que a las pacientes que recibieron el tratamiento con LDR se les administró 45 Gy en 3.5 a 5 días de tratamiento. El seguimiento a 5 años mostró muy buenos resultados en términos de cosmesis y de control de la enfermedad, lo cual fue confirmado en los resultados del seguimiento a 10 años [94, 95].

Si bien se han realizado numerosos estudios con resultados favorables en términos de control de la enfermedad y de cosmesis, la aplicación de la braquiterapia intersticial como modalidad IPA presenta una serie de inconvenientes relacionados principalmente a que ésta es una técnica invasiva y que, por otro lado, para su aplicación se requiere un equipamiento específico junto con profesionales especializados, lo cual puede limitar el acceso a las pacientes. Bajo estas consideraciones, y en vistas de que la EBRT es una radioterapia no invasiva y que todos los centros de radioterapia cuentan con aceleradores que permiten su aplicación, se propuso evaluar la radioterapia EBRT para su aplicación en IPA. El estudio prospectivo *RTOG 0319* examinó el uso de la radioterapia tridimensional conformada 3D-CRT como técnica para entregar el tratamiento con dicha modalidad. Se evaluó la reproducibilidad con el objetivo de demostrar si la técnica puede aplicarse en un estudio multicéntrico antes de iniciar un ensayo fase III. Entre 2003 y 2004 se enrolaron 58 pacientes que presentaban cáncer de mama ductal invasivo en estadio I o II con tumores menores a 3 cm, y se les administró un esquema de tratamiento de 38.5 Gy en 2 fracciones diarias de 3.85 Gy por fracción. El seguimiento a largo término mostró un control tumoral perdurable y mínima toxicidad de grado 3 a 7 años, comparable con otros estudios prospectivos de IPA. La tasa de recaída a 7 años fue de 7.7 % y no se reportaron toxicidades cardíacas o pulmonares. El *RTOG 0319* fue el primer estudio prospectivo en EEUU para evaluar la aplicación de IPA con la técnica 3D-CRT. Con un tiempo de seguimiento de 8 años se ha mostrado un control tumoral durable en la mama ipsilateral, en línea con otros ensayos. La mayor parte de las toxicidades grado 3 se reportaron varios años después del tratamiento, lo que demuestra la importancia de realizar seguimientos a largo plazo. Luego de haber quedado demostrada la factibilidad de aplicación en este ensayo, la técnica 3D-CRT como modalidad IPA fue incorporada en el estudio *NSABP B-39/RTOG 0413* [96-98].

El ensayo clínico *GEC-ESTRO* fue un estudio randomizado de no inferioridad propuesto para evaluar la aplicación de IPA para pacientes que presentaban carcinoma de mama invasivo de bajo riesgo o carcinoma ductal in situ y que recibieron tratamiento conservador comparado con la irradiación de la mama completa. El estudio enroló a 1184 pacientes entre 2004 y 2009 que luego de la cirugía conservadora se les asignó a tratamiento radiante IPA con braquiterapia multicateter o irradiación de la mama completa. Se evaluó la recaída local, el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia general de las pacientes. Las pacientes asignadas a la irradiación de la mama completa recibieron una dosis total de 50 a 50.4 Gy en 25 a 28 fracciones diarias de 1.8 a 2 Gy en un período de 5 semanas. Opcionalmente recibieron un boost con electrones en el lecho tumoral de 10 Gy en 5 fracciones. Por otra parte, las pacientes asignadas a IPA fueron planificadas previamente con imágenes de tomografía computada para la ubicación de los catéteres. Un grupo de pacientes del brazo de estudio correspondiente a IPA, recibió braquiterapia de alta tasa para completar un total de dosis de 32 Gy en 8 fracciones o 30.3 Gy en 7 fracciones, y dos fracciones diarias, mientras que otro grupo recibió *braquiterapia pulsada* (PDR) con 50 Gy de dosis total con pulsos de 0.6-0.8 Gy/h. Los resultados luego de 5 años de seguimiento mostraron que la IPA multicateter no fue inferior a la irradiación de la mama completa en términos de control local, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general. En vista de los resultados a 5

años de seguimiento el estudio mostró que la modalidad IPA multicateter es una alternativa válida para el tratamiento del cáncer de mama de bajo riesgo [99].

El ensayo clínico *NSABP B-39/RTOG0413* fue un estudio randomizado fase III diseñado para evaluar si la irradiación parcial de la mama proporciona un control local equivalente en comparación con la irradiación de mama completa luego de la cirugía conservadora para el cáncer de mama de estadio temprano. Como objetivo primario de análisis se estudió la ocurrencia de recaída ipsilateral, mientras que como objetivo secundario se analizaron el intervalo libre de recurrencia, la supervivencia libre de enfermedad a distancia y la supervivencia general, como así también aspectos relacionados con la calidad de vida, como la cosmesis, y síntomas asociados al tratamiento. Entre 2005 y 2013 se enrolaron 4216 pacientes con estadio 0 (DCIS) o estadio I o II (menor a 3 cm) de carcinoma invasor sin evidencia de metástasis distantes y fueron asignadas aleatoriamente a irradiación completa de la mama o a algunas de las modalidades IPA (EBRT o braquiterapia). El esquema de tratamiento de la irradiación completa comprendió la entrega de 25 fracciones diarias para completar una dosis total de 50 Gy en 5 semanas con o sin boost adicional en el lecho tumoral, mientras que la IPA EBRT se entregó en un total de 10 fracciones con 2 fracciones diarias separadas por un intervalo de al menos 6 hs en 5 días de tratamiento dentro de un período de tiempo de 8 días. La entrega del tratamiento IPA con braquiterapia incluyó la técnica multicateter o de entrada única HDR (Mammosite®, Contura® o SAVI®). Cabe destacar que este ensayo no tuvo como objetivo la comparación entre las distintas técnicas empleadas en la modalidad IPA. Si bien los primeros resultados de este estudio [93] mostraron que no se alcanzó el criterio de equivalencia respecto a la irradiación de la mama completa, en el control de la recaída se observó una diferencia absoluta menor al 1 % en la incidencia acumulada a 10 años, lo cual teniendo en cuenta las ventajas logísticas que presenta la modalidad IPA respecto de la irradiación de la mama completa, permite pensar que puede ser una alternativa aceptable para un selecto grupo de pacientes. Por otra parte, se observaron toxicidades similares en ambos grupos del estudio.

El ensayo clínico *RAPID* fue un estudio multicéntrico randomizado de no inferioridad que entre 2006 y 2011 reclutó a 2135 pacientes mayores de 40 años con carcinoma ductal in situ o carcinoma invasivo y que recibieron cirugía conservadora. Las pacientes fueron aleatoriamente asignadas a la modalidad IPA con haces externos a una dosis total de 38.5 Gy en 10 fracciones entregadas en dos fracciones por día, o irradiación completa de la mama 42.5 Gy en 16 fracciones una fracción diaria, o 50 Gy en 25 fracciones una fracción diaria. En aquellas pacientes con riesgo de presentar recaídas y que recibieron irradiación de la mama completa se les entregó un boost adicional de 10 Gy en 4 o 5 fracciones una fracción diaria, mientras que las pacientes asignadas a IPA no recibieron boost. Como resultado primario se propuso analizar la ocurrencia de recaída en la mama ipsilateral y como resultado secundario se propusieron estudiar la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de eventos (definida como el tiempo comprendido entre la asignación al brazo de estudio hasta la aparición de la recaída, aparición de cáncer en mama contralateral, cáncer secundario o muerte), supervivencia total, toxicidad, cosmesis y calidad de vida. Los primeros resultados de este estudio mostraron que la modalidad IPA no fue inferior a la irradiación de la mama completa en términos de aparición de recaídas. Si bien en el brazo IPA se observaron toxicidades agudas con menor frecuencia, la aplicación de este esquema estuvo asociado a un incremento de las toxicidades tardías y efectos cosméticos adversos. A la luz de estos resultados, el estudio recomendó no emplear como rutina en la práctica el esquema de 2 fracciones diarias. La IPA entregada como una fracción diaria puede no estar asociada a las toxicidades observadas en este estudio y recomiendan realizar más ensayos en este sentido [100].

Otra forma de radioterapia que se encuentra bajo ensayo clínico es la *radioterapia intraoperatoria* (IORT) que contempla la irradiación de la zona a tratar durante el procedimiento quirúrgico luego de la escisión del tumor. En particular, en el ensayo clínico *ELIOT* se enrolaron 1305 pacientes seleccionadas para el tratamiento conservador con el objetivo de evaluar la eficacia de la aplicación de la *radioterapia intraoperatoria con electrones* (IOERT) en comparación con el tratamiento estándar de radioterapia de la mama completa. La dosis prescrita fue de 21 Gy en una única aplicación. Por otra parte, el estudio *TARGIT-A* enroló a 3451 pacientes para ser tratadas con IORT con rayos-X de 50 kV luego de la escisión del tumor o con radioterapia convencional de la mama completa. Luego de un seguimiento de 5.8 años la tasa de recaídas en las pacientes tratadas con IOERT fue levemente mayor a las tratadas con EBRT, y si bien podría existir un grupo de pacientes para las cuales puede ser seguro la aplicación de esta modalidad, estos estudios recomiendan la espera de resultados con mayor tiempo de seguimiento [101-103].

A pesar de la información recabada por los diferentes ensayos clínicos y los buenos resultados obtenidos en varios de ellos, aún no se ha logrado consensuar pautas que permitan establecer las técnicas de IPA como una modalidad de tratamiento estándar. Si bien los resultados en términos de control de la enfermedad, toxicidad y calidad de vida de las pacientes son alentadores, existen algunos inconvenientes a la hora de interpretar lo observado en las distintas modalidades examinadas y que resultan de diferencias en el diseño estadístico y de análisis de los mismos. Además, varios trabajos recomiendan continuar los estudios y esperar los resultados de otros importantes ensayos clínicos como *IRMA* [104], *SHARE* [105], *ELIOT*, *TARGIT*, entre otros. Más allá de estas observaciones, los resultados obtenidos permiten proyectar que la modalidad IPA tendrá un lugar en los consensos de tratamiento estándar. El desafío será poder seleccionar el tratamiento más adecuado a las pacientes individuales tendiendo a una radioterapia personalizada y basada en la biología del tumor.

2.4. Recaída de la enfermedad

2.4.1. Definición y clasificación

Una condición mencionada con anterioridad se presenta cuando luego del tratamiento la paciente recae en la enfermedad. El término *recurrencia*, *recidiva* o *recaída* de la enfermedad está relacionado a una nueva aparición de la enfermedad luego de haber sido tratado el tumor primario. Puede no ser sencillo determinar si la lesión en cuestión se trata de una verdadera recaída o un nuevo primario, esto se determina teniendo en cuenta el tipo histológico junto con el análisis molecular y la localización de la recaída en comparación con la lesión inicial. De acuerdo a distintos trabajos, el tiempo a la aparición de la recurrencia es significativamente menor en pacientes con una recaída verdadera comparada con un nuevo primario [106]. Cabe destacar que la distinción entre estas dos entidades no modifica el tratamiento a realizar.

Según las pautas oncológicas establecidas por el Instituto Roffo [66], las recurrencias deben interpretarse teniendo en cuenta su presentación y el tratamiento primario administrado. De acuerdo a su extensión, compromiso de tejidos vecinos, metástasis a distancia y velocidad de crecimiento se las puede clasificar en cuatro grupos:

- lesiones locales limitadas o no extensas con baja velocidad de crecimiento sin enfermedad sistémica,

- lesiones locales limitadas o no extensas con enfermedad metastásica concomitante,
- lesiones avanzadas, de rápido crecimiento, extensas y sin compromiso metastásico,
- lesiones avanzadas, de rápidos crecimiento, extensas y con compromiso metastásico.

A partir de esta clasificación, y en términos generales de tratamiento, a los grupos con compromiso metastásico se les administra tratamiento sistémico y el compromiso local se evalúa de acuerdo a la evolución de la enfermedad. En los grupos sin compromiso metastásico el tratamiento se realiza teniendo en cuenta la velocidad de crecimiento. De esta manera, al grupo de rápido crecimiento se le administra terapia sistémica para evitar la diseminación de la enfermedad, mientras que para el grupo de lento crecimiento el tratamiento principal es la cirugía [66].

En relación al tratamiento quirúrgico y la localización de la recaída respecto a la ubicación del tumor primario, se pueden clasificar como *recaídas locales* o *recaídas regionales*. En el caso de estas últimas pueden presentarse comprometiendo territorio ganglionar extendiéndose a la zona axilar, la fosa supraclavicular o la cadena mamaria interna [66, 107]. Si bien la reducción de volúmenes ayuda al control de la enfermedad, la cirugía no garantiza que no vaya a presentarse una recaída, con lo cual, en muchos casos luego de la cirugía se administra tratamiento adyuvante, ya sea radioterapia para el control local o terapia sistémica para disminuir el riesgo de diseminación de la enfermedad. En general, el pronóstico de las recaídas en pacientes tratadas con terapia conservadora es mejor que el de las pacientes con recaída en el lecho de mastectomía. Muchas veces las recaídas en lecho de mastectomía y regionales son la primera evidencia de una enfermedad metastásica ya avanzada.

En cuanto a la frecuencia de aparición de recaídas, en general, las tasas reportadas corresponden a estudios randomizados y estudios retrospectivos realizados por distintas instituciones. Los estudios retrospectivos pueden abarcar pacientes tratadas a lo largo de varias décadas y entre ellos presentan variaciones que pueden llegar a ser muy significativas y están vinculadas principalmente a los distintos criterios empleados ya sea en el tratamiento quirúrgico primario, en el tratamiento adyuvante, o a otras variables, como puede ser el tiempo de seguimiento de las pacientes. Las diferencias de criterios quirúrgicos están relacionados principalmente a los márgenes quirúrgicos empleados y al manejo de los nódulos axilares. Incluso algunos trabajos hacen referencia a que la variabilidad de las tasas de recaídas reportadas pueden estar vinculadas a las diferencias de definición de las recaídas en cuanto a su localización y/o extensión [107-109].

A partir de estudios retrospectivos realizados en muestras de tumor conservadas de pacientes tratadas, se ha observado que los tumores de subtipo *luminal-B*, *HER2+* y *triple negativos* están asociados a un incremento del riesgo de desarrollo de recurrencias locorregionales luego del tratamiento primario mediante mastectomía o terapia conservadora [110-113].

2.4.2. Recaída local posmastectomía

El sitio de recaída local posmastectomía más frecuente es la región mamaria de la pared torácica ipsilateral, ya sea cutánea o en depósitos subcutáneos, pudiendo involucrar además la cicatriz quirúrgica de la mastectomía [107, 109, 114]. La recaída en el lecho de mastectomía puede presentarse como un fenómeno único, pero además puede ser un indicio del desarrollo de metástasis distantes. En relación a esto, varios trabajos consultados sobre estudios retrospectivos de pacientes tratadas distinguen entre

la presentación de recurrencias locales como evento único o con recurrencias distantes (enfermedad diseminada) en forma sincrónica o metacrónica, y cada una de estas presentaciones, como son entidades diferentes, están asociadas a distintas tasas de recaídas y tiempo de aparición. Por otra parte, es importante poder distinguir entre estas recaídas ya que el manejo del tratamiento es diferente en los distintos casos. Si bien se toma como criterio el tiempo entre recaída local y recaída distante para determinar si una recaída se presenta como evento único o no, no existe una definición estándar [115]. Dadas las diferentes formas de presentación de las recaídas, en esta breve reseña sólo se hará énfasis en las recaídas locales como evento único.

Los estudios retrospectivos consultados se basan en experiencias de cada institución que adoptan criterios quirúrgicos estándares propios. Como ejemplo de esto, en un estudio las pacientes fueron tratadas por mastectomía y como criterio para el tratamiento adyuvante a aquellas pacientes que presentaban un tamaño tumoral avanzado (T3 o T4) y más de 10 nódulos axilares positivos se les aplicó terapia radiante, mientras que la terapia sistémica se administró a aquellas pacientes con primario mayor a 1 cm. La tasa total de recaídas fue del 8.8 %, de las cuales el 2.6 % se presentó como evento único, el 3.2 % asociadas a recaídas distantes sincrónicas y el 2.9 % asociadas a recaídas distantes metacrónicas. En el caso de las recaídas como evento único la mediana del tiempo de aparición fue de 2.1 años (rango entre 0.8 a 7.2 años) [109]. En otro estudio, las pacientes fueron tratadas quirúrgicamente y como criterio se realizó un alto número de disecciones de nódulos axilares por paciente (mediana de 19 nódulos, rango de 10 a 53 nódulos) y se aplicó terapia adyuvante que consistió en quimioterapia y radioterapia de acuerdo a las características de cada paciente. La tasa de recurrencia total fue de 3.7 %, de las cuales el 2.4 % se presentaron como recaídas locales en pared torácica como evento único [115]. Las tasas de recaídas reportadas en estos estudios son similares a las reportadas en la experiencia en nuestro país, las cuales pueden variar entre 3 y 5 %. En general, las recaídas locales se observan dentro de los 5 años luego del diagnóstico del primario. En particular, un estudio analiza la tasa de recurrencias en función del estadio del primario al momento de la mastectomía, encontrando que las pacientes en estadio III presentaron una mayor tasa de recaída en comparación con las pacientes en estadio I [114, 116]. El tamaño del primario junto con el número de nódulos axilares positivos han sido reconocidos como factores de riesgo vinculados a la presentación de recaídas postmastectomía.

En cuanto al tratamiento de la recaída, siempre que sea posible, la cirugía es la primera opción. Si previamente no se administró radioterapia entonces el tratamiento óptimo consiste en la resección completa seguido por la administración de radioterapia en la pared torácica y en los nódulos con un esquema estándar de 50 Gy de dosis total entregada en fracciones de 2 Gy, siendo posible la aplicación de un boost adicional. A este esquema se le puede agregar la terapia sistémica y en pacientes con receptores positivos es recomendable la administración de terapia endócrina [117]. Por otra parte, en las pacientes que previamente han recibido radioterapia como parte del tratamiento del tumor primario, frente a la recaída las opciones de tratamiento son más limitadas. Si bien en estudios retrospectivos se ha demostrado la reirradiación con buenos resultados en términos de morbilidad aguda y tardía y buenos resultados en el control de la recaída, la reirradiación debe ser empleada con cautela debido al incremento de la probabilidad de complicaciones en los tejidos sanos comprometidos [118].

2.4.3. Recaída local postratamiento conservador

Si bien el tratamiento conservador es el más aceptado, de acuerdo a publicaciones extranjeras en los casos de estadios tempranos de la enfermedad la incidencia de recaídas locorregionales luego

del tratamiento conservador varía entre 5 y 22 %. Se ha observado en distintos estudios que el tipo de recurrencia más común aparece en el mismo sitio que el tumor primario, lo cual puede estar indicando una resección quirúrgica incompleta. El segundo tipo más común recae dentro del mismo cuadrante en el que se encontraba el tumor primario pero no sobre la cicatriz quirúrgica, mientras que el tercer tipo lo conforman las recaídas que se presentan en un cuadrante diferente a la presentación del primario. Algunos trabajos muestran un análisis interesante de la presentación de la recurrencia respecto a su tiempo de aparición desde la cirugía: a mayor tiempo de aparición de la recaída es más probable que la misma se ubique en un área remota de la mama tratada. De acuerdo a estos trabajos, las recaídas que se presentan en la vecindad del tumor primario tratado lo hacen en un promedio de 33 meses luego de la terapia conservadora, mientras que las recaídas locorregionales distantes lo hacen en promedio 75 meses después de la terapia conservadora [119-121]. Por otra parte, a partir de los resultados de varios trabajos, se ha establecido que algunos de los factores de riesgo asociados a la recaída postratamiento conservador son los márgenes quirúrgicos o márgenes de resección de tumor positivos (aunque existe controversia en la definición de los mismos), la histología del tumor primario, la edad de la paciente, el estado de receptores endócrinos, como así también el subtipo molecular [107, 113, 121].

En cuanto a la presentación de este tipo de recaídas en nuestro país, existen varios estudios que muestran un análisis retrospectivo sobre estos casos junto al análisis de posibles factores pronósticos de recaída. Se consultaron trabajos presentados entre los años 2004 y 2012 realizados en hospitales públicos con pacientes tratadas entre los años 1986 y 2005 y con un tiempo de seguimiento medio que varía entre 76 a 124 meses, de acuerdo a cada publicación. En los trabajos revisados el tratamiento del primario consistió en cirugía conservadora combinada con terapia radiante y tratamiento sistémico adyuvante. El tratamiento quirúrgico puede variar de acuerdo al tipo de cáncer: en el caso del carcinoma infiltrante se puede realizar vaciamiento axilar, mientras que en el caso del carcinoma *in situ* el vaciamiento no se practica. El esquema de terapia radiante consistió generalmente en el tratamiento del volumen total de la mama preservada con una dosis fraccionada prescrita de 50 Gy más un boost de 20 Gy en el lecho de la segmentación. La tasa de recaída en las pacientes tratadas fue muy similar en todos los estudios y varía entre 9 % y 10.2 %, diferente a lo presentado en trabajos internacionales que, de acuerdo a distintas publicaciones, puede alcanzar tasas cercanas al 30 %. El tiempo medio de aparición fue de alrededor de 55 meses. Según uno de los trabajos consultados, en cuanto a las recaídas propiamente dichas, de acuerdo al compromiso de los tejidos se las puede diferenciar entre glandulares, que sólo afectan el parénquima glandular, y glándulo-cutáneas que, además de comprometer el parénquima glandular, también comprometen la piel. Del estudio de esta clasificación se ha observado que las recurrencias glándulo-cutáneas se presentan en menor proporción y antes que las recurrencias glandulares puras. Además, las recurrencias glándulo-cutáneas están asociadas a un mayor riesgo de progresión a enfermedad metastásica [108, 122, 123].

Por otra parte, de las distintas variables estudiadas como posibles factores de riesgo, los trabajos coinciden en que la edad es un factor de riesgo estadísticamente significativo asociado a recaídas mamarias luego del tratamiento conservador. En uno de los trabajos se estableció esta variable como factor de riesgo en pacientes menores a 45 años mientras que en otros la edad de corte fue de 55 años. Sólo uno de los trabajos estableció además, como factores de riesgo, el compromiso axilar y la presencia de factores de mal pronóstico histológico. El mismo trabajo encontró a los márgenes quirúrgicos inferiores a 5 mm y el tamaño del primario (mayor a 2 cm) como factores significativos pero, a partir del análisis univariable y multivariable, estadísticamente no tan fuertemente vinculados a recaídas mamarias. Los

otros dos trabajos encontraron una fuerte asociación de los márgenes inferiores a 5 mm, aunque uno de ellos concluye en que es necesario realizar mayor número de estudios prospectivos de manera de establecer la relación entre estos factores y la presentación de recaídas locorregionales [108, 122, 123].

El pronóstico de las pacientes con recaídas locales luego del tratamiento conservador es mejor que el de las pacientes con recaídas en pared torácica luego de la mastectomía. Entre las opciones de tratamiento de las recaídas, la mastectomía radical es el tratamiento de elección. De acuerdo a diferentes publicaciones, la incidencia de una segunda recaída luego de la mastectomía de rescate varía entre 4 y 37 % con una mediana de tiempo de aparición de 18 meses [121]. Como alternativas analizadas a este tratamiento, ya sea en ensayos clínicos o en estudios de menor proporción, surgen la mastectomía más reirradiación posoperatoria, segunda cirugía conservadora sin tratamiento radiante y segunda cirugía conservadora más terapia radiante. En los casos en que no se aplica terapia radiante posquirúrgica, la tasa de aparición de una segunda recaída de la enfermedad se ve aumentada. Se debe considerar que las pacientes ya recibieron terapia radiante para el tratamiento del primario con lo cual su uso puede ser limitado. En los estudios que han probado esta modalidad se han observado eventos de toxicidad tardía grado 3 (fibrosis, infección, linfedema) y 4 (dermatitis) con una tasa que varía entre el 3 y 11 %. Los tratamientos radiantes mayormente ofrecidos fueron con la modalidad braquiterapia y, en menor medida, la irradiación con haces de electrones y radioterapia posoperatoria. Por otra parte, el ensayo clínico fase II *RTOG 1014* propuso estudiar en forma prospectiva el control local, supervivencia total y la tolerancia de los tejidos asociados a la reirradiación del lecho tumoral con radioterapia externa tridimensional luego de la cirugía conservadora de rescate como alternativa a la mastectomía. El estudio enroló pacientes entre 2010 y 2013 que hayan experimentado una recaída unifocal menor a 3 cm en la mama ipsilateral luego de 1 año posterior al tratamiento conservador con irradiación completa de la mama y con márgenes quirúrgicos negativos. La reirradiación en este estudio consistió en una dosis total de 45 Gy entregada en fracciones de 1.5 Gy dos veces por día durante 15 días empleando la técnica de radioterapia tridimensional conformada 3D-CRT. El tiempo medio de seguimiento fue de 5.5 años. En este estudio se encontró que esta opción de tratamiento es viable, presentando baja tasa de incidencia de una nueva recaída luego de la cirugía conservadora con reirradiación, la toxicidad en términos de piel, fibrosis y dolor fue aceptable con una tasa baja de casos de toxicidad tardía de grado 3. Los resultados de este estudio sugieren que el tratamiento conservador con reirradiación de la mama ipsilateral puede ser una alternativa para pacientes que no quieren pasar por una mastectomía [124].

2.4.4. Recaída regional

Las recaídas regionales se presentan con poca frecuencia en comparación con las recaídas locales. Las pacientes con este tipo de recurrencias poseen un mal pronóstico ya que están vinculadas a una mayor probabilidad de desarrollar metástasis distantes. Son más difíciles de manejar que los casos de recurrencia local y en general están asociadas a una mayor morbilidad.

En el caso de las recurrencias axilares, como evento único son poco comunes. Luego de una adecuada disección de nódulos axilares, la recaída axilar es un evento que se presenta con una frecuencia de aparición que varía entre 1 a 3 % de acuerdo a lo reportado en varios estudios, mientras que el tiempo medio en el que se presentan luego del tratamiento primario puede variar entre 2.2 y 2.6 años. La sobrevida a 5 años en pacientes con recaídas axilares varía de acuerdo a distintos reportes entre 27 y 49 %. La disección de los nódulos axilares puede mejorar la sobrevida [125]. En nuestro país, algunos estudios retrospectivos reportan una tasa de recaídas axilares de 0.7 % dentro del rango esperable de

entre 0.3 y 2 % [108].

Por otra parte, las recaídas en fosa supraclavicular poseen una frecuencia de aparición baja, entre 1 y 2 % respecto del total de las pacientes tratadas por el tumor primario. Se presenta generalmente a nivel de ganglio y anatómicamente es medible con tomografía o resonancia magnética. En general, el pronóstico de la recurrencia supraclavicular es peor que el de otras recurrencias regionales pero mejor que el asociado a metástasis distantes. El tratamiento para la recurrencia supraclavicular varía de acuerdo a criterios de cada institución. En general, se recomienda cirugía, radioterapia o ambas como tratamiento curativo. Para las pacientes que reciben sólo cirugía como tratamiento curativo la tasa de aparición de una segunda recaída es alta, y también lo es para aquellas pacientes que reciben radioterapia en campos chicos y dosis bajas.

Debido a la baja frecuencia con la que se presentan estos eventos, los estudios que examinan este tipo de recaída poseen escasas muestras con lo cual se dificulta la posibilidad de establecer un manejo óptimo de la enfermedad. De acuerdo a diferentes publicaciones, la terapia sistémica para el tratamiento de recurrencias regionales se administra principalmente teniendo en cuenta el estado avanzado de la enfermedad al presentar recurrencias. Las pacientes que reciben modalidades de tratamiento como cirugía y radioterapia junto con terapia sistémica han mostrado una mayor sobrevida sin evolución de la enfermedad y una mayor sobrevida general en comparación con las mismas modalidades aplicadas en forma separada [107, 109, 126, 127].

2.5. Cáncer de mama subtipo HER2+

2.5.1. Familia de receptores ErbB. Receptor ErbB2

Las células eucariotas poseen una gran variedad de genes que codifican las proteínas que funcionan como receptores y que se alojan en la membrana celular. Los receptores en membrana pueden clasificarse en distintos grupos de acuerdo a los ligandos que reconocen, las respuestas biológicas que inducen, y también a sus estructuras primarias. Entre estas clasificaciones existe un grupo de receptores denominados *receptores tirosina quinasa* (RTKs, por sus siglas en inglés), que tienen como función catalizar la transferencia de un fosfato gamma del ATP (un nucleótido fundamental empleado en los procesos de obtención de energía en la célula) a grupos hidroxilos de tirosinas en proteínas blanco. Esta fosforilación posee implicancias esenciales en la transducción de señales biológicas en las células. La estructura de todos los RTKs está compuesta por un dominio extracelular de unión de ligando y un dominio citoplasmático, ambos unidos a través de una hélice que atraviesa la membrana celular [128]. Los RTKs tienen un rol esencial en el control de una gran cantidad de procesos celulares fundamentales como el ciclo celular, la migración celular, el metabolismo y supervivencia celular, la proliferación y diferenciación celular. Se ha encontrado que la desregulación de los RTKs está presente en el desarrollo del cáncer, de la diabetes y de las enfermedades autoinmunes, como así también en una gran variedad de desórdenes del tipo cardiovascular, inflamatorio y nervioso [129]. Entre las diferentes familias de RTKs existe una en particular que, además de su rol preponderante en la fisiología normal, posee un rol importante en el cáncer y cuyo estudio fue fundamental para el entendimiento y el desarrollo de estrategias contra esta enfermedad: la *familia de receptores tirosina quinasa ErbB/HER*. Esta familia consiste de cuatro receptores denominados ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4, codificados por los genes *ERBB1*, *ERBB2*, *ERBB3* y *ERBB4*. El nombre del gen *ERBB* deriva del oncogen del virus de la eritroblastosis

aviar, y la denominación HER hace foco en el receptor humano (*Human Epidermal growth factor Receptor*). Los diferentes receptores de esta familia poseen nombres alternativos que son sinónimos entre ellos: ErbB1/EGFR1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 y ErbB4/HER4.

Típicamente, cuando un ligando se une a los receptores estimula una serie de mecanismos que causan la formación de *homodímeros* (unión de receptores del mismo tipo) o *heterodímeros* (unión entre receptores de distinto tipo) y que derivan en la activación de una cascada de señalización interna. En particular, la familia de proteínas Erb/HER posee una serie de características relevantes: mientras que existen dos grupos de ligandos que reconocen a los receptores HER1 y HER4, el receptor HER2 no posee un ligando conocido y, por otra parte, el receptor HER3, si bien posee dos ligandos conocidos, no tiene la capacidad de fosforilar si no es en presencia de la formación de un heterodímero con otro receptor [128, 130, 131]. Si bien los receptores HER2 y HER3 no pueden iniciar el proceso de señalización en forma aislada, la señalización se potencia y amplifica cuando forman heterodímeros con HER1 o HER4, y cuando se forma el heterodímero HER2-HER3 esta señalización es especialmente potente. Así HER2 actúa formando heterodímeros HER2-HER1, HER2-HER3 y HER2-HER4 cuando los demás receptores son estimulados por sus ligandos. Esto le confiere una característica particular a los tumores que sobreexpresan el receptor HER2: un mayor número de receptores en membrana confiere mayor sensibilidad a los factores de crecimiento con la consecuente sobreestimulación de la proliferación y crecimiento de las células tumorales. Algunas de las vías de señalización interna implicadas son la *PI3K/AKT* y *Ras/Raf/MEK/MAPK* [132] y es importante estudiar y entender estas vías de señalización porque poseen implicancias directas en el diseño y desarrollo de estrategias contra el cáncer.

2.5.2. Definición, detección y tratamiento

Como fue mencionado y definido anteriormente, el *cáncer de mama subtipo HER2+* (HER2+) se caracteriza por sobreexpresar la proteína transmembrana HER2. Esta proteína posee actividad de regulación de aspectos importantes de la fisiología, crecimiento y diferenciación celular y en este subtipo de cáncer puede estar sobreexpresada hasta 100 veces en la superficie de las células tumorales. En base a estudios retrospectivos, se ha determinado que este subtipo de cáncer de mama es muy poco diferenciado, posee alto grado y alta tasa de proliferación y presenta relativa resistencia a ciertos tratamientos estándar de quimioterapia. Dadas estas características, está asociado a una reducción de la supervivencia global y a un corto período hasta la recidiva de la enfermedad, confiriendo un mal pronóstico para las pacientes [133-136]. La proteína HER2 se encuentra sobreexpresada en aproximadamente el 20 % de los casos de cáncer de mama de acuerdo a lo publicado en diferentes estudios extranjeros [135-138]. En Argentina, según datos estadísticos que se desprenden del Programa Nacional de Detección de la Sobreexpresión del HER2, la prevalencia de cáncer de mama HER2+ fue de 13,2 % respecto de una población de 34640 casos analizados entre 2005 y 2010 [139].

Existen diferentes métodos que se emplean en la detección de este subtipo de cáncer. El método más ampliamente usado es la detección por *inmunohistoquímica* (IHC, por sus siglas en inglés), que involucra la evaluación de una muestra histológica fijada en parafina y que se expone a un anticuerpo monoclonal específico que se une a la proteína HER2. En el año 1998, la FDA aprobó para su uso comercial el ensayo diagnóstico para la evaluación de la sobreexpresión del HER2, denominado *HercepTest* (Dako North America, Inc.), con el objetivo de identificar aquellas pacientes pasibles de tratamiento por terapia dirigida basado en una puntuación o *score* que abarca los niveles 0-3+, siendo 0 negativo y 3+ indicador de tratamiento bajo esta modalidad. La técnica IHC sólo detecta la proteína en membrana y

existen casos en los que el score de esta técnica no es determinante. En estos casos se emplea un método complementario que se basa en la detección de la amplificación del gen que codifica la proteína en membrana denominado *hibridación fluorescente in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) y que se emplea en complemento con la información provista por la técnica IHC. En varios estudios se ha reportado la existencia de falsos negativos por la técnica IHC que pudieron resolverse como positivos por la técnica FISH [140]. Es por esto que en aquellos casos de resultado dudoso se sugiere el empleo de la técnica FISH como complemento [141, 142]. Existen guías de consenso que determinan y recomiendan lineamientos en el empleo de estas técnicas, estandarizando el empleo de los diferentes reactivos necesarios para la aplicación de las técnicas en laboratorio y estableciendo límites de corte para establecer las diferentes puntuaciones en la detección [143].

Si bien el cáncer de mama HER2+ está asociado a un mal pronóstico, la sobreexpresión de la proteína HER2 brinda la posibilidad del tratamiento con lo que se denominan *terapias dirigidas*. Dentro de esta modalidad se distingue el uso del *trastuzumab*, el primer anticuerpo monoclonal humanizado aprobado específicamente para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ en combinación con agentes citotóxicos, y comercializado bajo el nombre *Herceptin*® (Herceptin, Genentech Corporation, EEUU/Hoffman-Roche, Suiza) [144]. Este anticuerpo monoclonal consiste de dos sitios antígeno-específicos que se unen con alta afinidad al dominio extracelular del receptor HER2, el resto del anticuerpo es una inmunoglobulina IgG humana con la porción Fc conservada [138]. Se ha demostrado que cuando el trastuzumab se une al HER2 se bloquea la señalización interna que estimula el crecimiento celular, lográndose un marcado efecto antiproliferativo en la sobreexpresión del receptor [145, 146], mejorando la sobrevida y la calidad de vida de la paciente [135]. Entre 1995 y 1997 se llevó a cabo un ensayo clínico esencial para el cual se enrolaron 469 pacientes con el objetivo de evaluar la eficacia y seguridad del empleo de trastuzumab en combinación con diferentes agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ metastásico. Las pacientes que luego de la cirugía no habían recibido terapia adyuvante con *antraciclinas* fueron tratadas con *doxorubicina* y *ciclofosfamida* con o sin trastuzumab. Otras pacientes que habían recibido antraciclinas en adyuvancia fueron tratadas con *paclitaxel* combinado o no con trastuzumab. En este estudio se observó que aquellas pacientes que recibieron cualquier tratamiento de quimioterapia de primera línea en combinación con trastuzumab tuvieron un aumento del tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad, un incremento en la tasa de respuesta, una mayor duración de la respuesta, menor tasa de mortalidad a 1 año, mayor sobrevida y mayor reducción del riesgo de muerte, todo esto respecto de las pacientes que no recibieron trastuzumab. Con todos estos indicadores se mostró que, además de aumentar el tiempo transcurrido a la progresión de la enfermedad, la combinación de quimioterapia de primera línea con trastuzumab mejora la sobrevida total. Por otra parte, este estudio mostró una alta tasa de efectos cardiotóxicos en pacientes que habían recibido antraciclinas y, si bien se presentaron algunos casos severos, los síntomas mejoraron con tratamiento médico estándar. Este estudio recomendó evaluar cuidadosamente el empleo de trastuzumab en aquellas pacientes que previamente recibieron antraciclinas [145]. Otro estudio randomizado y multicéntrico enroló 186 pacientes entre 2000 y 2002 con el objetivo de evaluar el uso de trastuzumab combinado con *docetaxel* como primera línea comparado con la entrega de docetaxel únicamente, en pacientes con cáncer de mama HER2+ metastásico. Los resultados de este estudio mostraron que la combinación de docetaxel y trastuzumab fue superior a la administración única de docetaxel en términos de tasa de respuesta, sobrevida total y tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad. En cuanto a los efectos adversos, se observaron diferencias poco significativas entre ambos

grupos de pacientes [147]. En 2005 se presentaron los primeros resultados del estudio que combinó el análisis de resultados de dos ensayos clínicos, *NCCTG N9831* y *NSABP B-31*, diseñados en forma independiente con el fin de evaluar el tratamiento de quimioterapia con doxorubicina y ciclofosfamida seguido de paclitaxel con o sin trastuzumab para el cáncer de mama HER2+ en estadio temprano. El reporte de la actualización de los resultados mostró una mejora sustancial en la sobrevida de las pacientes tratadas con la combinación con trastuzumab mostrando además un marcada reducción de la recaída en la enfermedad [148]. A partir de diferentes ensayos clínicos, se mostró la efectividad y mejora de la sobrevida general de las pacientes con cáncer de mama HER2+ en estadio temprano o metastásico tratadas con quimioterapia adyuvante combinada con trastuzumab.

Desde su lanzamiento en 1998, el trastuzumab es la base terapéutica para las pacientes con cáncer de mama HER2+ y su administración está indicada en el esquema adyuvante del tratamiento de la enfermedad. Por otra parte, es importante señalar la existencia de efectos adversos relacionados a toxicidades agudas asociadas a la falla congestiva cardíaca, síntomas gastrointestinales y pulmonares [135]. Si bien la tasa de incidencia de toxicidades severas es baja, predominando las asociadas al corazón y siendo en la mayor parte de los casos tratables y reversibles con esquemas de tratamiento médico estándar, en varios ensayos clínicos no se permitió iniciar el tratamiento con trastuzumab en pacientes con síntomas de disfunción ventricular izquierda, isquemia cardíaca o arritmia. Se han estudiado algunas estrategias para prevenir la disfunción ventricular izquierda empleando agentes citotóxicos con el fin de evitar el empleo de antraciclinas [149].

A pesar de la inclusión exitosa del trastuzumab en los esquemas de tratamiento, existe un grupo de pacientes que no responden satisfactoriamente, con una alta tasa de pacientes que presentan metástasis a distancia durante el curso de la enfermedad. Diversos estudios revelan la existencia de mecanismos alternativos que otorgan resistencia a las células tumorales frente al bloqueo de la señalización de HER2 por la acción del trastuzumab [135, 136, 150-153]. La mejor comprensión de la biología del tumor y de los mecanismos que intervienen en las vías de señalización asociadas al receptor HER2 ha permitido el desarrollo y aprobación de nuevos agentes extendiendo el espectro de drogas enmarcadas en la terapia dirigida. Entre estas estrategias y desarrollos, caben mencionar los siguientes: *pertuzumab*, es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio II extracelular del receptor HER2, un dominio diferente al que se une el trastuzumab, previene la formación del heterodímero HER2-HER3 y se ha mostrado que la combinación *pertuzumab* + *taxano* + *trastuzumab* como terapia de primera línea en cáncer de mama HER2+ avanzado mejora la sobrevida libre de progresión y la sobrevida general [154]; *lapatinib* es un inhibidor tirosina quinasa, en los ensayos clínicos mostró mejorar la sobrevida libre de progresión combinado con *capecitabina* [155]; *trastuzumab-emtansina 1* (TDM-1) es la combinación de un anticuerpo monoclonal y una droga, al unirse a HER2 se internaliza en vesículas que son degradadas por lisosomas liberando la *emtansina* que es un agente antimetabólico. En diferentes ensayos este compuesto mejoró significativamente la sobrevida libre de progresión y la sobrevida general de las pacientes en comparación al tratamiento con *lapatinib* + *capecitabina* como segunda línea de tratamiento y como última línea de tratamiento en pacientes con HER2+ avanzado previamente tratadas con trastuzumab [156, 157]. Por otra parte, en los últimos años se han descrito varios mecanismos de resistencia a la terapia dirigida anti-HER2 que interfieren reactivando la señalización interna a través de vías de redundancia alternativas para la proliferación de las células tumorales. Algunos de éstos incluyen mecanismos compensatorios, como la activación de receptores tirosina quinasa alternativos de la familia HER (HER3) u otros receptores de membrana por fuera de esta familia como el *factor de crecimiento*

insuline-like 1 receptor (IGF-1R) y alteraciones en las vías de señalización, como la activación de la vía *PI3K/AKT/mTOR*, por niveles reducidos de genes supresores tumorales como *PTEN* y *INPP4-B* o por mutaciones en *PI3KCA* [153]. Entre las estrategias para superar la resistencia a terapias dirigidas, y a partir del suceso de la TDM-1, se encuentra la combinación de anticuerpos anti-HER2 combinados con drogas, existiendo varias de estas combinaciones en desarrollo. También existen avances en nuevos *inhibidores tirosina-quinasa* (TKIs, por sus siglas en inglés), que tienen como fin bloquear la familia de receptores HER actuando en el dominio intracelular. Estos poseen un menor peso molecular, lo cual los hace más aptos para penetrar las diferentes barreras biológicas y fisiológicas, como la barrera hematoencefálica, con el objetivo de brindar una opción terapéutica a las pacientes con metástasis en cerebro. Por último, existe un creciente interés en la expresión del antígeno específico tumoral *p95HER2*, una forma truncada del HER2 y que ocurre en un porcentaje considerable de casos de cáncer de mama HER2+ [158, 159].

2.5.3. Metástasis en sistema nervioso central

La metástasis en cerebro es un evento que se presenta con frecuencia durante el transcurso del desarrollo del cáncer. Los tumores malignos que presentan metástasis con mayor frecuencia y que están mayormente asociados a esta diseminación son el cáncer de pulmón (48 %), el cáncer de mama (15 %), el melanoma (9 %) y el cáncer colorrectal (5 %) [160]. Notoriamente, son más frecuentes las metástasis en cerebro que el desarrollo de tumores primarios en el mismo órgano. Si bien se presentan con menor frecuencia respecto a la presentación en cerebro, otros órganos que componen el sistema nervioso central (CNS) como la médula espinal, los nervios craneales, los ojos y la leptomeninge, también son blancos de diseminación metastásica y, junto a la presentación en cerebro, representan un mal pronóstico en el desarrollo de la enfermedad asociado a una mayor morbilidad y mortalidad en las pacientes [161, 162]. En particular, la metástasis leptomeníngea también es conocida como carcinomatosis leptomeníngea; se presenta cuando la diseminación alcanza las meninges y dada su agresividad y dificultad de tratamiento confieren un mal pronóstico para las pacientes [163].

Aproximadamente entre el 6 y 16 % de las pacientes con cáncer de mama avanzado desarrollan metástasis en cerebro [163-166]. Si bien esta tasa de frecuencia corresponde a lesiones que se diagnostican a partir de los síntomas clínicos que presentan las pacientes, algunos trabajos muestran estudios realizados en autopsias y revelan que la presencia de metástasis en cerebro puede alcanzar una frecuencia de entre 30 y 36 % [166-168]. Los síntomas clínicos presentados por las pacientes pueden incluir, en general, mareos, trastornos de la marcha, dolores de cabeza, vómitos, convulsiones, disfunción cognitiva y dificultades en el habla, entre otros síntomas. El diagnóstico se confirma a través de estudios de imágenes por tomografía computada o por imágenes de resonancia magnética, siendo esta última la técnica de diagnóstico con mayor sensibilidad [161]. En los últimos años se ha detectado un incremento en la incidencia de metástasis en cerebro. Se ha sugerido que este hecho puede estar fuertemente vinculado a que los tratamientos actuales prolongan el tiempo de supervivencia de las pacientes permitiendo la aparición de estas lesiones y, por otra parte, a la mejora de los métodos diagnósticos que permiten detectar lesiones que antes no eran posibles de detectar [166, 168, 169].

Como factores de riesgo asociados al desarrollo de metástasis en cerebro se han identificado las pacientes jóvenes (menores a 50 años), la presencia de metástasis viscerales, el tamaño del tumor y el subtipo de cáncer de mama. Referido al subtipo como factor de riesgo, a partir del trabajo realizado en varios estudios se ha determinado que los subtipos HER2+ y triple negativo son un factor de riesgo

independiente fuertemente asociado al desarrollo de metástasis en cerebro [167, 168, 170]. En especial, una publicación resume un conjunto de estudios en los que se muestra una baja incidencia de metástasis en cerebro en el caso del subtipo luminal y una alta incidencia en pacientes HER2+ y triple negativo, mientras que la supervivencia libre de metástasis en cerebro encontrada fue de 14, 18 y 34 meses para los subtipos triple negativo, HER2+ y luminal, respectivamente [168]. Como fue comentado anteriormente, las metástasis en cerebro en pacientes con cáncer de mama HER2+ presentan una mayor tasa de incidencia. Si bien de acuerdo a distintos estudios puede oscilar entre 25 y 37 %, algunos trabajos muestran una tasa de incidencia aún mayor que puede alcanzar incluso 53 % [165, 166, 170]. Relacionado a esto, en otra publicación se analizaron los resultados de un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de mama tratadas entre los años 1978 y 1999. Sobre 9524 pacientes tratadas y con una mediana de tiempo de seguimiento de 13 años, se observó que la incidencia acumulada de metástasis en pacientes con cáncer de mama HER2+ fue mayor que en pacientes HER2-, siendo de 4.2 % vs. 1.9 % a 5 años y 6.8 % vs. 3.5 % a 10 años. Cabe destacar que estas pacientes no fueron tratadas con trastuzumab o taxanos, lo cual sugiere que el subtipo HER2+ posee un comportamiento inherente de desarrollar metástasis en cerebro independientemente del tratamiento administrado [171]. Se ha postulado que el incremento de la incidencia de metástasis en cerebro en estas pacientes se puede explicar a partir de las mejoras en el tratamiento sistémico de la enfermedad y, en particular, por la administración de trastuzumab combinado con quimioterapia logrando una extensión del tiempo de supervivencia por el control de la enfermedad extracraneal. La extensión del tiempo de supervivencia sumado al hecho de que la molécula de trastuzumab no cruza la barrera hematoencefálica, permiten la aparición y establecimiento de metástasis en el cerebro que no pueden ser controladas con estos tratamientos [168, 170]. Cabe aclarar que los estudios no asocian el desarrollo de metástasis en cerebro al tratamiento con trastuzumab, sino que el control de la enfermedad extracraneal y el hecho de que el trastuzumab no atraviese la barrera hematoencefálica permiten el establecimiento de las lesiones en este órgano [172].

Respecto al tratamiento de pacientes con metástasis en el sistema nervioso central, los objetivos incluyen la paliación de síntomas, el control de la enfermedad neurológica, otorgar una buena calidad de vida y, si es posible, prolongar la supervivencia. En general, el tratamiento de las metástasis en cerebro dependen de varios factores, entre ellos, el pronóstico de la paciente, la presencia de síntomas, la cantidad y el tamaño de las metástasis y la terapia administrada previamente. El enfoque primario para el tratamiento de lesiones locales involucran la cirugía o radiocirugía estereotáctica combinadas o no con radioterapia holocraneal. La cirugía permite un pronto alivio de los síntomas de hipertensión craneal y una reducción de las convulsiones. En cuanto a la radioterapia, su administración depende de si se trata de una lesión única o de múltiples lesiones. En el primer caso se recomienda aplicar radiocirugía estereotáctica. En el caso de metástasis múltiples, se recomienda la administración de radioterapia holocraneal con un esquema de 30 Gy fraccionada en 10 aplicaciones. La radioterapia es efectiva en la paliación de síntomas neurológicos. Por otra parte, la aplicación de la radiocirugía estereotáctica depende de la ubicación de la lesión y de su tamaño y de si existen contraindicaciones médicas en caso de realizarse una cirugía [66].

De acuerdo a publicaciones recientes, no existen pautas de tratamiento establecidas para las metástasis en cerebro por cáncer de mama, y hacen referencia a las guías de la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) que emite recomendaciones basadas en el tratamiento de metástasis por otro tipo de tumores sólidos como el cáncer de pulmón de células pequeñas [166, 168]. La *American Society on Clinical Oncology* (ASCO) ha publicado recientemente una serie de recomendaciones, basadas en el consenso

de un panel de expertos, para el tratamiento específico de metástasis en cerebro por cáncer de mama HER2+. En la medida que sea indicado, en esta guía se recomienda que las pacientes con metástasis en cerebro deben recibir terapia local y sistémica. La terapia local incluye cirugía, radioterapia y radiocirugía estereotáctica. Por otra parte, en estas recomendaciones se insta a efectuar ensayos clínicos que proporcionen información más específica sobre la población HER2+ para tener mejor conocimiento y poder establecer pautas para el manejo del tratamiento de estas lesiones [173]. De acuerdo a distintos estudios, se ha mostrado que la combinación de cirugía y radioterapia o cirugía estereotáctica disminuye la probabilidad de una recaída pero no representa un claro impacto en la sobrevida de las pacientes [162, 168, 174]. La aplicación de radioterapia sin otra terapia muestra que la extensión de la sobrevida varía sólo entre 4 a 6 meses [161, 170]. En cuanto al tratamiento sistémico y a la terapia dirigida, si bien varias publicaciones estudian su administración mostrando una mejora en la sobrevida respecto a aquellas pacientes que no han recibido esta terapia, los resultados no son concluyentes y, hoy en día, no existen terapias aprobadas para su administración en pacientes con cáncer de mama y metástasis en cerebro [166, 175]. Debido al bloqueo de pasaje de drogas por la barrera hematoencefálica, y si bien la permeabilidad de la misma puede verse alterada en el caso de presencia de metástasis, la administración de agentes quimioterapéuticos es muy poco efectiva [166, 168, 174]. Respecto de la combinación de quimioterapia y terapias dirigidas, se han realizado ensayos clínicos con la administración de trastuzumab y lapatinib, en combinación con capecitabina para el tratamiento de segunda línea del cáncer de mama HER2+ en pacientes previamente tratadas con trastuzumab, antraciclinas y taxanos. En estos estudios se han logrado resultados alentadores pero se requieren más estudios para determinar el real impacto en la sobrevida de las pacientes. En el caso de uso de lapatinib, si bien los primeros estudios indicaban que podría cruzar la barrera hematoencefálica, nuevos resultados han demostrado que no siempre se distribuye en concentraciones altas que permitan el tratamiento de las lesiones. En este sentido, se han investigado nuevos agentes para el tratamiento de metástasis en cerebro junto con nuevas formas de administración [168].

En cuanto a la sobrevida, de acuerdo al tratamiento administrado luego del diagnóstico de metástasis en cerebro en pacientes con cáncer de mama HER2+, los estudios que alcanzan mayor sobrevida son aquellos en los que se administra trastuzumab en combinación con quimioterapia y radioterapia holocraneal. Por otra parte, la administración de radioterapia como única modalidad de tratamiento o sólo en combinación con quimioterapia no muestra resultados claros en la mejora de la sobrevida. Todos estos resultados muestran la necesidad de nuevas formas de tratamiento para esta población de pacientes [166].

3 | Estudio de dosimetría computacional

En este capítulo se presenta el estudio de dosimetría computacional con el objetivo de evaluar los requerimientos, y por ende, la factibilidad de la aplicación de BNCT en el tratamiento del cáncer de mama empleando la facilidad de irradiación de BNCT del reactor argentino RA-6. El trabajo expuesto en este capítulo parte de los conceptos presentados en el capítulo anterior y, fundamentalmente, de las definiciones realizadas por médicos especialistas que permitieron la individualización de aquellos casos clínicos de posible aplicación de la presente propuesta de tratamiento. En cuanto a la estrategia de trabajo, a partir de los casos clínicos identificados, se generaron distintos fantasmas antropomórficos computacionales para cada caso particular que fueron utilizados para la generación de datos referidos a la distribución de las diferentes componentes de dosis definidas en el esquema de BNCT. Este trabajo se llevó a cabo empleando el código de simulación de transporte de partículas MCNP y el modelo computacional de la fuente de partículas que caracteriza a la facilidad de irradiación mencionada. Esta información fue utilizada para realizar el análisis de dosimetría computacional identificando los distintos órganos sanos involucrados, teniendo en cuenta los parámetros de efectividad biológica y las limitaciones de dosis en cada uno de ellos junto con la dosis entregada al tumor. Con este fin, se escribió un programa computacional que, a partir de la información provista por la simulación de transporte de partículas y de los diferentes parámetros dosimétricos que caracterizan a los distintos tejidos, incluido el tumor, procesa las distribuciones de cada componente de dosis en cada órgano y genera herramientas analíticas, como histogramas de dosis-volumen. A partir de la aplicación de estas herramientas es posible definir y evaluar distintos requerimientos de distribución de concentración de boro y tiempos de irradiación. Por otra parte, y con el objetivo de brindar un aporte al cálculo dosimétrico relacionado a experimentos de cultivo celular para la obtención de parámetros útiles en los modelos radiobiológicos, se estudió y propuso una metodología para la irradiación de células. Finalmente, es importante destacar que los experimentos radiobiológicos proveen información esencial que luego es empleada en el formalismo de cálculo de dosis para realizar la correspondiente evaluación dosimétrica. En este sentido, en el presente capítulo se buscó generar y proveer de herramientas para un abordaje tan integral como sea posible del problema.

3.1. Base racional del presente estudio

A lo largo de la exposición realizada en el capítulo anterior, se buscó dar un marco que permita comprender los principales aspectos relacionados al cáncer de mama y su tratamiento, abordando específicamente el desarrollo y estado de la aplicación de la radioterapia en sus diferentes modalidades.

Si bien se han realizado importantes avances en el tratamiento del cáncer de mama, y más aún

en la comprensión de la importancia del diagnóstico temprano y la concientización de las pacientes sobre este punto, este tipo de cáncer, para un cierto grupo de pacientes, aún requiere de nuevos estudios, desarrollos y propuestas para su tratamiento. La experiencia alcanzada muestra la importancia del abordaje multidisciplinario, es decir, la combinación del tratamiento quirúrgico, de la radioterapia y de la quimioterapia, en cualquiera de sus modalidades.

Un caso de especial interés es el de las recaídas de la enfermedad. En particular, en cuanto a la aplicación de la radioterapia, y como lo muestran diferentes estudios y ensayos clínicos, este es un campo en el cual no existe aún consenso en las pautas de tratamiento. Estos estudios están mayormente vinculados a la radioterapia con fotones y electrones, en las modalidades de braquiterapia, IORT y EBRT (ver sección 2.3.2). En menor medida, existen estudios de aplicación de radioterapia con partículas, como la protonterapia [176-178]. Esta forma de radioterapia explota la característica específica que poseen los protones energéticos dada por su interacción con la materia y que ofrece una ventaja en cuanto al resguardo de los tejidos sanos en comparación con la radioterapia con fotones. Por su parte, y como se abordó en la sección 1.1, BNCT basa su efecto en la emisión de una partícula α y un ión ^7Li como productos de la reacción de captura neutrónica, ofreciendo la posibilidad de conformar una radioterapia selectiva que proporciona la capacidad de entregar una dosis de tratamiento preferencial en el tumor resguardando los tejidos sanos.

El tratamiento de las recaídas de cáncer de mama, e incluso de otros tipos de cáncer, presenta un desafío donde el campo de la radioterapia de hadrones puede tener un rol que permita ofrecer una posibilidad de tratamiento efectivo. A partir de lo expuesto, haciendo particular énfasis en BNCT, y tomando como punto de partida las propuestas de abordaje realizadas por el grupo de Jevremovic [37, 179, 180], se cree conveniente el estudio y desarrollo de la capacidad de tratamiento con esta modalidad de radioterapia. En vistas de esto, resulta primordial generar y proporcionar información a disposición de los médicos especialistas para profundizar el conocimiento y divulgación de BNCT, con el fin de construir en forma conjunta e interdisciplinaria una propuesta alternativa de tratamiento efectivo para estas pacientes. En este sentido, entre los objetivos del trabajo presentado en este capítulo, se busca explorar los casos abordados con el fin de proveer de información que sirva de herramienta de análisis y que permitan contemplar la aplicación de BNCT como una opción de tratamiento.

3.1.1. Casos clínicos identificados y casos de estudio

Tomando como base lo desarrollado en el capítulo anterior, se mantuvieron diferentes entrevistas con médicos especialistas, quienes muy amablemente dedicaron su tiempo para explicar y transmitir su visión y experiencia en los distintos aspectos relacionados al tratamiento del cáncer de mama y el seguimiento de la paciente. Junto con esto, han brindado las pautas necesarias requeridas para definir aquellos casos clínicos de interés con potencial de ser incluidos en la presente evaluación de factibilidad dosimétrica para la aplicación de BNCT¹. A continuación, se presentan brevemente el conjunto de casos

¹En el inicio del desarrollo de esta tesis, se realizaron consultas a diferentes profesionales del área médica. En forma local, las reuniones se mantuvieron con el Dr. Aníbal Nuñez de Pierro y el Dr. Daniel Allemand, médicos pertenecientes al Servicio de Ginecología del Hospital General de Agudos Dr. Juan A. Fernández de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Por otra parte, se mantuvo una reunión con la Dra. Leena Kankaaranta, médica oncóloga del Hospital Central de la Universidad de Helsinki, quien cuenta con una amplia experiencia en la aplicación clínica de BNCT en ese país. En este aspecto, se desea destacar que las reuniones se desarrollaron en un marco de enorme amabilidad y cordialidad, encontrando siempre buena predisposición para brindar el tiempo requerido para conformar la presente propuesta.

clínicos revisados.

Recaídas locales posmastectomía

El principal tratamiento local de la recaída posmastectomía en la pared torácica es la cirugía. En el caso de haberse aplicado radioterapia luego de la mastectomía en el primer tratamiento, ante la recaída de la enfermedad en lecho de mastectomía, una nueva aplicación de radioterapia podría comprometer los tejidos sanos ya irradiados, presentando mayor morbilidad debido a que los campos tangenciales abarcan volúmenes variables de pulmón e incluso pueden alcanzar el ventrículo izquierdo del corazón. La reducción de campos y de dosis total para el control debido a los efectos de toxicidad limitan el tratamiento adecuado de la enfermedad. Por otra parte, la terapia sistémica sólo se administra para el control de una posible diseminación de la enfermedad. Teniendo en cuenta estos aspectos, los casos de pacientes que recaen luego de la mastectomía representan un grupo con una necesidad real de tratamiento para el cual la aplicación de BNCT podría significar un potencial beneficio.

Recaídas locales postratamiento conservador

El tratamiento estándar de la recaída en la mama preservada hoy en día sigue siendo la mastectomía, con lo cual a las pacientes que fueron tratadas con el fin de preservar su mama, ante una recaída de la enfermedad, se les administra el tratamiento que en principio buscaron evitar, en referencia a la mastectomía. Considerando las limitaciones para controlar la recaída local con un segundo esquema de irradiación en términos de toxicidad de los tejidos sanos, las diferentes técnicas de radioterapia, buscan, a partir de los avances tecnológicos, conformar un tratamiento efectivo para este tipo de recaídas. En la misma línea de estas opciones que son evaluadas para su aplicación, BNCT podría presentarse como una opción para estos casos de recaídas.

Recaídas regionales

Este tipo de recaídas se caracteriza por conformar un conjunto heterogéneo en términos de presentación y con una baja tasa respecto a las demás recaídas. Las pacientes que presentan recaídas regionales, tanto en la zona axilar como en la supraclavicular, no cuentan con un tratamiento efectivo definido y conforman un grupo con una necesidad de tratamiento y que podrían ser contemplados en el estudio de factibilidad de aplicación de BNCT.

Metástasis en cerebro

En cuanto a los trabajos sobre estudios relacionados a distintos tratamientos, algunas publicaciones destacan que la ventaja en la sobrevida no se correlaciona con el control de las metástasis en cerebro, sino más bien con el mejor control de la enfermedad metastásica extracraneal en pacientes HER2+ que reciben trastuzumab (ver sección 2.5.2). Estas pacientes que logran aumentar el tiempo de sobrevida requieren un adecuado tratamiento de las lesiones en cerebro. En este sentido, los avances en el campo de la terapia dirigida es muy prometedor y actualmente se encuentran en estudio nuevas drogas y formas de administración que logren superar la barrera hematoencefálica. Por otra parte, en cuanto a la terapia radiante, la administración de radioterapia holocraneana es efectiva en la paliación de síntomas neurológicos, mientras que la aplicación de la radiocirugía estereotáctica depende de la ubicación de la lesión y de su tamaño, y de si existen contraindicaciones médicas en caso de realizarse una cirugía. En este aspecto, y en respuesta a la necesidad de tratamiento de este tipo de lesiones, la aplicación de BNCT

podría significar una ventaja dada por su selectividad biológica.

Del conjunto de casos presentados previamente, se seleccionaron aquellos vinculados a las recaídas locales postratamiento conservador y posmastectomía. Estos grupos representan la mayor proporción de pacientes respecto a los casos antes definidos, y si bien los casos de recaídas regionales junto con las metástasis en cerebro no serán analizadas en este trabajo, ya que la propuesta de tratamiento excede el de esta tesis, conforman un subconjunto que requiere una respuesta. En este sentido, desde este trabajo se alienta su futuro abordaje no solo desde el punto de vista dosimétrico sino también desde la entrega selectiva de compuestos borados.

La identificación de casos clínicos es fundamental para abordar el estudio dosimétrico computacional. En este sentido, permite establecer los órganos y tejidos intervinientes y que deben ser contemplados en la definición de la geometría sobre la cual se debe realizar el estudio dosimétrico. Una vez establecidos e identificados los órganos, es posible entonces conocer las limitaciones en términos de la dosis que éstos pueden recibir. Esta definición posee una gran importancia ya que permite conocer la dosis máxima en un órgano dado para limitar así efectos agudos o crónicos indeseables en un tratamiento radiante pero, al mismo tiempo, estos umbrales de dosis pueden presentarse como limitantes para alcanzar una mayor dosis en tejido tumoral. Es aquí donde se arriba al concepto que se relaciona con el objetivo de toda modalidad de terapia radiante: entregar una dosis radioterapéutica que permita el control tumoral resguardando, al mismo tiempo, los órganos sanos identificados.

3.2. Conceptos de dosimetría

La presente sección pretende brindar, en forma abreviada, la base teórica sobre la cual se fundamenta la estrategia que se empleó para abordar la dosimetría numérica computacional en los diferentes casos propuestos.

3.2.1. Energía impartida y dosis absorbida

Los efectos físicos, químicos y biológicos producidos por la deposición de energía en un volumen dado están correlacionados con la distribución espacial y temporal microscópica de la energía impartida por la radiación ionizante. La *energía impartida* a la materia, ϵ , en un volumen se define como:

$$\epsilon = R_{in} - R_{out} + \sum Q, \quad (3.1)$$

donde:

- R_{in} : es la energía radiante, definida como la suma de las energías cinéticas de las partículas ionizantes, incidente en el volumen. Es decir, es la suma de las energías, sin tener en cuenta la energía en reposo, de todas las partículas ionizantes con carga y sin carga que han ingresado al volumen de interés,
- R_{out} : es la energía radiante que sale del volumen. Es la suma de las energías, sin tener en cuenta la energía en reposo, de todas las partículas ionizantes con carga y sin carga que dejan el volumen de interés, y

- $\sum Q$: representa la suma de todos los cambios de la energía de la masa en reposo de los núcleos y las partículas elementales en todas las transformaciones nucleares y de partículas que han ocurrido en el volumen.

La energía impartida puede expresarse como la composición de contribuciones $\Delta\epsilon$ de un número de procesos i dada por la sumatoria $\epsilon = \sum_i \Delta\epsilon_i$, donde $\Delta\epsilon_i$ toma valores para cada una de las interacciones de partículas ionizantes que ocurren dentro del volumen [181].

La energía media, $\bar{\epsilon}$, impartida a un cuerpo queda determinada a partir del transporte neto $(\bar{R}_{in} - \bar{R}_{out})$ de la energía radiante teniendo en cuenta, además, el término $\overline{\sum Q}$, de acuerdo a la ecuación 3.1. El transporte neto de la energía radiante en un volumen está dado por la suma del transporte neto de energía radiante a través de todos los elementos diferenciales de superficie, dA , del área que circunscribe el volumen. Introduciendo la *fluencia vectorial de energía*, $\Psi(\mathbf{r})$, una cantidad radiométrica relacionada a la caracterización de los campos radiantes que describe el contenido de energía transportado por las partículas del campo de radiación, es posible establecer una relación entre la $\bar{\epsilon}$ y el transporte de partículas. El transporte neto de energía de radiación entrando al cuerpo de interés a través del elemento dA en la dirección $-\mathbf{dA}$, está dado por el producto escalar $-\Psi \cdot \mathbf{dA}$. Así, la energía media impartida $\bar{\epsilon}$ se puede expresar como [182]:

$$\bar{\epsilon} = - \oint_{S(V)} \Psi \cdot \mathbf{dA} + \overline{\sum Q}, \quad (3.2)$$

donde $S(V)$ es la superficie que circunscribe el cuerpo de volumen V .

A partir del Teorema de Gauss y, por otra parte, teniendo en cuenta que $\overline{\sum Q}$ puede ser escrito en términos de una integral de volumen como $\overline{\sum Q} = \iiint_V \frac{d(\overline{\sum Q})}{dV} dV$, la ecuación 3.2 puede reescribirse como ¹¹:

$$\bar{\epsilon} = \iiint_V \left(-\text{div } \Psi + \frac{d(\overline{\sum Q})}{dV} \right) dV. \quad (3.3)$$

Esta última expresión muestra que la $\bar{\epsilon}$ contiene contribuciones de la energía transportada por las partículas del campo de radiación en cada punto del volumen. Esto se corresponde con la contribución de cada proceso $\Delta\epsilon$ a ϵ , tal como lo describe la expresión $\epsilon = \sum_i \Delta\epsilon_i$.

La dosis absorbida, D , es una cantidad que permite describir la distribución de la energía impartida en términos de su valor esperado, y toma un valor en cada punto del volumen del cuerpo irradiado. Se define, de acuerdo a 3.4, como el valor límite de $\bar{\epsilon}$ por unidad de masa m de un volumen infinitesimal:

$$D = \lim_{m \rightarrow 0} \frac{\bar{\epsilon}}{m} = \lim_{V \rightarrow 0} \frac{1}{\rho} \frac{\bar{\epsilon}}{V}. \quad (3.4)$$

La unidad de medida es el Gray, abreviado Gy, y se define en el sistema internacional como $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/kg}$.

Finalmente, y retomando la definición dada en la ecuación 3.3, es conveniente expresar la dosis D como:

¹¹Aquí, div se refiere al operador divergencia, el cual aplicado a Ψ se define como: $\text{div } \Psi = \frac{\partial \Psi_x}{\partial x} + \frac{\partial \Psi_y}{\partial y} + \frac{\partial \Psi_z}{\partial z}$.

$$D = \lim_{V \rightarrow 0} \frac{1}{\rho} \frac{\bar{\epsilon}}{V} = -\frac{1}{\rho} \operatorname{div} \Psi + \frac{1}{\rho} \frac{d(\overline{\sum Q})}{dV}. \quad (3.5)$$

A partir de la ecuación 3.5, se evidencia que los cambios locales dictados por la fluencia vectorial Ψ , expresados por la cantidad escalar $\operatorname{div} \Psi$, resultan de las interacciones de las partículas ionizantes en el volumen de interés. Esta expresión es útil para mostrar la conexión entre el cálculo dosimétrico y el transporte de la radiación, y da cuenta de la importancia del empleo de este último como herramienta en la determinación de la dosis absorbida.

3.2.2. Relación entre dosis absorbida y kerma

La dosis absorbida describe la energía impartida a la materia por todos los tipos de campos de radiación, ya sean de radiación indirectamente ionizante (fotones, neutrones) ó directamente ionizante (partículas cargadas). A diferencia de lo que ocurre con esta última, en el caso de las radiaciones indirectamente ionizantes la energía que es impartida a la materia se puede describir como un proceso de dos instancias. En la primera, la radiación transfiere energía cinética a las partículas cargadas del medio en cuestión. En la segunda instancia, las partículas cargadas depositan parte de su energía cinética al medio, lo que resulta en la dosis absorbida. La *energía transferida* a las partículas cargadas, ϵ_{tr} , puede describirse siguiendo el formato de la ecuación 3.1, de acuerdo a:

$$\epsilon_{tr} = (R_{in})_u - (R_{out})_u^{no-r} + \sum Q, \quad (3.6)$$

donde:

- $(R_{in})_u$: es la energía radiante de las partículas sin carga entrando al volumen V ,
- $(R_{out})_u^{no-r}$: es la energía radiante de las partículas sin carga que dejan el volumen V , excepto aquella que se origina de pérdidas radiativas de energía cinética por partículas cargadas mientras están en el volumen V . Por pérdidas radiativas se refiere a la conversión de parte de la energía cinética de partículas cargadas en fotones de radiación de frenado (o *bremsstrahlung*, tal como se denomina a este proceso) o por medio del proceso de aniquilación $e^- - e^+$, y
- $\sum Q$: es la energía neta derivada de la masa en reposo en el volumen V .

Asociada a la energía transferida, se define la cantidad denominada *kerma*, K , cuyo nombre deriva del acrónimo en inglés de *Kinetic Energy Released per unit MAss*, como la suma de las energías cinéticas iniciales de todas las partículas cargadas primarias, emitidas por las interacciones de las partículas sin carga, por unidad de masa. El kerma entonces se define como la energía promedio transferida, $d\bar{\epsilon}_{tr}$, por la radiación indirectamente ionizante a las partículas cargadas del medio por unidad de masa, de acuerdo a la ecuación 3.7. Su unidad en el sistema internacional es el Gy, tal como fue definido anteriormente para la dosis absorbida.

$$K = \frac{d\bar{\epsilon}_{tr}}{dm}. \quad (3.7)$$

En términos de la fluencia de energía y los coeficientes de interacción, el kerma puede expresarse como:

$$K = \int \Psi_E \frac{\mu_{tr}}{\rho} dE, \quad (3.8)$$

donde $(\frac{\mu_{tr}}{\rho})$ es el *coeficiente másico de transferencia de energía* y $\Psi_E dE$ es la fluencia de energía de las partículas ionizantes sin carga con energía cinética en el intervalo dE entorno a la energía E .

Teniendo en cuenta lo anterior, suponiendo el caso de radiación monoenergética con una energía E dada, la relación entre Ψ y el K se puede escribir:

$$K = \Psi \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_E = \Phi \left[E \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_E \right]. \quad (3.9)$$

Aquí Ψ es la fluencia de partículas expresada en $[n\text{ cm}^{-2}]$ y el producto $[E (\frac{\mu_{tr}}{\rho})_E]$ se denomina *factor de kerma*, k_f .

Como se desprende de la ecuación 3.9, los factores k_f dependen de la energía E y además de la composición elemental del medio en cuestión. Para un material con una composición dada por la fracción en peso w_i y factor de kerma k_i del i -ésimo elemento, se calcula el factor de kerma de ese material como:

$$k_f^{\text{mat}} = \sum_i w_i k_i(E), \quad (3.10)$$

y retomando la ecuación 3.8, el kerma en un material dado se calcula como:

$$K = \int \Psi(E) k_f^{\text{mat}}(E) dE. \quad (3.11)$$

Tal como se desprende a partir de sus definiciones, ecuaciones 3.10 y 3.11, los factores de kerma de neutrones y fotones son dependientes de la energía. Teniendo en cuenta la composición elemental de un material dado es posible construir estos factores para todo el espectro energético. Llevado a un ejemplo concreto, conociendo la composición elemental de un tejido en particular, y siguiendo las definiciones dadas, el factor de kerma se calcula para cada elemento y para cada energía. Luego se suman todas las contribuciones para cada energía y se obtiene el factor de kerma en el rango energético de interés.

La energía transferida a las partículas cargadas secundarias en un elemento de volumen puede disiparse a través de colisiones o en forma de pérdidas radiativas. Considerando esto, el kerma se divide en dos componentes: el *kerma de colisión*, K_{col} , y el *kerma radiativo*, K_{rad} , de manera que el kerma está dado por $K = K_{\text{col}} + K_{\text{rad}}$.

En los casos de las interacciones de neutrones, para las partículas cargadas resultantes, como protones ó núcleos en retroceso, el K_{rad} es prácticamente despreciable. Por lo tanto, para este tipo de interacciones el $K \approx K_{\text{col}}$. En el caso de las interacciones de fotones, a diferencia de lo que ocurre con los neutrones, las pérdidas radiativas pueden ser considerables y para el cálculo del kerma de colisión se emplea el *coeficiente másico de absorción de energía*, $(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho})$, el cual por su definición excluye las pérdidas

radiativas. De esta forma, en analogía con la ecuación 3.9, para una energía E determinada, se tiene que el K_{col} se expresa como:

$$K_{\text{col}} = \Psi \left(\frac{\mu_{\text{en}}}{\rho} \right)_E . \quad (3.12)$$

Por otra parte, contemplando una cierta región del espacio y considerando la energía cinética neta de las partículas que ingresan, E_{in}^{n} , y de aquellas que dejan la región, $E_{\text{out}}^{\text{n}}$, y definiendo la energía cinética transferida neta, E_{tr}^{n} , que excluye las pérdidas radiativas, la energía impartida ϵ en dicha región se puede escribir como:

$$\epsilon = E_{\text{tr}}^{\text{n}} + E_{\text{in}}^{\text{n}} - E_{\text{out}}^{\text{n}} . \quad (3.13)$$

En el caso en que el término $E_{\text{out}}^{\text{n}}$ se compense exactamente con E_{in}^{n} , se tiene la condición conocida como *Equilibrio de Partículas Cargadas* o CPE, por sus siglas en inglés. Así, la ecuación 3.13 se reduce a $\epsilon = E_{\text{tr}}^{\text{n}}$, y dividiendo ambos lados de esta ecuación por la masa contenida en la región de interés y cambiando a los valores medios de estas cantidades se tiene, finalmente:

$$D \stackrel{\text{CPE}}{=} K_{\text{col}} . \quad (3.14)$$

Esto es un resultado de gran practicidad debido a que en aquellos problemas complejos de dosimetría, por ejemplo en los que intervienen campos mixtos de radiación, es posible aproximar la dosis absorbida por el kerma a partir del cálculo computacional del flujo de partículas para una energía dada multiplicado por el factor de kerma según corresponda.

3.3. Dosimetría en el campo mixto de irradiación en BNCT

3.3.1. Componentes de dosis

El campo mixto de radiación en BNCT se compone por contribuciones de diferente transferencia lineal de energía o LET, por sus siglas en inglés. Debido a la coexistencia de diferentes calidades de radiación, la dosimetría en BNCT es notablemente más compleja que la que se realiza en la radioterapia de fotones. En términos del análisis dosimétrico, y teniendo en cuenta que el espectro neutrónico se divide en tres regiones energéticas relevantes^{III}, el campo mixto de radiación provee cuatro componentes principales de dosis [44]:

- *componente térmica*, D_{th} , dada por las interacciones de los neutrones térmicos del haz con los elementos que componen el tejido,

^{III}Tomando la definición de Blaumann y col. [183]:

- Región de *neutrones térmicos*: $E_{\text{n}} < 0.5 \text{ eV}$,
- Región de *neutrones epitérmicos*: $0.5 \text{ eV} < E_{\text{n}} < 10 \text{ keV}$,
- Región de *neutrones rápidos*: $E_{\text{n}} > 10 \text{ keV}$.

- *componente rápida*, D_f , que tiene su origen en las interacciones de los neutrones rápidos con el tejido,
- *componente de fotones*, D_γ , dada por interacciones de neutrones con el tejido y por los fotones estructurales, y
- *componente de boro*, D_B , dada por la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$.

Si bien existen diferentes elementos en la composición elemental de los tejidos en los que ocurren las reacciones de captura, la *componente térmica* encuentra su principal contribución en la reacción de captura neutrónica $^{14}\text{N}(n, p)^{14}\text{C}$, que emite un protón de 583 keV mientras que el núcleo de ^{14}C en retroceso se emite con una energía de unos 40 keV. El ^{14}N forma parte de la composición elemental de los tejidos. Si bien es una componente de dosis indeseable, ya que aporta dosis a los tejidos sanos, no se puede eliminar o minimizar.

La *componente rápida* tiene su principal origen en la reacción de colisión elástica entre los neutrones rápidos del haz de tratamiento con los núcleos de ^1H que conforman la composición elemental del tejido, $^1\text{H}(n, n')^1\text{H}$. Al igual que la componente térmica, ésta es una componente indeseable, pero a diferencia de la primera, es posible disminuir su contribución a la dosis total minimizando la componente de neutrones rápidos del espectro neutrónico del haz de tratamiento. Cabe destacar que en ciertos casos, poseer una contribución espectral de neutrones epitérmicos y rápidos, pero principalmente epitérmicos más energéticos, puede ser beneficioso en términos de lograr una mayor capacidad de penetración en el tejido, lo que conforma una decisión de compromiso. Esto se logra haciendo un minucioso estudio y diseño del haz de tratamiento.

La *componente de fotones* posee dos contribuciones principales: la primera se debe a la reacción de captura neutrónica en ^1H , $^1\text{H}(n, \gamma)^2\text{H}$, que emite un fotón γ de 2.2 MeV, y debido a la presencia del ^1H en la composición elemental de los tejidos, esta componente, al igual que la componente térmica, no se puede minimizar. La segunda contribución encuentra su origen, principalmente, en los fotones estructurales provenientes de reacciones de dispersión en la facilidad de irradiación que conforma el haz de tratamiento. Al igual que lo que ocurre con la componente rápida, se busca minimizar a partir del diseño, teniendo en cuenta la elección de materiales específicos junto con la geometría de la estructura que disminuyan esta contribución.

Por último, la *componente de boro*, como su nombre lo indica, tiene su origen en la reacción de captura neutrónica $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ y es la componente de dosis que se requiere maximizar dado que es la componente de dosis terapéutica. Si bien en el tratamiento con BNCT existe presencia de ^{10}B en tejido sano debido a la administración del compuesto borado (típicamente administrado por vía intravenosa), la forma de maximizar esta componente para el tratamiento tumoral es lograr una acumulación selectiva de estos átomos en el tumor respecto al tejido sano junto con una adecuada conformación del campo de irradiación de manera de minimizar la dosis en tejido sano.

3.3.2. Consideraciones radiobiológicas en el cálculo de dosis

Cada una de las componentes de dosis descritas en la sección anterior, asociadas a las radiaciones de alto y bajo LET en el campo mixto de radiación de BNCT, poseen diferente efectividad biológica. La *efectividad biológica relativa* (RBE, por sus siglas en inglés) se define como la relación de dosis entre un determinado tipo de radiación tomado como referencia y un tipo de radiación de interés que produce el

mismo efecto biológico en un sistema específico bajo estudio. El RBE depende fuertemente del sistema biológico bajo análisis y del tipo de radiación y cómo ésta es administrada (tasa, fraccionamiento y dosis total). En BNCT, en el caso particular de la componente de dosis debida al ^{10}B , la microdistribución heterogénea del compuesto borado junto con el corto alcance de los productos de la reacción, hacen que el concepto de RBE deba ser reemplazado por el de *efectividad biológica del compuesto* o CBE, por sus siglas en inglés. Este factor depende de la distribución de los átomos de ^{10}B en el sistema biológico de interés.

Teniendo en cuenta el empleo de los factores RBE y CBE, el formalismo estándar para el cálculo de dosis en BNCT define lo que se denomina *dosis pesada* o *dosis equivalente* a la cual, para diferenciarla de la dosis física, es decir aquella que se obtiene sin aplicar los factores de peso, se le atribuye la unidad de *Gray-equivalente* o [Gy-eq]. De acuerdo a la ecuación 3.15, y considerando las diferentes componentes de dosis definidas, se tiene la siguiente expresión:

$$D = \omega_B K_B + \omega_{th} K_{th} + \omega_f K_f + \omega_\gamma K_\gamma, \quad (3.15)$$

donde ω_i son los factores de peso asignados para cada componente de dosis. Es importante resaltar que los factores biológicos RBE y CBE involucrados en los factores ω_i , se determinan bajo experimentos radiobiológicos en los cuales se estudia un efecto biológico específico. Un ejemplo de aplicación es el estudio a partir del ensayo clonogénico en una línea celular de interés, para cada una de las componentes de dosis y para un efecto biológico dado, o *end-point radiobiológico*, empleando como radiación de referencia rayos γ de ^{60}Co o fotones generados en aceleradores lineales que se emplean en la aplicación clínica. Asociado al efecto biológico de interés, en el tejido tumoral este se refiere a la muerte celular que conlleva al control tumoral, mientras que el efecto biológico en tejidos sanos se asocia a un efecto que exprese el daño en tejido de forma que al evaluar la dosis en el mismo se busque limitar la dosis para evitar tal efecto. En otras palabras, los factores asociados al tumor se relacionan con el control del tumor como efecto, mientras que los factores asociados al tejido normal se relacionan con la limitación del daño como efecto.

A pesar de ser dependientes de la fracción de sobrevida, y en consecuencia de la dosis entregada, los factores de efectividad biológica empleados en el cálculo de dosis de la ecuación 3.15 se asumen constantes. Conociendo las limitaciones del formalismo estándar, en 2012 González y Santa Cruz, reportaron las inconsistencias encontradas entre los resultados clínicos observados en el control tumoral y la dosis calculada administrada. A partir de estas observaciones, propusieron un nuevo formalismo para el cálculo de la dosis en BNCT en unidades equivalentes a fotones denominada *dosis isoefectiva a radioterapia de fotones con fracción única* (en su forma más reducida, dosis isoefectiva a fotones, o isoE). Esta se define como la dosis de fotones de referencia que produce el mismo grado de sobrevida celular que la combinación de dosis absorbidas provenientes de las componentes del campo mixto de radiación de BNCT.

El formalismo propuesto tiene en cuenta, a partir de los experimentos de sobrevida celular, el modelo lineal-cuadrático para todas las componentes de dosis, la sinergia entre las mismas, es decir, que las sublesiones causadas por una componente se pueden combinar con las causadas por otra componente para formar una lesión letal, y los mecanismos de reparación como función del tiempo incluyendo el factor de Lea-Catcheside [184]. De esta forma, asumiendo $S_i = S_i(D_i)$ como la probabilidad de sobrevida para la componente de dosis absorbida D_i con $i = 1, \dots, 4$ y $S = S(D_1, \dots, D_4)$ como la probabilidad

de sobrevida para la combinación de las cuatro componentes, la expresión general para el cálculo de la dosis isoelectiva a fotones en el campo mixto de radiación de BNCT se escribe como:

$$\sum_{i=1}^4 \alpha_i D_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 G_{i,j}(\theta) \sqrt{\beta_i \beta_j} D_i D_j = \alpha_{\text{ref}} D_{\text{ref}} + G_{\text{ref}}(\theta') \beta_{\text{ref}} D_{\text{ref}}^2, \quad (3.16)$$

donde α_{ref} y β_{ref} son los parámetros obtenidos del modelo lineal-cuadrático (ver Anexo A.2) y $G_{\text{ref}}(\theta')$ es el factor generalizado de Lea-Catcheside para la radiación de referencia.

Este formalismo fue aplicado en la evaluación retrospectiva de la dosis entregada en ensayos clínicos de aplicación de BNCT en melanoma y en tumores de cabeza y cuello. De esta evaluación se encontró que el control tumoral esperado fue consistente con lo observado clínicamente, a diferencia de lo encontrado con aquel derivado con la metodología estándar, representada por la ecuación 3.15. Esto mismo se corroboró cuando se evaluó y comparó lo observado clínicamente en cuanto a las toxicidades en mucosa oral [185].

Si bien, tal como fue explicado, la metodología estándar presenta limitaciones asociadas a los parámetros fijos empleados en el cálculo de dosis, en el desarrollo de esta tesis no se contó con modelos específicos para tumor y tejidos limitantes de dosis que determinen parámetros radiobiológicos asociados al formalismo isoE. Por esta razón, la estrategia propuesta contempló el desarrollo de los cálculos dosimétricos basados en la metodología estándar, asumiendo valores de factores RBE y CBE previamente empleados en otros trabajos y cuya aplicación mejor se ajuste a la presente evaluación. Por otra parte, la falta de parámetros específicos asociados a la metodología isoE fue el motivador para adoptar como segunda estrategia de trabajo la propuesta de la realización de experimentos radiobiológicos para la obtención de dichos parámetros. Teniendo en cuenta estos aspectos, se propuso y diseñó la metodología experimental para la irradiación de líneas celulares para la obtención de curvas de sobrevida celular y cuya evaluación permita contribuir a la aplicación del nuevo formalismo. En esta estrategia confluyen los distintos escenarios abordados en la presente tesis: el diseño y desarrollo de nanovehículos transportadores de compuestos borados empleados en los experimentos de sobrevida celular en líneas celulares específicas para la obtención de los parámetros radiobiológicos con el formalismo isoE y su empleo en los estudios de dosimetría computacional de los casos clínicos establecidos. La propuesta y el diseño experimental al cual se hace referencia se presenta en el Anexo A.1.

3.4. Herramientas y estrategia de cálculo

A continuación, en base a lo explicado en las secciones anteriores, se dará una breve descripción de la facilidad de irradiación empleada en la evaluación de esta propuesta junto con los conceptos asociados a las herramientas computacionales utilizadas y, en función de las cuales, se establecieron las pautas de la estrategia de cálculo para el desarrollo de la dosimetría computacional.

3.4.1. Facilidad de irradiación

Si bien la mayor parte de los estudios y desarrollos realizados en esta tesis son de aplicación general, este trabajo tuvo entre sus objetivos contemplar la factibilidad de aplicación en nuestro país. Siguiendo este objetivo, el estudio de dosimetría computacional involucra el uso del modelo computacional de la facilidad de tratamiento de pacientes con la aplicación de BNCT en el reactor RA-6,

emplazado en el Centro Atómico Bariloche, en la ciudad de San Carlos de Bariloche, provincia de Río Negro. El proyecto asociado a esta facilidad de irradiación comenzó en el año 1996 y la construcción y caracterizaciones correspondientes finalizaron en el año 2001. A continuación, se realizaron algunas modificaciones principalmente relacionadas a la composición espectral del haz (al cual se lo denominó simplemente *haz B1*) con el objetivo del tratamiento de ciertos casos de melanoma cutáneo en extremidades inferiores [183]. Es así que entre los años 2003 y 2007 se llevó a cabo el ensayo clínico fase II de BNCT para el tratamiento del melanoma cutáneo en extremidades [28, 186].

Luego, entre los años 2008 y 2011, el reactor RA-6 fue sometido a algunas adecuaciones en su núcleo para la operación con combustible de bajo enriquecimiento. En dicho período, la facilidad de irradiación pasó por una serie de mejoras relacionadas a la composición espectral del haz (cuyo resultado derivó en el denominado *haz B2*) pero, además, se realizó la ampliación de la sala de tratamiento y la instalación de un puerto de irradiación cónico con el objetivo de facilitar el posicionamiento y la irradiación de los pacientes [187]. En la figura 3.1 se muestra la sala de tratamiento en la cual se puede apreciar el cono de irradiación, la camilla para el posicionamiento del paciente y los láseres que conforman el sistema de marcación de referencia para el posicionamiento. El presente trabajo contempla, entonces, el empleo del denominado *haz B2* para el estudio de dosimetría computacional.



Figura 3.1: Vistas de la sala de tratamiento de BNCT del reactor RA-6 (imágenes gentileza de E. Boggio y J. Longhino).

3.4.2. Fantomas antropomórficos computacionales

Un fantoma es una representación física o computacional del objeto o cuerpo donde se desea realizar alguna determinación de interés. Aplicado a la radioterapia, un fantoma físico se compone de materiales tejido equivalentes desde el punto de vista de la interacción de la radiación. Como ejemplo de esto se puede mencionar el uso de un cubo de paredes de acrílico conteniendo agua en su interior, en el cual se hacen determinaciones de dosis a diferentes profundidades con el fin de realizar calibraciones que sirvan como referencia para los parámetros empleados luego en el tratamiento radiante de los pacientes.

Un fantoma antropomórfico se ajusta a la forma humana en base a modelos que buscan representar, en promedio, la variabilidad de ciertas características físicas de las personas, principalmente en términos de sexo y edad, teniendo en cuenta una geometría y composición más realista de los órganos que representan. En el plano de la dosimetría computacional, se han desarrollado diferentes estrategias

para generar modelos computacionales que representen la anatomía humana y que, gracias a los avances en las capacidades computacionales, han logrado desarrollos con un muy alto nivel de detalle de las formas y características de los órganos humanos. Dadas las definiciones mencionadas, a estos fantasmas se los denomina *fantomas antropomórficos computacionales*. Sumando a estos desarrollos la información de la densidad y de la composición química elemental de los tejidos y acoplados a códigos de simulación de transporte de partículas, conforman una herramienta de gran potencialidad, proveyendo versatilidad y eficiencia en los estudios de dosimetría numérica computacional. Hoy en día existen diferentes códigos computacionales que permiten generar fantasmas antropomórficos [188]. En esta tesis se empleó el código denominado 4D XCAT (acrónimo de eXtended CArdiac-Torso) desarrollado y generosamente provisto por Segars y col. de la Universidad de Duke [189]. En resumen, este es un código basado en el uso de NURBS (acrónimo del inglés de *Non-Uniform Rational B-Splines*), un modelo matemático que permite la representación geométrica de curvas y superficies con aplicación en el desarrollo de gráficos computacionales, como la generación de modelos antropomórficos para ser aplicados en el campo de investigación de las imágenes médicas. El código XCAT permite modelar los diferentes órganos de la anatomía humana, ya sea en el caso de fantasmas femeninos o masculinos, por medio del ajuste de diferentes parámetros de los distintos órganos, ofreciendo la posibilidad de contemplar el movimiento de los órganos ocasionados por la respiración como así también generar estructuras anormales, como placas en las arterias coronarias.

3.4.3. Código computacional de transporte de partículas

El transporte de partículas, necesario para obtener los resultados de distribución de flujos neutrónico y de fotones con el objetivo de estudiar la distribución de dosis en los diferentes órganos de interés, se realizó empleando el código de simulación computacional *Monte Carlo N-Particle*, más comúnmente conocido por su acrónimo MCNP, versión 5 1.60, creado y desarrollado por el Laboratorio Nacional Los Alamos (LANL) de Estados Unidos [190]. Brevemente, a partir del empleo de técnicas de métodos numéricos del tipo estocástico, es decir, muestreando variables aleatorias asociadas a distribuciones de probabilidad, este código simula el transporte de partículas y sus interacciones en un medio dado con el fin de estimar cantidades físicas de interés. El código MCNP, en especial en su versión 5 1.60, permite realizar el transporte de partículas en diferentes modos: solo neutrones, solo electrones o solo fotones, como así también modos acoplados de partículas tales como neutrón/fotón, neutrón/fotón/electrón o fotón/electrón. El rango de energía para estas partículas varía desde 10^{-11} a 20 MeV en el caso de neutrones para todos los isótopos y hasta 150 MeV para algunos isótopos según disponibilidad de las bibliotecas de datos y modelos nucleares, y en el caso de fotones y electrones desde 1 keV hasta 100 GeV. El problema a simular se describe en un archivo de texto, que sirve como entrada y que es leído y procesado por MCNP, y que contiene información del problema como la especificación de la geometría y de los respectivos materiales, la ubicación y características de la fuente de partículas, la cantidad física que se desea medir o evaluar, a la cual se denomina *tally*, y la aplicación de técnicas de reducción de varianza para mejorar la eficiencia del cálculo, entre otras opciones.

Entre una vasta cantidad de funciones, el código MCNP permite calcular cantidades relacionadas con la corriente, el flujo o la deposición de energía por las partículas. Es posible estimar cualquier cantidad de la forma $C = \int \phi(E) f(E) dE$, donde $\phi(E)$ es la fluencia dependiente de la energía y la $f(E)$ puede ser cualquier producto o suma de las cantidades relacionadas con las secciones eficaces correspondientes a un proceso en particular o una función de respuesta provista por el usuario.

3.4.4. Programa computacional desarrollado para el análisis dosimétrico

Con el objetivo de realizar el análisis dosimétrico de los diferentes casos de estudio propuestos, se escribió un programa computacional en el entorno de desarrollo integrado provisto por Matlab®. En líneas generales, el programa desarrollado recibe los datos de salida generados en las simulaciones computacionales con el código de transporte de partículas MCNP, y, a partir de una serie de parámetros provistos por el usuario, permite reconstruir los *histogramas de dosis-volumen* (DVH, por sus siglas en inglés)^{IV} correspondientes a los órganos bajo análisis.

Siguiendo la definición de la ecuación 3.15, el programa permite ingresar los factores RBE, CBE y la concentración de ^{10}B correspondientes a cada órgano en evaluación. Por otra parte, brinda la posibilidad de ingresar los límites de dosis de cada órgano y establecer el tiempo de irradiación, siendo este, una vez fijados los anteriores valores, el parámetro de control y ajuste variable. De esta forma, se le brinda al usuario el control de todos los parámetros que intervienen en el cálculo de la dosis. Por otra parte, el programa computacional fue diseñado en forma modular con el objetivo de que sea simple agregar módulos para el análisis de nuevos órganos definidos. Esta característica permite que el programa pueda ser empleado en problemas de análisis dosimétricos más allá del que se está evaluando en esta tesis, y que claramente pueden involucrar otros órganos.

A partir de los parámetros de control descriptos, el programa calcula y presenta la visualización gráfica de los DVH de la dosis total de todos los órganos intervinientes, incluido por supuesto, el tumor. Por otra parte, permite visualizar los histogramas correspondientes a cada componente de dosis para cada órgano seleccionado por el usuario. Esta característica brinda una capacidad de entendimiento que permite conformar el ulterior análisis de la distribución de la dosis total. Junto a los DVH, el programa muestra en pantalla algunas cantidades de interés que guían al usuario en el análisis. En una tabla, y en tiempo real, es decir, sus valores se actualizan con cada cambio introducido en los parámetros de control por el usuario, se muestran la dosis máxima, media y mínima en unidades de [Gy-eq], el cociente entre la dosis mínima en tumor y la dosis máxima en tejido sano en cuestión ($T_{\text{dosis mín}}/S_{\text{dosis máx}}$), la fracción porcentual del volumen del órgano que recibe una dosis mayor a la dosis límite establecida como referencia junto con el volumen del órgano expresado en mililitros. A su vez, el programa computacional permite al usuario generar diferentes archivos de salida con la información necesaria para reconstruir los resultados del análisis dosimétrico en otros programas de visualización gráfica. La información de salida se conforma por los DVH de la dosis total y las componentes de dosis, la tabla de valores calculados junto con los parámetros de control empleados en el cálculo. El archivo que contiene los parámetros de control exportados permite hacer un seguimiento del problema y sirve como referencia al momento de componer un registro del análisis realizado. A continuación, en la figura 3.2 se muestra la interfaz de usuario principal junto con la interfaz de usuario de análisis por componentes de dosis del programa desarrollado.

3.4.5. Estrategia de cálculo implementada

El análisis realizado tuvo como objetivo establecer las condiciones de irradiación para los casos clínicos identificados como, por ejemplo, establecer los requerimientos mínimos de la distribución de

^{IV}El histograma de dosis-volumen es un histograma acumulado que permite evaluar la distribución de la dosis entregada en un volumen dado. En estos tipos de gráficos, en el eje de las abscisas se representa la dosis y en el de las coordenadas se representa el volumen de interés en términos porcentuales [191].

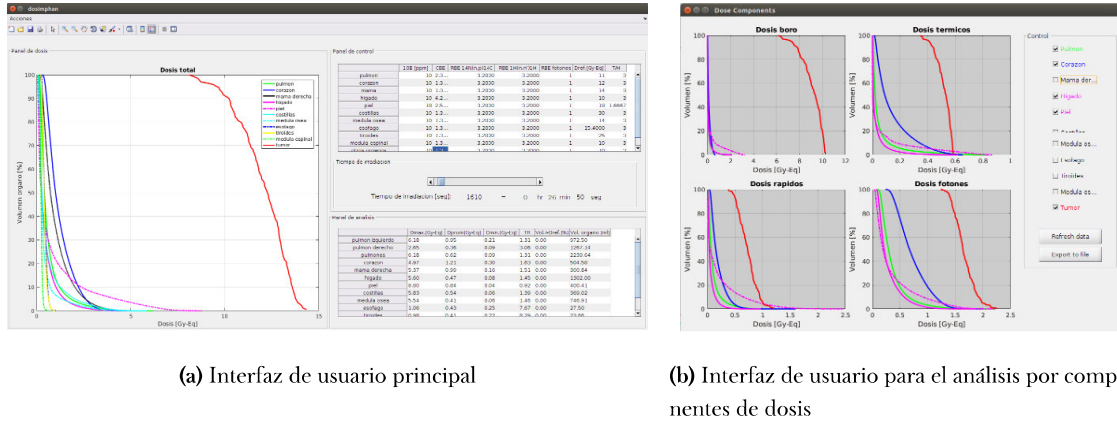


Figura 3.2: Interfaz de usuario del programa computacional de análisis dosimétrico desarrollado en el entorno de programación de Matlab®.

^{10}B y el tiempo de irradiación. Con este fin, como estrategia de cálculo y tal como se describió anteriormente, se empleó la fuente computacional de partículas del reactor RA-6 junto con los fantasmas antropomórficos computacionales generados empleando el código XCAT, y ambos acoplados mediante el código de simulación de transporte de partículas MCNP5. Habiendo realizado una breve descripción de las herramientas empleadas, a continuación se darán las pautas adoptadas que permitieron conformar la estrategia de cálculo implementada.

Respecto a la fuente de partículas, se recurrió al empleo de la fuente computacional definida como *Track-By-Track* (TBT) que, gracias a un comando específico provisto por el código MCNP5, permite computar la energía y dirección de todas las partículas que llegan hasta una superficie elegida por el usuario con el objetivo de poder reemplazar todo el transporte previo de las partículas. Esta estrategia posibilita disminuir el tiempo de cálculo computacional en comparación al empleo del modelo completo del reactor. De esta forma, siempre en términos computacionales, la estructura del reactor fue reemplazada por el tipo de fuente mencionada [192], y la única estructura asociada al reactor representada en la geometría fue el cono de aplicación de la sala de tratamiento de la facilidad de irradiación de BNCT.

Por otra parte, a partir de los casos clínicos definidos, se emplearon fantasmas antropomórficos generados con el código XCAT contemplando dos casos correspondientes a recaídas locales postratamiento conservador y un caso correspondiente a una recaída local posmastectomía. En cuanto a las recaídas postratamiento conservador, y dado que la variación del volumen mamario tiene consecuencias directas en la distribución de flujo neutrónico, se optó por proponer el estudio de dos casos con diferente volumen basado en el valor promedio de acuerdo a lo reportado por diferentes publicaciones consultadas [193, 194]. Teniendo esto en cuenta, el primer caso de recaída postratamiento conservador contempla un volumen mamario de 300 ml, mientras que el segundo caso contempla un volumen de 600 ml. Por otra parte, en el caso de estudio correspondiente a la mastectomía, se propuso el caso de una mastectomía izquierda y un volumen de la mama derecha de 300 ml. Por practicidad en la descripción y redacción de esta tesis, a los casos mencionados se los define como BCT300 y BCT600, para los fantasmas correspondientes a los casos de recaídas postratamiento conservador y, para el caso de la recaída posmastectomía, MAST300. En cuanto a la ubicación anatómica de las recaídas, se optó por considerar recaídas a distintas profundidades de acuerdo al caso estudiado y ubicadas siempre del lado izquierdo,

tanto para los casos de tratamiento conservador como en el caso de mastectomía, debido a que en estas condiciones el corazón queda más expuesto al flujo neutrónico en comparación con la irradiación del lado derecho. Esto supone una condición más desfavorable, y por ende un abordaje más conservativo, teniendo en cuenta la exposición de órganos sanos en riesgo.

De esta manera, se generaron tres modelos voxelizados de $250 \times 250 \times 190$ voxels cúbicos de 0.125 cm^3 cada uno. A su vez estos modelos fueron modificados, empleando el entorno de desarrollo de Matlab®, de manera de poder situar una estructura que simula ser el tumor, permitiendo elegir la ubicación y el tamaño que el usuario requiera. Finalmente se conformaron los modelos computacionales de los fantasmas antropomórficos que simulan las estructuras de los distintos casos clínicos seleccionados para el presente estudio. En la figura 3.3 se muestran las distintas representaciones correspondientes a los fantasmas antropomórficos que modelan los casos definidos y, en especial, las imágenes de los cortes o secciones transversales permiten observar la ubicación de la lesión tumoral correspondiente a cada caso junto a los órganos sanos involucrados^V. En términos prácticos, a cada uno de los órganos se les asignó un número entero que permite su identificación, así a cada voxel que conforma un mismo órgano le corresponde el mismo número entero permitiendo identificar cada estructura de manera simple, lo cual es deseable cuando se cuenta con una gran cantidad de datos para su procesamiento.

Los fantasmas computacionales, una vez definidos, fueron cargados en archivos de entrada para ser procesados por MCNP5 empleando el comando interno *lattice*, provisto por el mismo código, y que permite generar geometrías muy complejas a partir de subunidades más pequeñas, en este caso, los vóxeles que componen los fantasmas antropomórficos. La definición de la composición elemental junto con la densidad de los materiales que conforman los diferentes órganos se realizó de acuerdo a la información proporcionada por la *International Commission on Radiation Units and Measurements* (ICRU, por sus siglas en inglés) en su reporte número 46 [195], el cual provee valores promedio de la composición elemental y la densidad de cada órgano. Teniendo en cuenta que el rango de las partículas que conforman las principales componentes de dosis en BNCT son mucho menores que las dimensiones de los elementos de volumen (del orden del mm) empleados en la estrategia calculo dosimétrico, y en base a lo explicado en la sección 3.2.2, se propuso calcular el kerma a partir del flujo de partículas y el correspondiente factor de kerma asociado al material del volumen de interés. En especial, empleando el código MCNP5, el flujo de partículas en una celda o volumen dado, se puede calcular de acuerdo a la ecuación 3.17 como:

$$\bar{\phi}_V = \frac{1}{V} \int dE \int dt \int dV \int d\Omega \Psi(r, \hat{\Omega}, E, t) \equiv W \frac{T_1}{V} \equiv F4, \quad (3.17)$$

donde $\bar{\phi}_V$ es el flujo promedio en la celda, V es el volumen de la celda, E y t corresponden a la energía y al tiempo, respectivamente, r define el vector posición, $\hat{\Omega}$ define el vector dirección, mientras que la expresión dada por $\Psi(r, \hat{\Omega}, E, t) = v n(r, \Omega, E, t)$ es el flujo de partículas, donde n es la densidad de partículas y v es la velocidad. De esta forma, la estimación del flujo de partículas en un volumen o celda, de acuerdo a la nomenclatura empleada en MCNP5, se realiza a partir de la expresión $W \frac{T_1}{V}$, donde T_1 es el estimador del largo de traza de la partícula en cm, V es el volumen en cm^3 y W es el peso asignado a la partícula. El comando empleado y que resume este cálculo en el código MCNP5 es el tally F4.

^VLa representación gráfica de cada uno de los modelos se realizó empleando el software Moritz v1.25, White Rock Science, desarrollado por Kenneth Van Ripper.

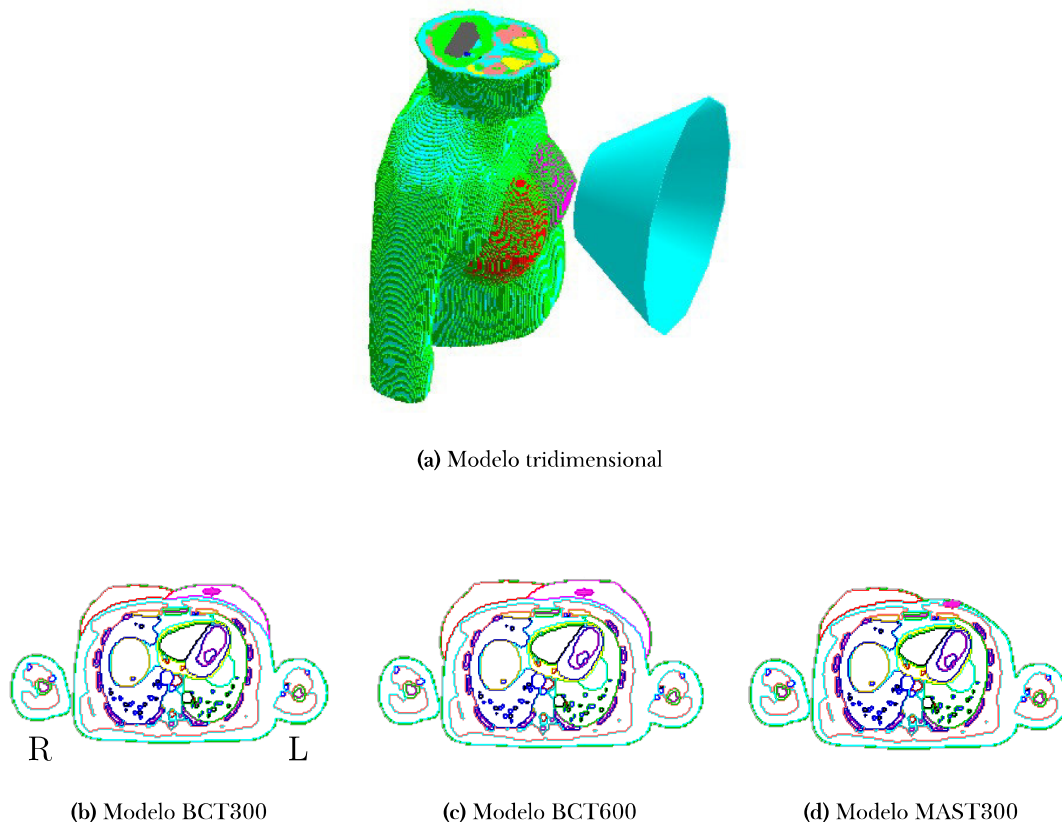


Figura 3.3: Fantomas antropomórficos computacionales generados a partir del programa XCAT. En la figura (3.3a) se muestra el modelo tridimensional junto al cono de aplicación de la sala de tratamiento de la facilidad de irradiación de BNCT del reactor RA-6. Asociado a esto se muestran los cortes transversales de los diferentes modelos generados: (3.3b) recaída postratamiento conservador en mama de 300 ml (R: derecha, L: izquierda), (3.3c) recaída postratamiento conservador en mama de 600 ml y (3.3d) recaída posmastectomía y modelo de mama contralateral de 300 ml. Cada una de las imágenes son visualizaciones directas de la geometría establecida en los archivos de entrada para MCNP. Estas imágenes fueron generadas con el programa computacional de visualización gráfica Moritz ver. 1.25, White Rock Science.

Teniendo en cuenta lo definido anteriormente en la ecuación 3.17, como estrategia de cálculo se recurrió al empleo de la superposición de un mallado de *tallies* (denominado en el entorno de MCNP5 como *meshtally*, empleando el comando FMESH) por sobre la geometría de los fantomas antropomórficos. De esta forma, fue posible calcular el flujo de neutrones y de fotones en todos los vóxeles correspondientes a los órganos donde se define el mallado. El mallado se combinó con los comandos DE y DF que permiten definir una función de conversión de dosis dependiente de la energía y que opera empleando el flujo de partículas calculado con el comando FMESH. La función definida se correspondió con las tablas de factores de kerma asociados a las distintas componentes de dosis de BNCT descriptas anteriormente, obteniendo como resultado la tasa de dosis absorbida en cada voxel de cada órgano. A partir del kerma y la suposición de CPE, fue posible obtener la distribución de la tasa de dosis absorbida correspondiente a las diferentes componentes en todos los órganos de interés, incluido el tumor.

Siguiendo la metodología reportada por Goorley y col., las tablas de factores de kerma para neutrones y fotones fueron calculadas a partir del kerma elemental y de la composición elemental de

los diferentes órganos (ver ecuación 3.10), mientras que se empleó la tabla de factores de kerma de la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ provista por el mismo autor [196]. En este punto cabe comentar que fue necesario definir tres conjuntos de factores de kerma: a) factor de kerma de ^{10}B , k_B ; b) el factor de kerma neutrónico, k_n para todos los grupos de neutrones definidos anteriormente; y c) el factor de kerma de fotones, k_γ , basado en el coeficiente de absorción másico de energía, (μ_{en}/ρ) .

Dado que el factor de kerma depende de la composición elemental del material de cada órgano, un abordaje lógico sería calcular los factores para cada órgano definido en el problema y para el rango de energías de interés. En principio, se debería entonces generar un conjunto de factores de kerma que cubran las distintas componentes de dosis para cada órgano, y en la medida que existan varios órganos involucrados, esto puede conllevar la producción de una gran cantidad de datos que puede ser compleja de procesar computacionalmente. Una forma de disminuir la cantidad de datos generados es definir, con un cierto criterio, un conjunto de factores de kerma que puedan ser aplicados indistintamente a todos los órganos de interés. Con este objetivo, como estrategia de cálculo, se computaron los valores máximos y mínimos de los factores de kerma aplicables a las distintas componentes de dosis neutrónica y de fotones considerando todos los órganos involucrados. De esta forma, y tomando un criterio conservador de cálculo, el conjunto de factores de kerma máximo se empleó para el cálculo de dosis en órganos sanos, mientras que el conjunto de factores de kerma mínimo se aplicó en el caso del tumor. En la figura 3.4 se muestran los conjuntos de factores de kerma computados. En especial, con el objetivo de evidenciar la relevancia de la componente debida a la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$, k_B , comparada con los factores de kerma neutrónico, k_n , en la figura 3.4a se superpone el factor de kerma para distintas concentraciones de ^{10}B dadas en ppm (partes por millón)^{vi}. Tal como se puede apreciar, en la medida que la concentración se incrementa, la dosis entregada por esta componente se acentúa considerablemente respecto a aquella dosis generada en los tejidos por la componente D_{th} . Así mismo se puede apreciar que el factor de kerma k_B es mayor en las bajas energías del espectro, tal como es de esperar debido a la naturaleza de la reacción de captura neutrónica. Por otra parte, en este mismo gráfico queda en evidencia la relevancia de las componentes de altas energías en los tejidos, en cuyo rango, aunque se incremente la concentración de boro, la componente de D_B es despreciable. Este hecho se entiende a partir del cálculo de los factores de kerma neutrónico, k_n y analizando el aporte al mismo dado por la composición elemental de los órganos contemplados, especialmente por el ^{14}N y el ^1H . En la figura 3.5 se muestra la contribución promedio de ambos elementos al factor de kerma de neutrones.

Por otra parte, en la figura 3.4b se muestran los factores de kerma de fotones computados $k_{\gamma \text{máx}}$ y $k_{\gamma \text{mín}}$. Se observa un claro apartamiento en las bajas energías dado especialmente por la presencia de ^{40}Ca en la composición elemental de las costillas como órgano involucrado. La implicancia de este incremento, junto con el observado en el caso del factor de kerma neutrónico, en el cálculo de la dosis total, es decir aquella que contempla todas las componentes de dosis, se analiza a continuación.

Teniendo en cuenta las diferencias que existen entre los factores de kerma de los distintos órganos involucrados, se realizó el cálculo de la diferencia porcentual de la dosis debida a los factores de kerma máximo, $k_{n \text{máx}}$ y $k_{\gamma \text{máx}}$, respecto al factor de kerma correspondiente de cada órgano, empleando

^{vi}En el marco de aplicación de BNCT, la concentración de ^{10}B típicamente se expresa en términos de partes por millón (ppm). En este punto se hace esencial remarcar que en los cálculos dosimétricos que emplean factores de kerma por ppm, es un requisito indispensable que la definición de ppm se haga en términos de la masa de las partes intervinientes, es decir la masa de ^{10}B y la masa del tejido o medio en el cual se encuentran distribuidos esos átomos. De esta manera, la concentración en ppm hace referencia a $\mu\text{g g}^{-1}$ o mg kg^{-1} , donde indistintamente de los múltiplos de masa empleados, el factor de su relación debe ser de 1.10^6 .

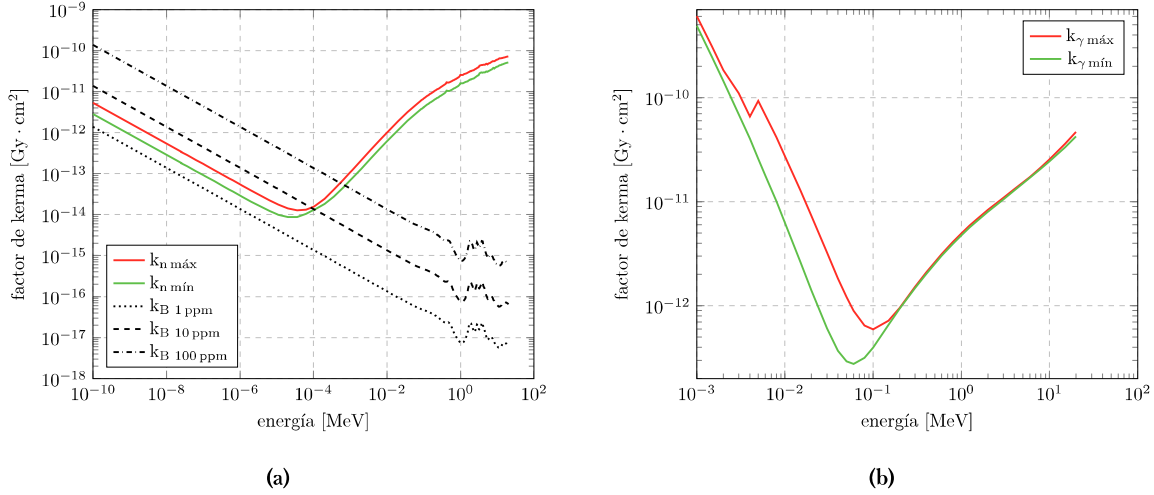


Figura 3.4: Factores de kerma empleados en el cálculo dosimétrico. En la figura 3.4a se muestran los factores de kerma neutrónico, k_n máx y k_n mín, junto al factor de kerma correspondiente a la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ para una concentración de 1, 10 y 100 ppm de ^{10}B . En la figura 3.4b se presentan los factores de kerma correspondientes a la componente de fotones, k_γ máx y k_γ mín.

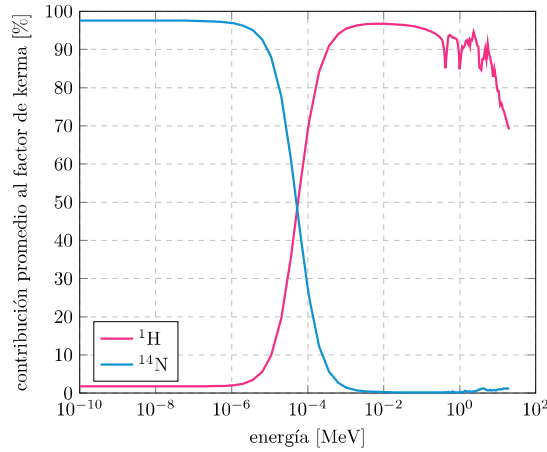


Figura 3.5: Contribución promedio del ^1H y del ^{14}N al kerma neutrónico de los distintos órganos contemplados.

el mismo fantoma antropomórfico definido anteriormente. El resultado de esta comparación se muestra en la figura 3.6. Considerando que cada órgano se compone por vóxeles, en esta figura se representa la diferencia porcentual promedio considerando todos los vóxeles de cada órgano y las barras representan la máxima variación porcentual. Se puede observar que la diferencia porcentual en términos de la dosis total calculada fue inferior al 5.5 % para todos los órganos considerados. A pesar de las marcadas diferencias de los factores de kerma calculados, y que se pueden observar en la figura 3.4, este comportamiento se entiende debido a que la dosis calculada es el resultado de la combinación de las distintas componentes de dosis integradas sobre todo el espectro de energías, tanto para neutrones como para fotones.

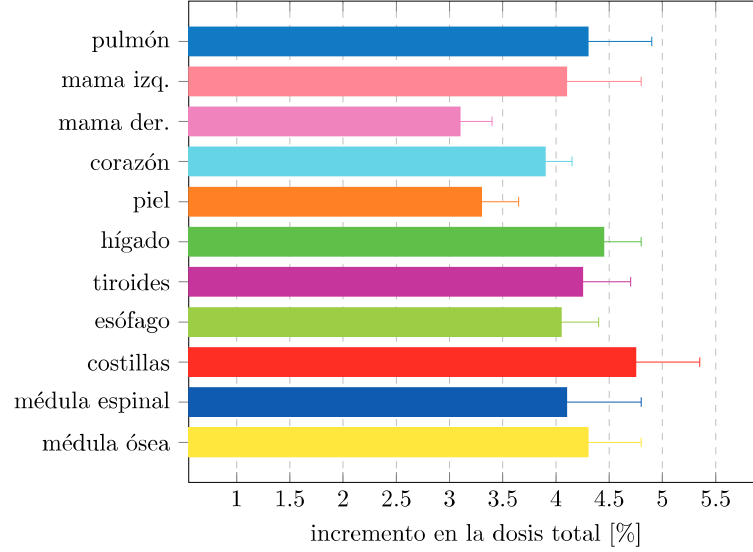


Figura 3.6: Incremento porcentual del kerma en los distintos órganos contemplados calculado con los factores de kerma máximo, $k_{n\text{ máx}}$ y $k_{\gamma\text{ máx}}$, respecto al kerma calculado con los factores de kerma correspondiente a cada órgano.

3.5. Análisis dosimétrico computacional

3.5.1. Consideraciones sobre el análisis propuesto

En los esquemas de administración de radioterapia se emplea el concepto de fraccionamiento, el cual, a partir de la partición de la dosis total en múltiples fracciones de dosis más pequeñas, busca maximizar el efecto de daño en las células tumorales disminuyendo el daño provocado en los tejidos sanos. Así, en el tratamiento del cáncer de mama un esquema denominado convencional es aquel que se administra en una fracción diaria de 1.8 o 2 Gy. A partir de la experiencia clínica y de un mejor entendimiento de la radiobiología del cáncer, se han propuesto otros esquemas de fraccionamiento que difieren del convencional: el esquema *hiperfraccionado*, en el cual se disminuye la dosis por fracción aumentando el tiempo total de tratamiento, y por el contrario, el esquema *hipofraccionado*, en el que se aumenta la dosis por fracción y se disminuye el tiempo total de la administración de radioterapia. Por otra parte, el *fraccionamiento acelerado* disminuye el tiempo total del tratamiento entregando más de una fracción por día, típicamente dos fracciones diarias con una separación de al menos 6 h entre fracciones, buscando minimizar la repoblación de células tumorales durante el tratamiento y, por lo tanto, aumentar la probabilidad de control del tumor para la misma dosis total.

En términos radiobiológicos, el parámetro α/β caracteriza la respuesta de un tejido a la radiación y surge del ajuste del modelo lineal-cuadrático, que describe las curvas de supervivencia celular, y sobre el cual se presenta una explicación más detallada en el anexo A.2. En términos generales, la mayoría de los tumores epiteliales se caracterizan por un α/β de 10 Gy. Por otra parte, los tejidos sanos de reacción tardía presentan este valor en el rango de 0.5 a 6 Gy con un promedio entre 3 a 4 Gy y los de reacción aguda presentan un valor en el rango de 5 a 20 Gy [197]. En particular, en el caso del cáncer de mama, a partir de diferentes estudios realizados [89, 90, 198, 199], se ha determinado que el valor α/β varía entre

4 a 5 Gy, mientras que el asociado a la reacción tardía de la mama sana es de 3.6 Gy. Un valor α/β bajo indica una mayor capacidad de reparación del tejido entre fracciones y una mayor sensibilidad a la dosis por fracción. Esto muestra que el cáncer de mama comparte una sensibilidad a la dosis por fracción muy similar a la respuesta tardía de los tejidos normales. Esto es importante porque permite considerar en la administración de un esquema hipofraccionado junto al fraccionamiento acelerado. Teniendo en cuenta las características radiobiológicas del cáncer de mama mencionadas anteriormente, estos esquemas se presentan, además, como una ventaja desde el punto de vista de la conveniencia logística, de la paciente para acercarse al centro de radioterapia.

De acuerdo a las diferentes modalidades de administración de radioterapia, la irradiación parcial acelerada de la mama (IPA) o APBI, por sus siglas en inglés, propone entregar un esquema de radioterapia incrementando la dosis por fracción y disminuyendo el tiempo de tratamiento en forma significativa. Si bien esta modalidad se describió en la sección 2.4.3, es conveniente aquí recordar que surgió como parte del tratamiento conservador y como una alternativa a la irradiación de la mama completa luego de la cirugía conservadora. A partir de la observación clínica de un gran porcentaje de recaídas ocurrientes en el sitio del tumor primario, para un grupo identificado de pacientes, se propuso reducir el volumen del tratamiento al lecho tumoral sumado un cierto margen de seguridad. De esta forma, la aplicación de IPA busca incrementar la dosis por fracción y reducir el tiempo total del tratamiento y, al mismo tiempo, disminuir el volumen tratado, posibilitando, además, la reducción de las toxicidades de los tejidos sanos involucrados.

El esquema de irradiación estándar para la mama completa es de 50 Gy entregados en fracciones de 2 Gy, mientras que, si bien no se ha establecido un esquema de irradiación estándar para IPA, generalmente ésta se administra en dos fracciones diarias de más de 2 Gy por fracción completando el tratamiento en menos de cinco semanas (el tiempo que típicamente toma la administración del esquema de irradiación estándar). Como ejemplo, se puede citar un esquema de 38.5 Gy con una dosis por fracción de 3.85 Gy, administrada dos veces al día con una separación de al menos 6 h entre fracciones, tal como se definió en el ensayo clínico *NSABP-B39/RTOG0413*. Este ensayo fue diseñado para evaluar si esta modalidad puede proporcionar un control local equivalente en comparación con la irradiación de la mama completa luego de la cirugía conservadora para el cáncer de estadio temprano. Para ello, el ensayo definió dos grupos de estudio: el primer grupo recibió irradiación de la mama completa con un esquema de 50 Gy de dosis total en fracciones de 2 Gy o 50.4 Gy en fracciones de 1.8 Gy, mientras que el segundo grupo recibió alguna de las siguientes técnicas propuestas para la evaluación de IPA: braquiterapia multicateter 34 Gy de dosis total en fracciones de 3.4 Gy ó cateter balón Mammosite® 34 Gy en fracciones de 3.4 Gy ó irradiación 3D conformacional con haces externos 38.5 Gy en fracciones de 3.85 Gy.

Diferentes ensayos institucionales que evalúan la aplicación de la técnica IPA, han tomado como referencia lo establecido en el citado ensayo *NSABP-B39/RTOG0413* para su adaptación en términos de prescripción de dosis en tumor y límites de dosis en los tejidos sanos involucrados. Aquí es importante recordar el objetivo de toda modalidad de terapia radiante: entregar una dosis radioterapéutica que permita el control tumoral resguardando, al mismo tiempo, los órganos sanos identificados. En este punto es conveniente mencionar que, en términos de la toxicidad en tejidos sanos, existe la definición de grados asociados a la toxicidad en radioterapia y que tiene como fin establecer un lenguaje común de terminologías para reportar los efectos adversos en tejidos sanos por esta modalidad de tratamiento. Si bien existen diferentes pautas para establecer la definición de los grados, las tres pautas más comúnmente

empleadas son las definidas por CTCAE (acrónimo de Common Terminology Criteria for Adverse Events), RTOG (dada por las siglas en inglés de Radiation Therapy Oncology Group) y la denominada LENT-SOMA (acrónimo de Late Effect Normal Tissue Task Force, LENT - Subjective, Objective, Management, Analytic, SOMA) [200]^{vii}.

En la radioterapia del cáncer de mama, en general, las principales estructuras consideradas como órganos en riesgo son la piel, la mama irradiada, la mama contralateral, el corazón, los pulmones, la pared torácica, las vías linfáticas y el plexo braquial. Dependiendo del volumen irradiado y la técnica empleada, pueden considerarse otros órganos como el hígado y la tiroides. En cuanto a las reacciones de la piel, el eritema se presenta como la primera reacción luego de la irradiación. La presentación más típica ocurre como una leve quemadura por exposición solar, apareciendo dentro de los primeros 10 a 14 días luego de iniciado el tratamiento, y la presentación moderada puede incluir síntomas como edema, sequedad o hiperpigmentación. La dermatitis es dependiente de la dosis y su fase aguda ocurre dentro de los 30 a 90 días de la irradiación. Por otra parte, la descamación, ya sea seca ó húmeda, se presenta a dosis mayores en la última etapa del tratamiento radiante. En especial, la descamación húmeda ocurre como consecuencia del daño de capas de dermis más profundas [202, 203]. Por otra parte, tanto el tejido linfático como el plexo braquial, son tejidos de lenta proliferación y poseen un mayor riesgo de presentar un daño subclínico, resultando en una mayor morbilidad con presentación de linfedema y dolores y problemas de movimiento en el hombro. La irradiación de la pared torácica se asocia a una fragilidad en las costillas que pueden provocar su rotura [204]. En relación al corazón y a los pulmones, el reporte de toxicidades es más limitado precisamente debido a que la planificación del tratamiento tiene como objetivo minimizar las complicaciones asociadas a riesgos cardiopáticos y al funcionamiento pulmonar [205]. Si bien los casos son poco frecuentes, la radioterapia para el tratamiento del cáncer de mama puede resultar en la irradiación accidental del corazón. En un estudio retrospectivo se ha determinado que la exposición del corazón aumenta la tasa subsiguiente de cardiopatía isquémica y este aumento es proporcional a la dosis media [206].

Dada la relevancia de la administración de la modalidad IPA, es importante mencionar entonces algunos de los ensayos institucionales mencionados anteriormente y llevados a cabo con el objetivo de evaluar su aplicación con haces externos en diferentes escenarios, algunos de los cuales resultan de particular interés en esta tesis.

Vermeulen y col. presentaron los resultados del estudio prospectivo que evaluó la aplicación de IPA administrada con un equipo Cyberknife, empleado en la radiocirugía estereotáctica, como plataforma para la entrega del tratamiento radiante para el cáncer de mama de estadio temprano luego de la lumpectomía [207]. Se propusieron dos grupos de estudio, el primero con un esquema de 30 Gy entregados en 5 fracciones y el segundo de 34 Gy en 10 fracciones. Con un tiempo de seguimiento de más de 12 meses, los resultados cosméticos junto con los efectos agudos variaron entre buenos y excelentes, lo

^{vii}De estos tres estándares, el más empleado en los reportes es el CTCAE [200]. De acuerdo a su definición, el estándar CTCAE versión 5.0 (CTCAEv5.0) establece [201]:

- Grado 1: leve; presentación asintomática o con síntomas leves, no se indica intervención.
- Grado 2: moderado; se indica intervención local mínima o no invasiva.
- Grado 3: severo; médicamente significativo pero no pone en riesgo la vida; se indica hospitalización.
- Grado 4: consecuencias potencialmente mortales; se indica intervención médica urgente.
- Grado 5: muerte relacionada a efectos adversos.

que permitió concluir que la administración de IPA con Cyberknife se presentaba como una modalidad prometedora. En esta misma línea, Obayomi-Davies y col. reportaron la experiencia institucional en el estudio de factibilidad técnica para la modalidad IPA empleando la técnica estereotáctica (SAPBI, por sus siglas en inglés), al igual que el anterior estudio, con un equipo de radiocirugía Cyberknife [208]. La prescripción de dosis fue de 30 Gy en 5 fracciones, y luego de un seguimiento de 1.3 años, todas las pacientes presentaron excelentes resultados cosméticos. Si bien los autores remarcan que el estudio presenta ciertas limitaciones dadas principalmente por el pequeño número de pacientes y breve período de seguimiento, los resultados fueron alentadores, concluyendo que el empleo de SAPBI se presenta como una plataforma prometedora para la administración de IPA para el tratamiento del cáncer de mama en estadio temprano. A su vez, recomendaron realizar más estudios para determinar la población óptima que puede beneficiarse de esta modalidad junto con la propuesta de un ensayo prospectivo de fase II para evaluar con mayor profundidad el uso de SAPBI con Cyberknife.

Por otra parte, y a diferencia de los estudios mencionados anteriormente, en 2015 Horton y col. publicaron los resultados de una propuesta novedosa: la irradiación parcial de la mama con una única fracción con radioterapia de haces externos previo a la cirugía, es decir como una neoadyuvancia al tratamiento quirúrgico [209]. En el respectivo ensayo institucional fase I, los autores propusieron evaluar la seguridad de la entrega de una única fracción, en términos de factibilidad, toxicidad y máxima dosis tolerada, al volumen del tumor intacto seguida de la lumpectomía a los 10 días de la irradiación. Entre las ventajas que presenta esta propuesta se mencionan: la amplia disponibilidad de técnicas de radioterapia para la entrega del tratamiento radiante (aquí cabe remarcar que el empleo de otras técnicas de IPA, como por ejemplo la braquiterapia, requiere de equipamiento especial y personal específicamente capacitado para su uso, situación que puede no estar al alcance de muchos centros); el tumor se encuentra intacto y rodeado por tejido mamario que no presenta inflamación o seroma posoperatorio; es posible realizar un tratamiento focalizado de las áreas subclínicas que rodean al tumor y, por último, la posibilidad de poder analizar la respuesta del tumor empleando biomarcadores, lo cual resulta sumamente relevante y atractivo para una mejor comprensión de la respuesta del tumor y, en definitiva, mejorar la calidad del tratamiento a las pacientes. El ensayo consistió en el estudio de dos grupos en los cuales a las pacientes previamente seleccionadas, mayores de 55 años con carcinoma invasivo T1 o enfermedad *in-situ* con tumor menor a 2 cm, se les entregó 15 o 21 Gy y a los 10 días de la irradiación se les practicó la lumpectomía. Los resultados cosméticos fueron entre buenos y excelentes y las toxicidades observadas fueron de grado 1 y 2, principalmente asociadas a fibrosis e hiperpigmentación. La radioterapia preoperatoria administrada en una única fracción fue bien tolerada y, dados los resultados obtenidos, sugirieron evaluar esta propuesta en ensayos clínicos futuros.

En la misma dirección que Horton y col., Guidolin y col. propusieron el ensayo prospectivo denominado SIGNAL (acrónimo del inglés Stereotactic Image-Guided Neoadjuvant Ablative radiation then Lumpectomy) para estudiar la aplicación de radioterapia neoadyuvante entregada en una única fracción para el tratamiento del carcinoma mamario de bajo riesgo [210]. A las pacientes seleccionadas se les administró una dosis en tumor de 21 Gy y se empleó la modalidad de radioterapia estereotáctica guiada por imágenes, mientras que la lumpectomía se practicó a la semana de la irradiación. Este estudio piloto tuvo como objetivo evaluar la toxicidad y cosmesis a 3 semanas, 6 meses y a 1 año luego del tratamiento, junto con la factibilidad de aplicación. De acuerdo a los resultados, el estudio mostró ser factible de aplicar sin haber identificado toxicidades significativas (no se observaron toxicidades de grado 2 o mayor), con excelentes resultados cosméticos y de calidad de vida de las pacientes. Finalmente,

concluyeron que estos resultados deben ser confirmados en ensayos clínicos prospectivos randomizados alentando su estudio.

Por otra parte, Kennedy y col. estudiaron en un ensayo clínico prospectivo fase I/II la aplicación de IPA posoperatoria en una única fracción para el tratamiento del cáncer de mama de bajo riesgo. La propuesta consistió en la entrega de una dosis de 20 Gy al lecho tumoral y 5 Gy al tejido de la mama sana logrando así un alto gradiente en una única fracción con haces externos, a lo cual denominaron SFHGPBI (acrónimo de Single-Fraction High-Gradient Partial Breast Irradiation)^{viii}, entre 2 a 8 semanas luego de la lumpectomía [211]. Con una mediana de seguimiento de 25 meses, del total de las pacientes tratadas se observó sólo una paciente que presentó una recaída en un cuadrante no tratado a los 18 meses del tratamiento recibido, y otra paciente con una recaída axilar a los 30 meses, ambas recaídas tratadas con éxito. Si bien el tiempo de seguimiento debe ser mayor, al momento de la evaluación no se presentaron toxicidades importantes (solo casos de eritema grado 1) ni efectos cosméticos adversos u otros efectos que alteren o agraven la calidad de vida de las pacientes.

Por último, es importante destacar que actualmente se encuentra en fase de reclutamiento de pacientes el ensayo clínico NCT02482376 denominado *A Phase II Preoperative Single-Fraction Partial Breast Radiotherapy in Early Stage Breast Cancer: Analysis of Pathologic Response*^{ix} que propone estudiar la aplicación de radioterapia estereotáctica preoperatoria administrada en una única fracción de 21 Gy para el tratamiento del cáncer de mama de estadio temprano.

En el caso de la propuesta de reirradiación para el tratamiento de las recaídas, se debe realizar una cuidadosa evaluación de la dosis acumulada en ambos tratamientos, lo cual implica considerar la dosis y el volumen tratado en la irradiación primaria junto a la extensión y el solapamiento con los campos del segundo tratamiento radiante. La indicación de radioterapia para el tratamiento de las recaídas debe ser discutida y determinada en una base interdisciplinaria. En esta misma línea, en términos conceptuales es importante destacar la importancia del abordaje multimodal del tratamiento de las recaídas. A partir de lo ya presentado en diferentes secciones que componen esta tesis, es claro que el abordaje de este tipo de tratamiento es particularmente complejo. Éste depende de numerosos factores que incluyen la presentación clínica de la recaída junto con el historial del tratamiento previo de la paciente. El tratamiento de la recaída de la enfermedad cuando, como parte del tratamiento primario se administró radioterapia, presenta un desafío en términos de alcanzar un balance entre el tratamiento local efectivo y una aceptable toxicidad en los órganos sanos. Diferentes estudios realizados sugieren que las altas dosis entregadas se deben a la superposición de campos en la reirradiación con radioterapia de fotones. Como se mencionó anteriormente en la sección 2.4, como parte del abordaje del tratamiento, no se ha establecido un consenso en los criterios de aplicación de la reirradiación ante la recaída de la enfermedad. En líneas generales, en los casos de reirradiación, se deben considerar las siguientes recomendaciones: a) el beneficio clínico esperado debe superar la potencial toxicidad que surja de la administración de un nuevo curso de radioterapia; b) se deben minimizar la dosis entregada y los volúmenes que involucran a los tejidos normales; c) se debe realizar una cuidadosa evaluación de la dosis acumulada en ambos tratamientos, lo cual implica determinar la dosis y el volumen tratado en la irradiación primaria junto a la extensión y el solapamiento con los campos del segundo tratamiento radiante [205].

Las toxicidades reportadas asociadas a la reirradiación varían en los diferentes órganos de acuer-

^{viii}Se menciona con énfasis este concepto ya que luego será retomado en el análisis de dosimetría para la aplicación de BNCT.

^{ix}Para mayor información visitar <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02482376>, sitio web consultado el día 10 de octubre de 2021.

do a las modalidades de radioterapia administrada y a la dosis acumulada por ambos tratamientos. De acuerdo a los reportes que surgen de estudios retrospectivos de diferentes instituciones, las toxicidades se presentan con menor frecuencia con el aumento del grado de la toxicidad. En particular, en los tejidos de rápida proliferación, como la piel, se ha encontrado a partir de estudios preclínicos que es posible la reirradiación en dosis cercanas a la dosis inicial de tolerancia luego de unos meses desde el tratamiento inicial, cuando la piel ya se ha recuperado antes del segundo curso de radioterapia [212]. Aquí es conveniente recordar el ensayo clínico fase II *RTOG1014*, mencionado en la sección 2.4.3, propuesto para estudiar en forma prospectiva el control local, supervivencia total y la tolerancia de los tejidos asociados a la reirradiación del lecho tumoral con radioterapia externa tridimensional luego de la cirugía conservadora de rescate como alternativa a la mastectomía. En resumen, el esquema de reirradiación en este estudio consistió en la administración de una dosis total de 45 Gy en fracciones de 1.5 Gy dos veces al día durante 15 días empleando la técnica de radioterapia tridimensional conformada. De acuerdo a los resultados, esta opción de tratamiento mostró ser viable, con toxicidades aceptables, presentando una baja tasa de incidencia de una nueva recaída luego de la cirugía conservadora con reirradiación. Los resultados de este estudio sugieren que el tratamiento conservador con reirradiación de la mama ipsilateral puede ser una alternativa para pacientes que deciden no someterse a una mastectomía [124].

Lo expresado hasta aquí tuvo como objetivo dar el contexto necesario en la experiencia clínica con radioterapia de fotones para así poder abordar la presente propuesta de aplicación de BNCT para el tratamiento del cáncer de mama y sus recaídas, y así poder conformar el criterio empleado para realizar el correspondiente análisis dosimétrico que aquí se presenta. Teniendo en cuenta las definiciones expresadas, la aplicación de BNCT para el tratamiento del cáncer de mama puede proponerse en términos de la modalidad IPA: se administra en una única aplicación y por lo tanto la dosis total se entrega en una única fracción y, dado el concepto radiobiológico que subyace en BNCT y que se relaciona con la distribución preferencial del compuesto borado, el concepto de irradiación parcial cobra especial relevancia. Los ensayos propuestos por Horton y col. y Guidolin y col. para el tratamiento neoadyuvante o por Kennedy y col. para el tratamiento adyuvante con radioterapia con fracción única, e incluso el ensayo clínico NCT02482376 mencionado, muestran el interés clínico por ofrecer nuevas opciones de tratamiento, y en cuyo campo, dadas las características mencionadas, BNCT puede surgir como una alternativa a las propuestas existentes.

A partir de lo expresado, el presente análisis dosimétrico contempla dos enfoques: por un lado, el de aplicación de BNCT como primera irradiación, y por otro lado, la aplicación de BNCT para el tratamiento de la recaída de la enfermedad, lo cual, como fue explicado, implica la reirradiación de los tejidos. Como se mencionó anteriormente, los diferentes estudios consultados toman lo propuesto en el ensayo *NSABP-B39/RTOG-0413* como referencia para la prescripción de dosis en tumor y de límite de dosis en tejidos sanos. Aquí es importante mencionar que este ensayo propone criterios de dosis en tejidos sanos que, en varios casos, hacen muy restrictiva la aplicación de los esquemas de radioterapia estudiados. Los ensayos que proponen la aplicación de radioterapia en fracción única (Horton y col., Guidolin y col., Kennedy y col.), realizaron una adaptación de estos valores, mientras que los ensayos de SAPBI (Obayomi-Davies y col., Vermeulen y col.), si bien reportan dosis que exceden los límites propuestos en algunos órganos sanos involucrados, los resultados no muestran toxicidades importantes [207-211, 213]. En función de estos reportes, en el presente análisis de dosimetría se optó por contemplar los criterios de adaptación de valores de dosis de los estudios mencionados, y evaluar las condiciones de concentración ^{10}B y tiempos de irradiación que permitan entregar la dosis de control tumoral pro-

puesta bajo los requerimientos de límites de dosis de los tejidos sanos involucrados. Por otra parte, en el caso de las recaídas posmastectomía con radioterapia adyuvante previa, las opciones de tratamiento son limitadas. En cuanto a la reirradiación, tradicionalmente ha sido aplicada con cautela con el objetivo de no incrementar las probabilidades de complicaciones de tejidos sanos [214]. Si bien en un trabajo se menciona un estudio para su aplicación junto con hipertermia [205], se aclara que la prescripción y los límites de dosis se adoptaron en forma individual basado en la recuperación de los tejidos por el tratamiento previo. En cuanto al tratamiento de esta recaída, se propuso estudiar este caso en términos de una primera aplicación siguiendo los criterios presentados en las tablas 3.1 y 3.2.

De manera de establecer los criterios tenidos en cuenta para definir los valores de referencia relacionados a la dosis entregada en tumor y los valores límites de dosis en tejidos sanos, además de los reportes mencionados, se consultaron diversas publicaciones de análisis retrospectivos que evalúan la toxicidad de diferentes esquemas de radioterapia en órganos específicos, como así también, las recomendaciones en esta materia publicadas por la *Comisión Internacional de Radioprotección* (ICRP, por sus siglas en inglés). Estos valores surgen principalmente de la experiencia clínica adquirida con la radioterapia de fotones en sus distintas modalidades, donde la dosis total y el esquema de fraccionamiento, tal como fue explicado, son factores distintivos de las mismas. En referencia a estos factores, y como fue comentado, la aplicación de BNCT se distingue por entregarse en una única fracción. Si bien varios de los valores de dosis de tolerancia en tejidos sanos se tomaron de la experiencia clínica reportada en diferentes trabajos con la modalidad denominada *Radioterapia Corporal Estereotáctica* (SBRT, por sus siglas en inglés) con fracción única, en aquellos esquemas fraccionados se debe adoptar una estrategia diferente. Al emplear como referencia las dosis fraccionadas de radioterapia de fotones, es un requisito convertir estos esquemas fraccionados en un esquema de dosis única para así poder realizar la comparación tanto en lo que involucra la dosis en tumor como aquella que alcanza los órganos en riesgo. Con este objetivo, empleando el referido modelo lineal-cuadrático, se aplicó el concepto de *Dosis Biológica Efectiva* (BED, por sus siglas en inglés) que permite comparar el efecto biológico de diferentes esquemas de fraccionamiento en términos de la dosis total, de la dosis por fracción y del cociente (α/β), para un efecto y tejido en particular. En el anexo A.2 se describe en forma detallada el abordaje empleado para este cálculo.

A continuación, en el cuadro 3.1 se presentan las dosis de tolerancia de tejidos sanos adoptados de los trabajos consultados en la revisión bibliográfica ya comentada. Para aquellos órganos sanos con más de un criterio de dosis de tolerancia, se optó por aquel más conservador. Por otra parte, para el tumor se propuso evaluar dos prescripciones de dosis asociadas a la dosis mínima y la dosis máxima empleadas en los estudios de escalado de dosis presentados en párrafos anteriores. De estas prescripciones de dosis surgen los respectivos valores de tolerancia para la mama ipsilateral y contralateral, y que se muestran en el cuadro 3.2. Estos conjuntos de valores conforman los criterios adoptados para el análisis de dosimetría del presente estudio.

Como se mencionó en la sección 3.3.2, el cálculo de la dosis en BNCT empleando el formalismo estándar requiere del uso de factores RBE y CBE para los distintos órganos, incluido el tumor. Cabe aquí mencionar el vasto e importante trabajo realizado por Coderre y col., quienes estudiaron y definieron diferentes factores que luego fueron ampliamente empleados en el formalismo estándar de cálculo de dosis en BNCT [1, 219].

El valor de los factores RBE empleados para el cálculo de las componentes de dosis de neutrones térmicos, D_{th} , y de neutrones rápidos, D_f , fue de 3.2 para todos los tejidos involucrados. Este valor surge

3.5. Análisis dosimétrico computacional

Órgano	Criterio ^a	Observaciones
Piel	18 Gy	Correspondiente a la de dosis de tolerancia para descamación húmeda para fracción única [215]
	V10Gy < 15 ml	De acuerdo a lo establecido por Kennedy y col. [211]
Pulmón	V7Gy < 1000 ml	Basado en esquema SBRT de fracción única para asegurar funcionamiento pulmonar [216, 217]
Ipsilateral	V5Gy < 5 %	De acuerdo a lo establecido por Kennedy y col. [211]
Contralateral	D _{máx} = 3 Gy	Según lo establecido por Kennedy y col. [211]
Hígado	V _{max} = 700 ml con D < 9.1 Gy	Basado en esquema SBRT de fracción única para asegurar funcionamiento hepático [216, 217]
Corazón	D _{máx} < 22 Gy	Basado en esquema SBRT de fracción única para pericarditis como <i>endpoint</i> [216, 217]
	V3Gy < 5 ml	De acuerdo a lo establecido por Horton y col. [209] y Guidolin y col. [210]
Esófago	D _{máx} < 15.4 Gy	Basado en esquema SBRT de fracción única para estenosis o fístula como <i>endpoint</i> [216, 217]
Costillas	D _{máx} < 30 Gy	Basado en esquema SBRT de fracción única para dolor o fractura como <i>endpoint</i> [216, 217]
	V10Gy < 10 ml	Según lo establecido por Guidolin y col. [210]
Médula espinal	D _{máx} < 14 Gy	Basado en esquema SBRT de fracción única para mielitis como <i>endpoint</i> [216, 217]
Tiroides	D _{prom} < 8.25 Gy	Cálculo de dosis en fracción única empleando el formalismo BED, basado en la dosis media para tiroides en radioterapia para el tratamiento del cáncer de laringe con técnica SBRT con esquema 42.5 Gy entregados en 5 fracciones [218], contemplando $(\alpha/\beta)_{\text{sano}} = 3$

^a Aquí VXGy representa el volumen (dado en ml ó en %) que recibe una dosis X Gy o mayor.

Cuadro 3.1: Criterios establecidos para los límites de dosis (o dosis de tolerancia, D_{tol.}) de diferentes órganos sanos contemplados en el estudio de aplicación de BNCT para el tratamiento del cáncer de mama.

de las evaluaciones realizadas por Coderre y Morris [1]. El valor de RBE empleado para la componente de fotones fue de 1, siendo la radiación de referencia para las demás componentes. En cuanto a los factores CBE, se adoptaron aquellos valores reportados correspondientes al compuesto BPA-f. Para el cálculo de la dosis en tumor, el valor de CBE empleado fue de 3.8, tomado de los estudios realizados por Coderre y col. [219]. Para el cálculo de dosis en tejidos sanos, se realizó una revisión sobre los valores de CBE empleados en trabajo publicados y que hacen referencia a un efecto específico dependiendo del tejido en cuestión. Estos órganos incluyen la piel, los pulmones y el hígado. Para la piel, se empleó un valor de CBE de 2.5 sugerido por Fukuda y col. a partir de las observaciones de la reacción de la piel en pacientes luego de la aplicación de BNCT [220]. En el caso del pulmón se adoptó el valor 2.3 de acuerdo al trabajo publicado por Kiger y col. que, a partir del estudio de la sensibilidad del pulmón

Órgano	Criterio
Mama ipsilateral	< 60 % de la mama completa debe recibir ≥ 50 % de la dosis prescrita, es decir 7.5 Gy para el esquema $D_{T15\text{Gy}}$ y 10.5 Gy para el esquema $D_{T21\text{Gy}}$ (ver en esta misma tabla el criterio de dosis en tumor), definido por Horton y col. [209, 213], y < 35 % de la mama debe recibir la dosis prescrita, es decir 15 Gy ó 21 Gy, de acuerdo a Horton y col. [209, 213]
Mama contralateral	la dosis en cualquier punto de la mama debe ser < 15 % de la dosis prescrita, lo que se traduce en 2.25 Gy para el esquema $D_{T15\text{Gy}}$ y 3.15 Gy para el esquema $D_{T21\text{Gy}}$ (ver en esta misma tabla el criterio de dosis en tumor), de acuerdo a Horton y col. [209, 213]
Tumor	Dosis prescrita de 15 Gy ($D_{T15\text{Gy}}$) ó 21 Gy ($D_{T21\text{Gy}}$) de acuerdo al esquema de escalado de dosis con fracción única propuesto por Horton y col. [209, 213] y a la dosis con fracción única prescrita en el estudio de Guidolin y col. [210]

Cuadro 3.2: Criterios establecidos para los límites de dosis (o dosis de tolerancia, $D_{\text{tol.}}$) en mama ipsilateral y contralateral junto con prescripción de dosis en tumor contemplados en el análisis dosimétrico.

normal a la irradiación con el campo mixto de BNCT en ratas, sugirió emplear este valor que contempla los posibles efectos tardíos en este órgano [221]. Para el cálculo de dosis en el hígado sano se empleó el valor de CBE de 4.25 determinado por Suzuki y col. a partir del estudio de los efectos de BNCT en hepatocitos empleando el ensayo de determinación de radioinducción de micronúcleos luego de la irradiación aplicada en ratones [222]. En cuanto a los demás tejidos sanos, se empleó un factor CBE de 1.3, tal como lo refieren diferentes trabajos [33, 223, 224].

3.5.2. Caracterización del haz de irradiación

Como parte del análisis de dosimetría computacional, en una primera etapa de trabajo se realizó la caracterización del haz de la facilidad de irradiación de BNCT del reactor RA-6. Esta caracterización comprendió la determinación de la composición espectral del haz neutrónico, que como fue abordado en 3.3.1, tiene una implicancia directa en la conformación de las componentes de dosis en BNCT, y la determinación de la profundidad a la cual ocurre el máximo del flujo de la componente de neutrones térmicos junto con el perfil radial en este punto. Estas determinaciones se realizaron empleando el código de simulación computacional MCNP5 y la fuente TBT, ambos mencionados en la sección 3.4.5. El espectro neutrónico se calculó en aire sobre la superficie del puerto de salida del haz, el cual posee un diámetro de 15 cm, contabilizando los neutrones que atraviesan dicha superficie de acuerdo a su energía y luego agrupándolos en las regiones de energía definidas anteriormente en la sección 3.3.1. Por otra parte, se calculó el perfil longitudinal del flujo neutrónico térmico y el perfil radial a la profundidad de ocurrencia del valor máximo del perfil mencionado anteriormente. Esta determinación se realizó contabilizando el flujo en distintas posiciones dentro de un fantoma de agua construido computacionalmente, de paredes de material acrílico, y ubicado en contacto al cono del puerto del haz de irradiación.

A continuación, en la figura 3.7 se muestra el espectro neutrónico junto a la composición espectral de las respectivas componentes neutrónicas antes definidas. Como se puede apreciar, el haz posee una composición térmica y epitérmica mixta, lo cual permite alcanzar una mayor profundidad en tejido en comparación con un haz térmico puro. Es importante destacar la baja componente de neutrones

rápidos, menor al 3.7 %. Las barras de error mostradas corresponden a un criterio $\pm 2\sigma$, teniendo un mayor error relativo para la componente rápida debido a la baja contribución de neutrones con esta energía.

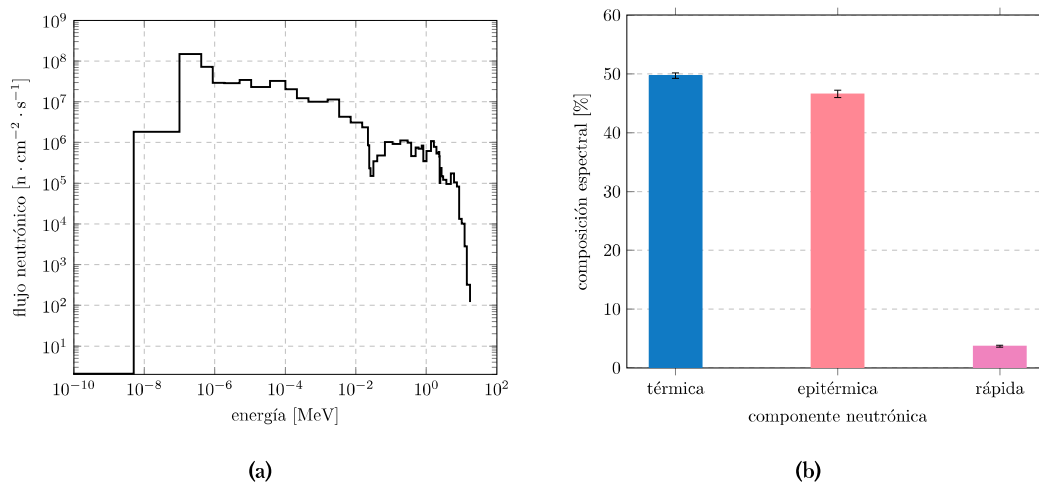


Figura 3.7: Espectro neutrónico y composición espectral del haz de tratamiento de la facilidad de BNCT del reactor RA-6 obtenidos de acuerdo a la fuente TBT.

En la figura 3.8 se muestran el perfil longitudinal en fantoma de agua junto al perfil radial a la profundidad de ocurrencia del flujo neutrónico térmico máximo. Como se puede observar, el perfil longitudinal alcanza su valor máximo de $(1.02 \pm 0.03) \cdot 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a una profundidad 1.1 cm, mientras que el 50 % de este valor ocurre a 4.2 cm de profundidad. Esto muestra la concepción del diseño del haz orientado al tratamiento de tumores superficiales como el melanoma cutáneo, como se mencionó anteriormente. Por otra parte, el perfil radial a la profundidad de 1.1 cm, se atenúa desde el centro hacia los bordes conformando un disco de 8 cm de diámetro cuando esta caída es de 5 %, mientras que en los bordes del puerto, correspondiente a un disco de 15 cm de diámetro, la disminución respecto al máximo es de 50 %.

En la figura 3.9 se muestra la distribución del flujo neutrónico térmico relativo al valor máximo en cada caso analizado para los fantasmas antropomórficos definidos en la sección 3.4.2, y aplicando una única incidencia frontal del haz. Se puede apreciar lo comentado en el párrafo anterior, donde el máximo del flujo de neutrones térmicos ocurre a poca profundidad del tejido.

3.5.3. Resultados contemplando la incorporación de ^{10}B sólo en tumor

Como primer abordaje, se propuso estudiar el requerimiento de concentración de ^{10}B en tumor para alcanzar la dosis prescrita en el tiempo de irradiación tal que no se superen los valores límites de dosis en los órganos sanos establecidos en los cuadros 3.1 y 3.2, y suponiendo, además, que éstos no incorporan ^{10}B , es decir la concentración se asumió igual a cero. De esta forma, la dosis alcanzada en los órganos se debe sólo a las componentes D_{th} , D_f y D_γ definidas en la ecuación 3.15. Bajo esta condición, la dosis entregada a los tejidos se debe al sólo hecho de estar expuestos al haz de irradiación. Por otra parte, cabe destacar que toda dosis generada por una concentración de ^{10}B supuesta, es decir la componente D_B , se suma a la dosis generada por las componentes antes mencionadas.

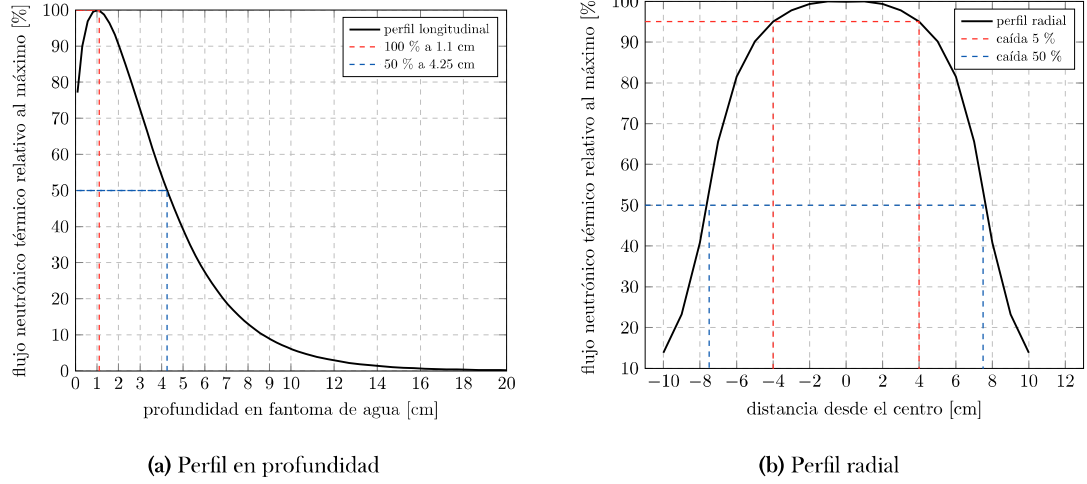


Figura 3.8: Perfiles de flujo de neutrones térmicos en fantoma de agua. En particular, en la figura (3.8b) se muestra el perfil radial a la profundidad de ocurrencia del flujo máximo del perfil en profundidad.

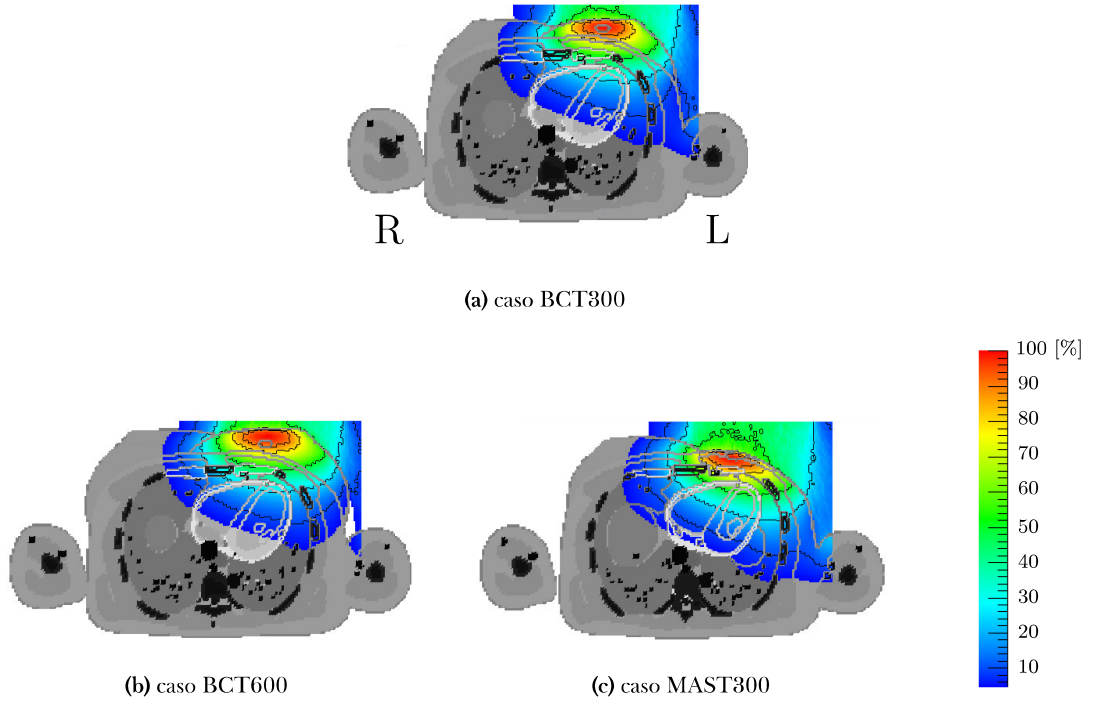


Figura 3.9: Distribución de flujo neutrónico térmico en fantomas antropomórficos para los casos clínicos de estudio con incidencia frontal del haz de irradiación (R: derecha, L: izquierda). Los cortes presentados en las imágenes corresponden al plano transversal en el que ocurre el máximo del flujo neutrónico. Estas imágenes fueron generadas con el programa computacional de visualización gráfica Moritz ver. 1.25, White Rock Science.

En este punto del desarrollo, es conveniente recordar que se propusieron tres casos clínicos de estudio definidos en la sección 3.4.5 y denominados BCT300 y BCT600, para aquellos casos de recaída luego del tratamiento conservador en mama de 300 y 600 ml, respectivamente, y MAST300, para el

caso de recaída posmastectomía con mama contralateral de 300 ml. Por cada caso, se estudiaron dos prescripciones de dosis en tumor, 15 y 21 Gy-Eq, establecidas en el cuadro 3.2. De forma de presentar toda la información de manera clara y concisa, se optó por mostrar los gráficos correspondientes a los DVH con todos los órganos involucrados particularizando para uno solo de los casos estudiados, BCT300, y luego abordar el análisis y discusión sobre los principales órganos expuestos.

En la figura 3.10, se muestra el gráfico correspondiente al DVH para el caso BCT300 para una dosis prescrita en tumor de 15 Gy-Eq. Dadas las características particulares, no es posible apreciar con claridad la distribución de dosis en cada órgano, debido a que la diferencia que existe entre la distribución en tumor y el resto de los órganos hace que la distribución de estos últimos se vea comprimida y con dificultad para apreciar los detalles. Por ello, en la figura 3.10b se presenta el mismo DVH que el de la figura 3.10a pero en escala semilogarítmica, con la que claramente es posible apreciar los detalles que pueden resultar de interés. Por otra parte, en la figura 3.10c se muestra el DVH en la misma escala para el mismo caso clínico pero con una prescripción de dosis en tumor de 21 Gy-Eq.

La estrategia de análisis en este primer abordaje fue determinar el tiempo de irradiación de forma que la dosis en el órgano limitante se encuentre por debajo del valor de la dosis máxima en dicho órgano, y para ese tiempo, establecer la concentración de ^{10}B tal que se alcance la dosis mínima prescrita en tumor. Teniendo esto en cuenta, a partir de los resultados obtenidos y los valores de dosis establecidos en los cuadros 3.1 y 3.2, se determinó que el órgano que alcanza el valor de dosis límite establecido, y en consecuencia limita el tiempo de irradiación, es la mama contralateral. Las demás estructuras sanas presentan distribuciones de dosis cuyos valores máximos se encuentran por debajo de los valores límites previamente establecidos, y más aún, el promedio de dosis en cada órgano dista de su respectivo valor de dosis máxima. Esto se observó en todos los casos estudiados. A partir de los DVH presentados, en la figura 3.10b para alcanzar una dosis máxima de 2.2 Gy-Eq en la mama contralateral (el valor máximo establecido en 3.2 fue de 2.25 Gy-Eq^x) el tiempo de irradiación determinado fue de 650 segundos, mientras que la concentración de ^{10}B en tumor para entregar una dosis mínima de 15.17 Gy-Eq fue de 90 ppm. Por otra parte, haciendo referencia a la figura 3.10c, el tiempo de irradiación para alcanzar una dosis máxima de 3.08 Gy-Eq en la mama contralateral fue de 910 segundos, manteniendo el valor de la concentración de boro en tumor en 90 ppm para alcanzar 21.24 Gy-Eq de dosis mínima. Aquí cabe destacar que la relación de dosis entre el esquema de 21 Gy-Eq y el de 15 Gy-Eq es de 1.4, lo mismo ocurre con la dosis máxima en el órgano limitante, y de esta forma, manteniendo fija la concentración de boro, el tiempo de irradiación se incrementa en el mismo factor. El análisis y discusión de estos valores se abordará más adelante en conjunto con la presentación de los valores correspondientes a los demás casos estudiados.

Continuando el análisis enfocado en el caso BCT300, y en particular, para lograr una mayor comprensión, resulta de interés presentar y analizar las componentes de dosis que conforman la distribución de dosis total en tumor y en la mama contralateral para ambos esquemas de prescripción de dosis y que se presentan en la figura 3.11.

En el caso de las componentes de dosis D_B y D_{th} , la distribución de dosis en tumor no muestra grandes variaciones. Esto se debe a que ambas encuentran origen en la misma componente de flujo neutrónico. La única diferencia que exhiben es en términos del valor absoluto de dosis dada por la concentración de ^{10}B y el flujo. Las restantes componentes, D_f y D_γ , se distribuyen en forma heterogénea,

^xComo criterio conservador se optó por proponer un valor de dosis apenas inferior al límite de dosis establecido, como así también, de igual forma, se propuso un valor de dosis en tumor apenas por encima de la dosis mínima prescrita.

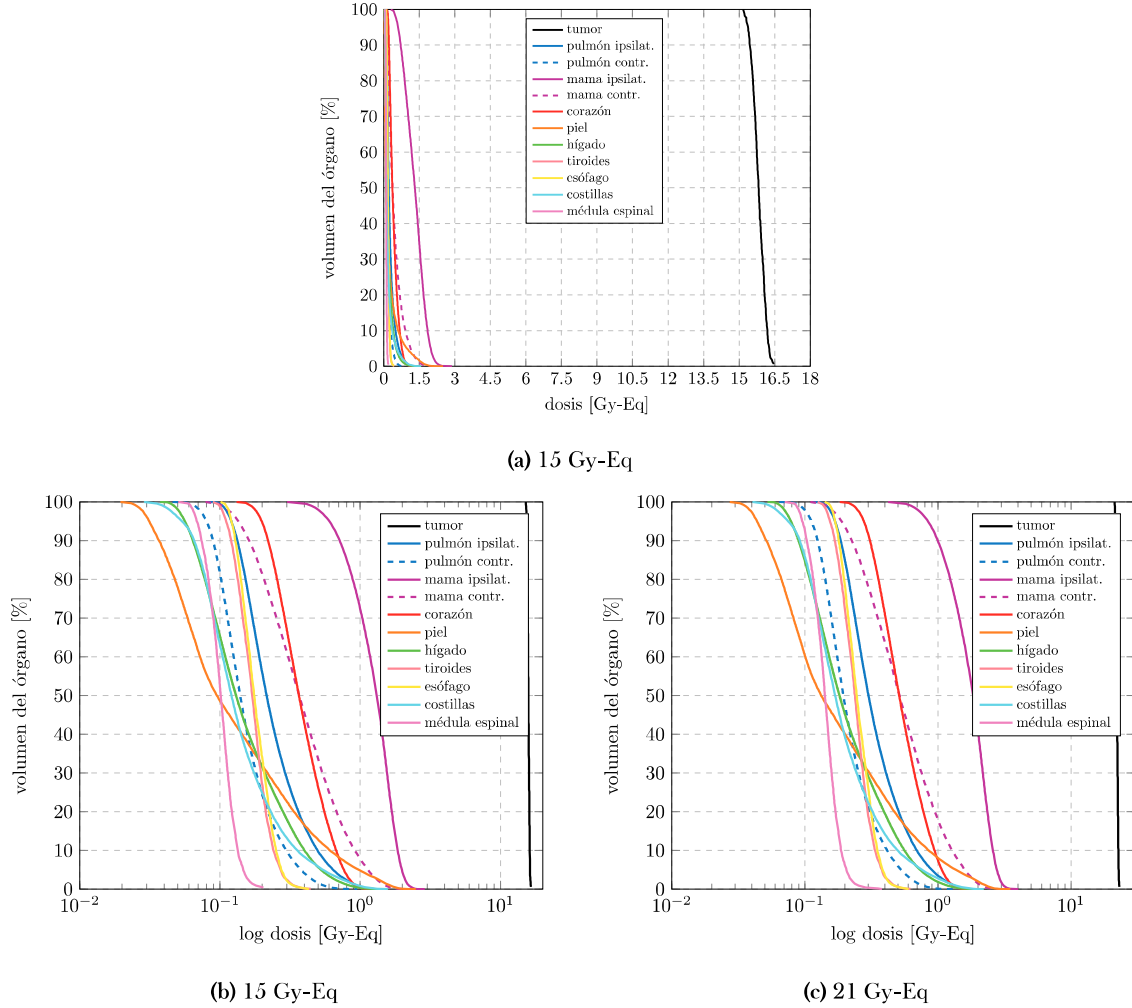


Figura 3.10: DVH para el caso clínico BCT300 asumiendo que los órganos sanos no concentran ^{10}B y el tumor presenta una concentración tal que permite entregar la dosis mínima prescrita en tumor manteniendo la dosis por debajo de los valores límites establecidos para cada órgano. En la figura (3.10a) se muestra el DVH para la prescripción en tumor de 15 Gy-Eq en escala lineal. En las figuras (3.10b) y (3.10c), se muestran los DVH en escala semilogarítmica para 15 Gy-Eq y 21 Gy-Eq, respectivamente.

superando la dosis máxima presentada por la componente D_{th} . Por otra parte, la distribución de las distintas componentes de dosis en la mama contralateral exhiben gran variabilidad. Esto se debe a la distribución de la componente rápida del flujo neutrónico y del flujo de fotones que alcanzan al órgano, lo cual genera la marcada variación evidenciada al comparar la dosis máxima y la dosis promedio en este órgano. Por su parte, las componentes D_f y D_γ presentan un valor de dosis máxima mayor respecto a la componente D_{th} , siendo entonces, bajo estas condiciones, las componentes de mayor relevancia en la contribución a la dosis total y, en consecuencia, las componentes que limitan la dosis en el órgano en cuestión. El efecto de aumentar el tiempo de irradiación queda evidenciado al comparar las componentes de dosis de los esquemas de prescripción de dosis analizados: la forma y distribución no cambian, ya que los flujos correspondientes son los mismos, sólo se modifican los valores absolutos de las dosis de cada componente.

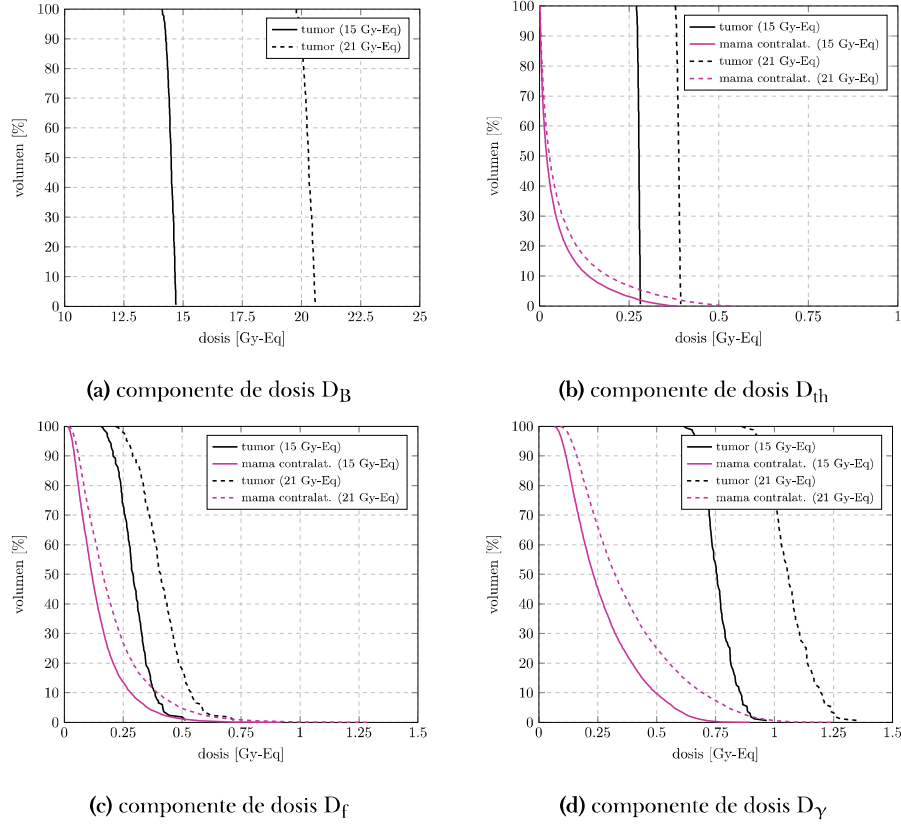


Figura 3.11: DVH de las componentes de dosis para el caso BCT300 para una concentración de ^{10}B en tumor de 90 ppm y asumiendo una concentración igual a cero en órganos sanos.

A continuación, se analizan y comparan los requisitos de concentración de ^{10}B y tiempos de irradiación para administrar la dosis prescrita en tumor en los diferentes casos estudiados, asegurando, además, que la dosis en los órganos sanos se encuentre entre los márgenes de seguridad establecidos. Para este fin, es conveniente recordar que en todos los casos analizados se requirió dar como mínimo la dosis prescrita, hacerlo en términos de la dosis media dejaría fracciones del volumen subdosados. En la figura 3.12 se muestran los DVH obtenidos en tumor contemplando ambas prescripciones de dosis. De forma de describir las distribuciones de dosis, es conveniente hacerlo en términos del Índice de Uniformidad (UI, por sus siglas en inglés), el cual se define como $UI = D_{5\%}/D_{95\%}$, es decir, el cociente entre las dosis correspondientes al 5 % y el 95 % del volumen evaluado [225]. Un valor $UI = 1$ representa una dosis uniforme en el volumen en cuestión. Si bien ya fue abordado con anterioridad, por completitud del análisis, se menciona que con 90 ppm de concentración de ^{10}B en tumor, la dosis prescrita de 15 Gy-Eq se alcanza en 650 s, mientras que es necesario un tiempo de irradiación de 910 s para alcanzar 21 Gy-Eq. La distribución de dosis en el tumor, tal como lo muestran las figuras 3.12a y 3.12b, se presenta sin grandes variaciones en el volumen evaluado, con un valor $UI = 1.0582$, muy cercano al valor de 1, razonable por el tamaño del tumor, volumen circundante y tamaño del puerto de irradiación. Por otra parte, en el caso BCT600, la dosis prescrita de 15 Gy-Eq en tumor se alcanza con una concentración de 120 ppm para un tiempo de irradiación establecido por el límite de dosis en la mama contralateral de 610 s, mientras que para el esquema de 21 Gy-Eq este tiempo es de 854 s. Los resultados de la

distribución de dosis permiten calcular el parámetro $UI = 1.1371$, presentando una mayor variación en comparación al caso BCT300. Finalmente, en el caso MAST300, se requiere de una concentración de ^{10}B de 172 ppm para alcanzar la dosis prescrita de 15 Gy-Eq en 628 s, mientras que para el esquema de 21 Gy-Eq el tiempo de irradiación es de 879 s. Tal como lo representan sus respectivos DVH, la distribución de dosis en este caso presenta una gran variación, tal como además lo describe el valor $UI = 1.4660$, siendo, además, la dosis máxima entregada al tumor un 73 % mayor a la dosis mínima.

Comparando los distintos casos analizados, si bien los tiempos de irradiación establecidos son similares, lo cual resulta entendible ya que este parámetro fue impuesto por la dosis limitante en la mama contralateral, se puede apreciar que el requerimiento de concentración de boro es más exigente para los casos BCT600 y MAST300, siendo mayor para el caso de la mastectomía. Aquí se evidencia el rol de la distribución de la componente de flujo neutrónico térmico en función de la profundidad del tumor: en el caso de la mastectomía el tumor presenta una ubicación superficial, mientras que en los casos restantes el tumor se ubica a mayor profundidad. Cabe destacar que con la profundidad de la ubicación del tumor en la mama, aumenta la cantidad de tejido circundante, que presenta una función tan involuntaria como relevante y que es la de *termalizar*, o disminuir la energía de las componentes neutrónicas más energéticas, incrementando, de esta forma, el flujo de neutrones térmicos en la zona. En este punto es necesario decir que este fenómeno presenta un límite, tal como lo muestra la figura 3.8a. Claro está que esta termalización presenta un costo en términos de la dosis, lo cual queda expuesto en el análisis de la dosis total por componentes (figura 3.11). En el caso de la mastectomía no hay tejido circundante que permita disminuir la energía de los neutrones más energéticos y, en consecuencia, la distribución de dosis, signada principalmente por la distribución de flujo neutrónico térmico, presenta las variaciones que se muestran en la figura 3.12.

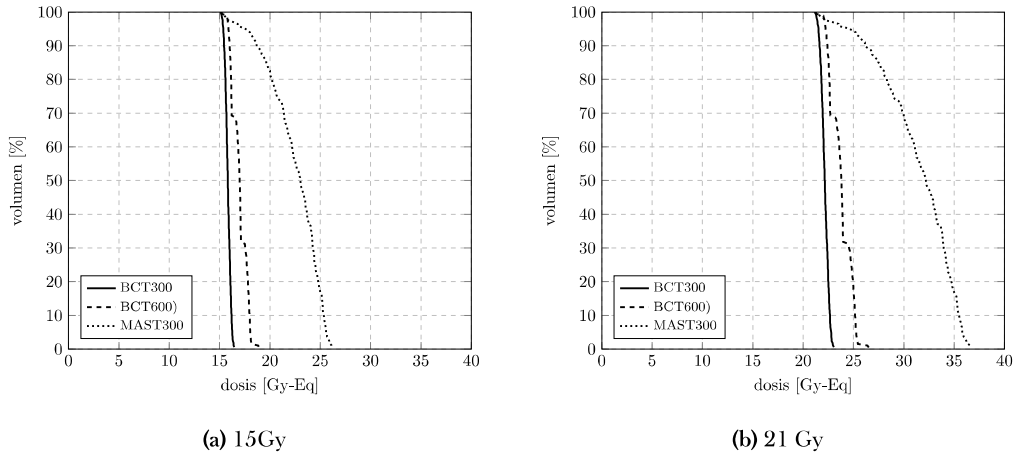


Figura 3.12: DVH del tumor para los distintos casos propuestos y esquemas de dosis prescrita, suponiendo que los órganos sanos no concentran ^{10}B .

3.5.4. Resultados contemplando la incorporación de ^{10}B en tumor y órganos sanos

En el siguiente abordaje que completa el análisis propuesto, se presentan distintos escenarios que consideran la presencia de concentración de ^{10}B en los órganos sanos. En comparación al análisis anterior, en estos casos se suma la componente de dosis D_B a la dosis total de cada uno de estos órga-

nos. A partir de lo dicho, se deben hacer algunas consideraciones sobre la concentración de ^{10}B en los diferentes órganos. En primer lugar, se contempló un escenario dado por la experiencia de la aplicación clínica de BNCT empleando BPA-f, en el cual la relación de concentración de ^{10}B entre tumor y sangre ($C_{10\text{B T}} : C_{10\text{B S}}$) se asumió de (3:1) y la relación de concentración entre piel y sangre se asumió de (1.5:1) [226]. De la experiencia de aplicación de BNCT, los valores asumidos fueron de 30 ppm para tumor, 15 ppm en piel y 10 ppm en el resto de los tejidos sanos considerados. En el segundo escenario de análisis se contemplaron las perspectivas del empleo de transportadores de compuestos borados basados en liposomas, como los desarrollados en la sección 4.2^{xi}. Si bien esto requiere de estudios de biodistribución en un modelo *in vivo* apropiado que reproduzca las características del tumor a tratar^{xii}, al no contar con datos propios se optó por considerar un criterio teniendo en cuenta valores publicados en otro estudio. En 2019, Khan y col., presentaron los resultados de un estudio en el que, previo a mostrar el encapsulamiento de compuestos borados en liposomas, se optimizó el diseño del nanovehículo para su estudio en un modelo de tumor mamario. A partir del análisis de la cinética de su biodistribución, determinaron que la relación óptima de concentración de ^{10}B en tumor y sangre ocurría a 54 h de la administración, alcanzando una concentración de 60 ppm en tumor, mientras que la concentración en sangre fue de 10 ppm, es decir una relación de (6:1) [227]. Teniendo en cuenta estos valores, se propuso realizar el análisis de dosimetría contemplando un valor de concentración de ^{10}B de 60 ppm en tumor y 10 ppm en órganos sanos, incluida la piel. De esta forma, el presente es un análisis orientativo que busca evaluar los requerimientos de irradiación a partir del estudio de dos escenarios. En el primero se contempla la experiencia de la aplicación de BNCT empleando BPA-f, mientras que en el segundo se propone un escenario factible, en el cual se considera el empleo de nanovehículos transportadores de compuestos borados y se requiere que la concentración de ^{10}B en tumor sea el doble de la concentración supuesta en el primer escenario. Tal como se abordará en el próximo capítulo, los liposomas como nanovehículos transportadores de compuestos borados pueden ser optimizados a partir de su diseño, contemplando su tamaño y composición lipídica junto al empleo de la estrategia de direccionamiento específico como, por ejemplo, el uso fracciones de anticuerpos capaces de asociarse a proteínas sobre-expresadas en las membranas de las células tumorales (ver sección 4.1.3).

Teniendo en cuenta los distintos escenarios de concentración de ^{10}B comentados anteriormente y las dos prescripciones establecidas de dosis en tumor, 15 y 21 Gy-Eq, en la evaluación dosimétrica de los distintos casos propuestos se definieron cuatro esquemas de irradiación, presentados en el cuadro 3.3.

Si bien en el estudio de dosimetría se contemplaron los órganos definidos en la figura 3.6, en el análisis que se presenta a continuación, se hace énfasis solo en los órganos sanos mayormente expuestos en términos de límites de dosis de acuerdo a la bibliografía y descritos dentro de los criterios de abordaje establecidos en los cuadros 3.1 y 3.2. En los casos BCT300 y BCT600, estos órganos comprenden el pulmón (ipsilateral y contralateral), el corazón, la piel y la mama (ipsilateral y contralateral), mientras que en el caso MAST300, a los ya mencionados, se incluyen las costillas y el hígado. En todos los casos de estudio, los órganos mencionados se evaluaron en términos de sus DVH correspondientes obtenidos

^{xi}Es importante destacar que aquí se hace evidente la conexión que existe entre los estudios vinculados al desarrollo de transportadores de compuestos borados, que involucran sus respectivos ensayos en modelos *in vitro* y estudios de biodistribución en modelos *in vivo*, con el estudio de dosimetría computacional.

^{xii}Los referidos estudios de biodistribución permiten establecer la biodistribución en tumores y los órganos sanos de interés considerando, además, la cinética de este proceso para así comprender cuál es el tiempo en el cual ocurren las condiciones óptimas de concentración diferencial de ^{10}B en tumor y en la sangre.

Esquema propuesto	C _{10B} en tumor [ppm]	C _{10B} en piel [ppm]	C _{10B} en otros órganos sanos [ppm]	Dosis prescrita [Gy-Eq]
Esquema A	30	15	10	15
Esquema B	60	10	10	15
Esquema C	30	15	10	21
Esquema D	60	10	10	21

Cuadro 3.3: Esquemas definidos en términos de concentraciones de ^{10}B (C_{10B}) y prescripción de dosis y contemplados el análisis de dosimetría propuesto.

para cada esquema propuesto y definido en el cuadro 3.3.

3.5.4.1. Casos de recaída postratamiento conservador - haz frontal

A continuación, se aborda la presentación de los resultados del análisis de dosimetría contemplando, en primer lugar, los casos BCT300 y BCT600. Dadas las características particulares del caso de estudio de la recaída posmastectomía, la presentación de su análisis se aborda por separado. En las figuras 3.13 y 3.14 se muestran los resultados de las distribuciones de dosis en los distintos órganos de interés obtenidos para cada esquema propuesto para los casos BCT300 y BCT600, respectivamente.

Tal como es de esperar, los esquemas que contemplan 30 ppm de concentración de ^{10}B en tumor requieren de un mayor tiempo de irradiación respecto a los esquemas de 60 ppm para entregar la dosis prescrita, lo cual tiene como consecuencia un aumento de la dosis en todos los órganos sanos. En cuanto a la mama, tanto ipsilateral como contralateral, cuando para un mismo esquema de concentración de ^{10}B se comparan las dosis alcanzadas para las prescripciones de 15 y 21 Gy-Eq en tumor, se encuentra que no hay diferencias en el incremento porcentual respecto a la dosis límite en dichos órganos. Esto se debe a que, de acuerdo lo criterios exhibidos, la dosis límite establecida se incrementa en el mismo factor que la dosis prescrita en tumor y lo mismo ocurre con el tiempo de irradiación. En el caso BCT300 para los esquemas de 30 ppm (A y C), los tiempos de irradiación se encuentran entorno a los 28 min para 15 Gy-Eq y 39 min para 21 Gy-Eq, mientras que para los esquemas de 60 ppm (B y D), estos tiempos son del orden de 15 min y 21 min, respectivamente.

Por su parte, el caso BCT600 para los esquemas de 30 ppm de concentración de ^{10}B en tumor, requiere de tiempos de irradiación entorno a los 34 min para 15 Gy-Eq y 47 min para 21 Gy-Eq, mientras que para el escenario de 60 ppm estos tiempos disminuyen hasta ubicarse entorno a los 19 min y 26 min, respectivamente. El incremento de tiempos de irradiación en ambos casos (BCT600 respecto a BCT300) para los diferentes esquemas propuestos evidencia una disminución del flujo de neutrones térmicos en el tumor debido a la ubicación del mismo en términos de profundidad.

A partir del análisis de los resultados obtenidos de acuerdo a los DVH presentados tanto en la figura 3.13 como en la figura 3.14 y los criterios de dosis en órganos sanos definidos en los cuadros 3.1 y 3.2, la mama contralateral resultó ser el órgano más crítico en términos de dosis entregada y volumen de órgano expuesto. Por esta razón se abordará su análisis con especial atención luego de presentar el análisis en los demás órganos sanos previamente establecidos.

Para el caso BCT300, contemplando tanto los pulmones como la mama ipsilateral y la piel, el análisis de los resultados muestra que para los esquemas de 30 ppm de concentración de ^{10}B en

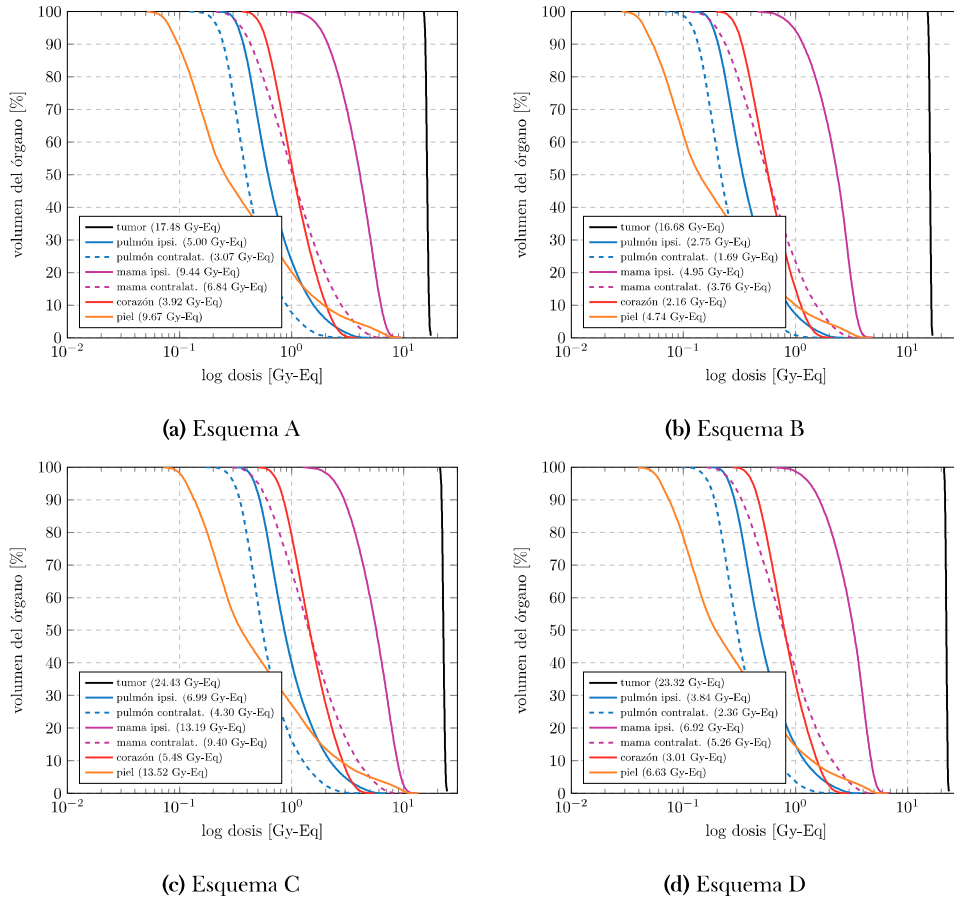


Figura 3.13: DVH obtenidos para el caso BCT300 evaluando diferentes esquemas de irradiación. El valor de dosis mostrado como (X Gy-Eq) en la leyenda de cada figura, corresponde al valor máximo de dosis alcanzada.

tumor, A y C, el volumen de estos órganos que recibe una dosis superior a los respectivos valores de dosis establecidos es menor al 1 %. Como es de esperar, dado el incremento del tiempo de irradiación, el esquema de prescripción de dosis de 21 Gy-Eq, esquema C, muestra mayores incrementos respecto al esquema de 15 Gy-Eq (esquema A). En el caso de los pulmones, para el esquema C, el 0.6 % del volumen del pulmón ipsilateral recibe una dosis 40 % mayor al límite establecido, mientras que, en estos mismos términos, el 0.28 % del volumen del pulmón contralateral recibe una dosis 43 % mayor. En el caso del corazón, para el valor límite de dosis establecido de 3 Gy, para el esquema A, un volumen de 2.7 ml recibe una dosis 31 % mayor, mientras que para el esquema C, 39.4 ml de este órgano recibe una dosis 83 % mayor al valor de dosis establecido. En estos mismo términos, para los esquemas A y C, el 0.45 % del volumen de la mama ipsilateral es alcanzada por un incremento de dosis del 20 %. Por otra parte, para los esquemas de 60 ppm, B y D, tanto para la prescripción de dosis de 15 como 21 Gy-Eq, no se supera el límite de dosis establecido en ninguno de estos órganos (pulmones, mama ipsilateral, piel y corazón).

Haciendo el mismo análisis que el recién expuesto, y en comparación con éste, para el caso BCT600 el valor de dosis que reciben los órganos bajo análisis es mayor debido al incremento del tiempo de irradiación necesario para alcanzar la dosis prescrita en tumor. En los pulmones, para el

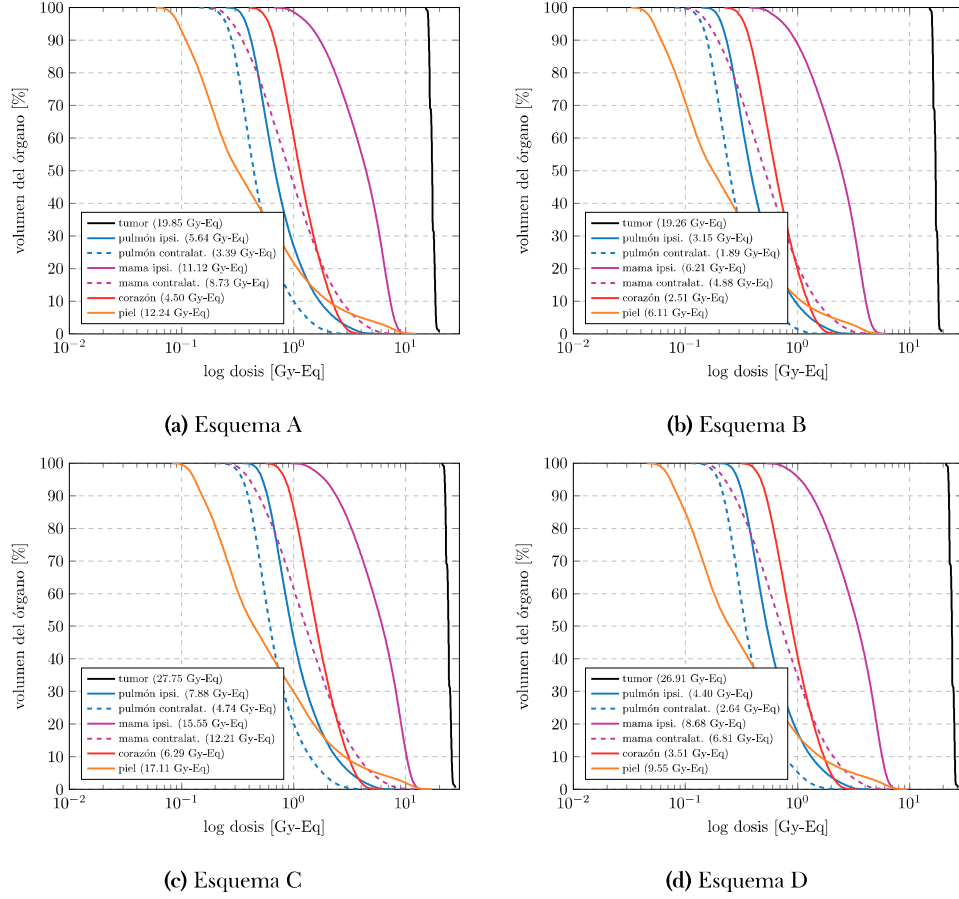


Figura 3.14: DVH obtenidos para el caso BCT600 evaluando diferentes esquemas de irradiación. El valor de dosis mostrado como (X Gy-Eq) en la leyenda de cada figura, corresponde al valor máximo de dosis alcanzada.

esquema de 30 ppm de concentración de ^{10}B en tumor y 15 Gy-Eq de dosis prescrita, tanto para el pulmón ipsilateral como el contralateral, el 0.02 % del volumen recibe una dosis un 13 % superior a la dosis límite establecida. Para el esquema de 21 Gy-Eq de dosis prescrita, tanto el 1.07 % del volumen del pulmón ipsilateral como el 0.49 % del contralateral, reciben una dosis 58 % superior al valor límite de dosis establecido en cada órgano. En cuanto al corazón, para la dosis prescrita de 15 Gy-Eq, un volumen de 7.26 ml recibe una dosis un 50 % mayor al límite establecido, mientras que en el caso de una prescripción de dosis de 21 Gy-Eq, 59.2 ml del órgano recibe una dosis 96 % mayor al límite de dosis establecido. Respecto a la piel, si bien no se supera en ningún caso el límite establecido de 18 Gy-Eq para descamación húmeda, teniendo en cuenta el límite propuesto por Kennedy y col. (ver tabla 3.1), para la prescripción de dosis en tumor de 15 Gy-Eq, el 0.5 ml de piel recibe una dosis 22 % mayor a 10 Gy-Eq mientras que para 21 Gy-Eq, un volumen de 7.78 ml de piel recibe una dosis 71 % mayor que la dosis límite establecida. Para el caso de la mama ipsilateral, tanto en el esquema A y C, el volumen de este órgano que recibió un incremento de dosis del 48 % respecto a los valores límites establecidos fue de 7.8 %. Nuevamente, tal como se describió para el caso BCT300, en los esquemas de 60 ppm de concentración de ^{10}B en tumor, B y D, no se supera el valor límite de dosis establecido en ninguno de estos órganos (pulmones, mama ipsilateral, piel y corazón).

Por otra parte, tal como se comentó anteriormente, la mama contralateral se presenta como el órgano de riesgo identificado en términos de la dosis que recibe respecto al criterio definido. Para los dos casos analizados, ninguno de los esquemas propuestos cumple en forma estricta con el requisito de mantener la dosis que recibe este órgano por debajo del límite establecido. En el caso BCT300, para los esquemas de 30 ppm de concentración de ^{10}B y para ambas prescripciones de dosis en tumor, esquemas A y C, el incremento porcentual de la dosis máxima es de 204 % y el volumen porcentual del órgano que recibe un valor de dosis mayor al límite establecido esta entorno al 15.5 %. Mientras que para los esquemas de 60 ppm, B y D, el incremento de la dosis máxima es del 67 % y el volumen porcentual involucrado del órgano es inferior al 3 %. Por otra parte, haciendo este mismo análisis para el caso BCT600, el incremento porcentual de la dosis máxima para los esquemas A y C es de 288 %, y el volumen porcentual del órgano que recibe un valor de dosis mayor al límite establecido es de 14 %. Para los esquemas B y D, el incremento de dosis es del 117 % y el volumen involucrado es 3.5 %.

3.5.4.2. Casos de recaída postratamiento conservador - haz oblicuo

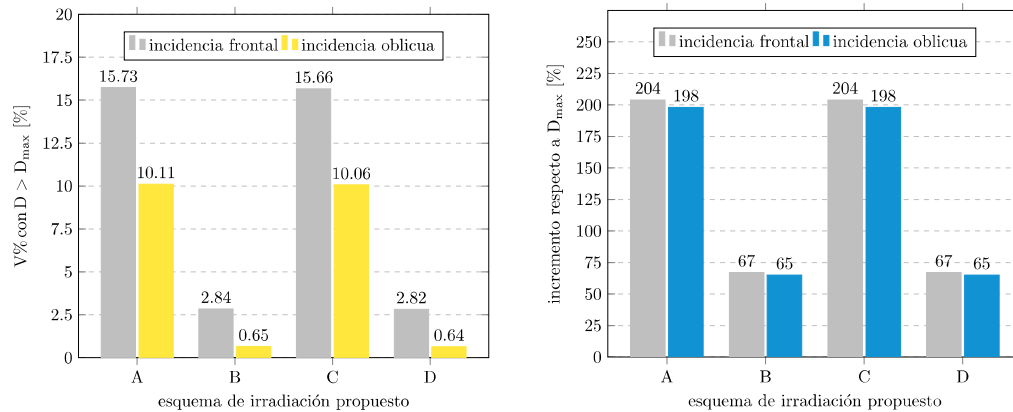
A partir de los resultados que se desprenden del análisis anterior, se propuso modificar el ángulo de incidencia del haz de forma de exponer en menor medida a la mama contralateral y resguardando los demás órganos sanos. Esto permitiría aumentar el tiempo de irradiación en el cual se alcanza la dosis límite en el órgano sano identificado pero, claro está, también puede tener consecuencias en la distribución de flujo neutrónico en el tumor. Se propuso un ángulo de incidencia de 5° respecto a la incidencia frontal del haz, evaluada anteriormente.

A continuación se presentan los resultados obtenidos, tal como se viene haciendo en este análisis en términos de la dosis entregada en los órganos sanos. En el caso BCT300, el cambio de incidencia del haz aumenta el tiempo de irradiación entorno a 24.3 % y 24.7 % para el esquema de 30 ppm y el esquema de 60 ppm, respectivamente. En particular, el único esquema que presenta incrementos por sobre la dosis límite establecida en todos los órganos de interés es el de 30 ppm y 21 Gy-Eq de prescripción de dosis en tumor. En este caso, la dosis entregada en el pulmón ipsilateral se incrementa un 48 % respecto al valor de dosis límite establecido y el volumen porcentual que excede este límite es de 0.48 %, mientras que en el caso del pulmón contralateral un volumen porcentual del 0.03 % de este órgano es alcanzado por una dosis un 30 % mayor al valor límite establecido. En cuanto al corazón, un volumen de 30.3 ml recibe una dosis 89 % mayor a la dosis establecida en este órgano, mientras que menos de 2.4 ml de la piel reciben una dosis 35.2 % superior al valor de dosis de 10 Gy-Eq. En términos generales, comparando los resultados de la irradiación frontal y la irradiación con incidencia oblicua, si bien se observan muy leves mejoras a favor de esta última, el volumen porcentual que se excede en el valor de dosis límite establecida de cada órgano, no presenta grandes variaciones.

Por otra parte, en el caso BCT600 los tiempos de irradiación en la propuesta de incidencia oblicua aumentan muy levemente respecto a la incidencia frontal en todos los esquemas analizados (4.3 % y 3.4 % para el esquema de 30 ppm y el esquema de 60 ppm, respectivamente). En forma similar a lo ocurrido en el caso BCT300, el único esquema que presenta incrementos por sobre la dosis límite establecida en todos los órganos de interés para el caso BCT600 es el de 30 ppm y 21 Gy-Eq de prescripción de dosis en tumor. Particularizando en este esquema, el 0.24 % del pulmón ipsilateral recibió un valor de dosis un 38 % mayor al valor límite establecido mientras que en el caso del pulmón contralateral el 0.01 % de su volumen recibió un valor de dosis 23 % mayor al respectivo valor de dosis límite establecido. En cuanto al corazón, un volumen de 19.6 ml recibió una dosis un 74 % mayor al límite requerido,

y en el caso de la piel un volumen de 8.5 ml recibió una dosis 60 % mayor al valor de dosis límite de 10 Gy-Eq. Finalmente, en cuanto al esquema 30 ppm y 15 Gy-Eq, en dos órganos, si bien se exceden los valores de dosis límites, se cumple el criterio contemplando el volumen: 0.63 ml del corazón recibió una dosis 25 % mayor y menos de 1 ml de la piel recibió una dosis 14.6 % mayor al valor de dosis límite de 10 Gy-Eq.

En términos de la mama contralateral, los resultados de la comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz se presentan en las figuras 3.15 y 3.16 para BCT300 y BCT600, respectivamente. La incidencia oblicua del haz de irradiación presenta una mejora en términos de disminución del volumen porcentual de la mama contralateral que recibe un valor de dosis mayor que el establecido, como así también presenta una disminución de la dosis entregada a dicho órgano.



(a) Volumen porcentual del órgano que recibe una dosis mayor al valor de dosis límite establecido.

(b) Incremento porcentual de la dosis respecto al valor de dosis límite establecido.

Figura 3.15: Comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz en la mama contralateral para el caso BCT300 para los distintos esquemas de análisis propuestos.

En el caso BCT300, para el esquema de 30 ppm y para ambas prescripciones de dosis en tumor, la disminución porcentual del volumen que recibe una dosis mayor al límite establecido es de un 36 % respecto a la incidencia frontal, mientras que la dosis máxima presenta un incremento porcentual del 198 % respecto al valor establecido. Para el esquema de 60 ppm la disminución porcentual del volumen alcanzado es del 77 % respecto a la incidencia frontal y la dosis máxima muestra un incremento porcentual del 65 % respecto al valor de dosis establecido. Por otra parte, en el caso BCT600 se observa un comportamiento similar al presentado en el caso BCT300. Para el esquema de 30 ppm, se observa una disminución porcentual del 33 % del volumen del órgano que recibe una dosis mayor al límite establecido y la dosis máxima que recibe el órgano muestra un incremento porcentual del 158 % respecto a este valor. El esquema de 60 ppm muestra un mejor desempeño en términos de los parámetros evaluados: el volumen del órgano que recibe una dosis mayor a la establecida como valor límite presenta una disminución porcentual del 85 % respecto a la incidencia frontal del haz y un incremento porcentual de la dosis máxima correspondiente a un 43 %.

Como se dijo anteriormente, en ninguno de los casos y esquemas propuestos analizados se logra mantener el valor de la dosis máxima de la mama contralateral por debajo del valor límite de dosis establecido. Sin embargo, la propuesta de incidencia oblicua del haz de irradiación mostró una marcada

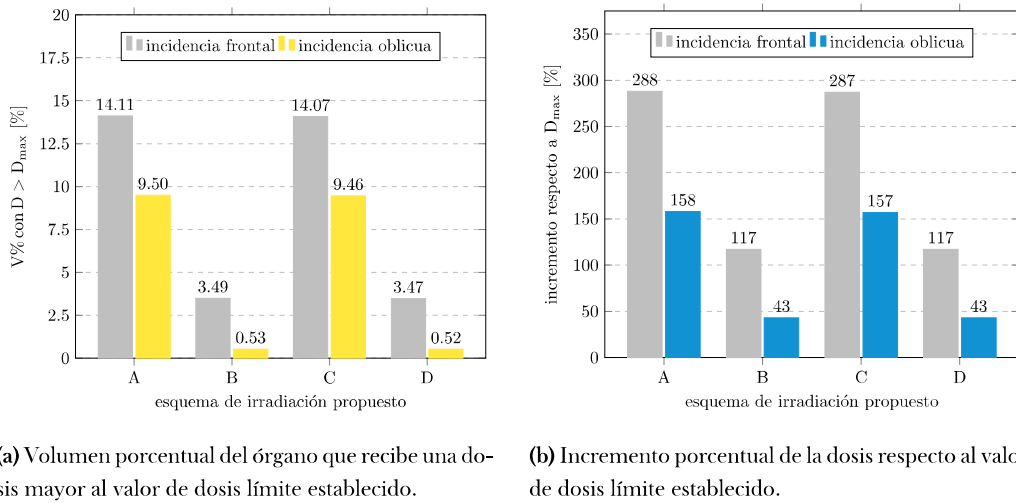


Figura 3.16: Comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz en la mama contralateral para el caso BCT600 para los distintos esquemas de análisis propuestos.

mejora, siendo los esquemas de 60 ppm para 15 Gy-Eq y 21 Gy-Eq, esquemas B y D respectivamente, los que logran el mejor desempeño entre los esquemas analizados. De manera de comprender las posibles implicancias de estos apartamientos, a continuación se muestra una comparación de los valores de dosis máxima entregada en la mama contralateral con las técnica SBRT presentados por Vermeulen y col. y Obayomi-Davies y col., en esquemas fraccionados y en los cuales han reportado, tal como se mencionó anteriormente, buenos a excelentes resultados en términos de toxicidad aguda y cosméticos. Los esquemas fraccionados comprenden la administración de 30 Gy en 5 fracciones [207, 208] o 34 Gy en 10 fracciones [208]. De manera de poder hacer una comparación entre estos esquemas fraccionados y los propuestos en esta tesis, las dosis en fracción única en tumor y en mama contralateral se calcularon siguiendo el formalismo BED, empleando un valor de $\alpha/\beta = 4.6$ para tumor y un $\alpha/\beta = 3.4$ para la mama sana (ver anexo A.2). De esta forma, en estos estudios se reportaron dosis en fracción única a mama contralateral de 5.9 Gy-Eq [207] y hasta 8.6 Gy-Eq con una media de 3.9 Gy-Eq [208].

A partir de la figura 3.17, teniendo en cuenta la incidencia oblicua del haz tanto para el caso BCT300 como para BCT600, se puede apreciar que para los esquemas de 30 y 60 ppm para una dosis prescrita de 15 Gy-Eq en tumor (A y B), comparable con los trabajos citados, la dosis máxima en mama contralateral se mantiene por debajo de la máxima dosis entregada en los reportes consultados. Incluso el esquema B es el único cuyos valores de dosis máxima en mama contralateral están por debajo de los reportes citados. Por otra parte, para el esquema de 30 ppm y 21 Gy-Eq de dosis prescrita en tumor (C), en el caso BCT300 el valor de dosis máxima se encuentra por encima del máximo valor de dosis reportado en los trabajos. Finalmente, cabe destacar que para el caso BCT600 en todos los esquemas propuestos y para ambas prescripciones de dosis en tumor, el valor de la dosis máxima en la mama contralateral se mantiene por debajo de los valores presentados en los trabajos citados.

muestra que el esquema B es el único cuyos valores de dosis máxima en mama contralateral están por debajo de los valores de dosis de los reportes citados. En este mismo sentido, el esquema D queda por debajo de la mediana de los valores de dosis reportados en uno de los estudios.

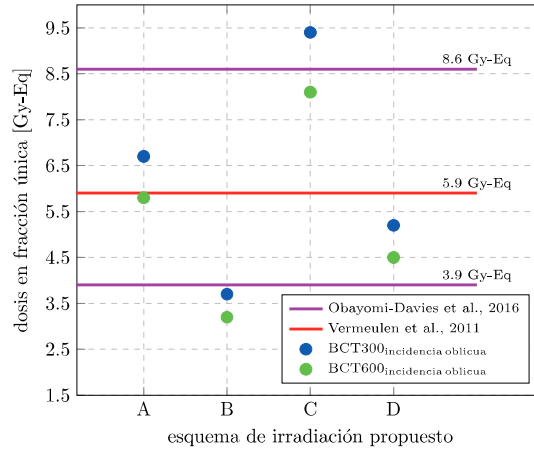


Figura 3.17: Comparación de la dosis máxima entregada por distintos esquemas de BNCT en mama contralateral con esquemas radioterapia fraccionada con modalidad SAPBI.

3.5.4.3. Caso de recaída posmastectomía - haz frontal

Habiendo presentado los resultados obtenidos en la dosimetría para los casos BCT, a continuación se presentan los resultados y el análisis que se desprende de la dosimetría realizada en el caso de la propuesta de tratamiento de una recaída posmastectomía, caso MAST300. Los correspondientes DVH obtenidos de este estudio se muestran en la figura 3.18. Tal como se comentó anteriormente, dada la particularidad del caso, además de los órganos evaluados en los casos anteriores, en este análisis se incluyeron las costillas y el hígado.

Los tiempos de irradiación necesarios para alcanzar la dosis prescrita en tumor en los cuatro esquemas evaluados se incrementaron considerablemente respecto a los casos antes evaluados. Estos tiempos se encuentran en el orden de los 47 y 66 min, para los esquemas A y C respectivamente, y de 27 y 38 min para los esquemas B y D. El incremento para esquemas con una misma concentración de ^{10}B se debe a la diferencia en la prescripción de dosis en tumor entre los esquemas. Como es de esperar debido al incremento del tiempo de irradiación, la dosis en los órganos sanos también se incrementa. En este caso, excepto en esquemas y órganos puntuales, en la mayor parte de los órganos evaluados la dosis máxima supera el valor de dosis límite establecido. Los esquemas B y D presentan los menores incrementos de dosis y el menor volumen porcentual del órgano alcanzado por estos incrementos de dosis, además para estos esquemas no se supera la dosis máxima establecida en costillas e hígado. En particular, para el esquema B el incremento de dosis en pulmón ipsilateral y contralateral es del 23 y 10 % respectivamente, y en ambos órganos el volumen porcentual que recibe esta dosis es menor al 1 %. En el corazón el incremento de dosis es del 62 % y el volumen que es alcanzado por una dosis mayor al valor límite establecido es de 20.7 ml, mientras que en la piel, en este esquema la dosis máxima se mantiene por debajo del valor de dosis límite definido. Para el esquema D, al incrementarse el tiempo de irradiación, estas variables comentadas se incrementan. El incremento de dosis en el pulmón ipsilateral es de 72 % y el volumen porcentual que recibe una dosis mayor al establecido es de 2.3 %, mientras que en estos mismos términos para el pulmón contralateral se obtuvo 52 y 0.5 %, respectivamente. En cuanto al corazón, se tuvo un incremento respecto al valor de dosis máxima establecida de 127 % y el volumen que recibe una dosis mayor al límite establecido es 81.7 ml. Para la piel, menos de 4 ml

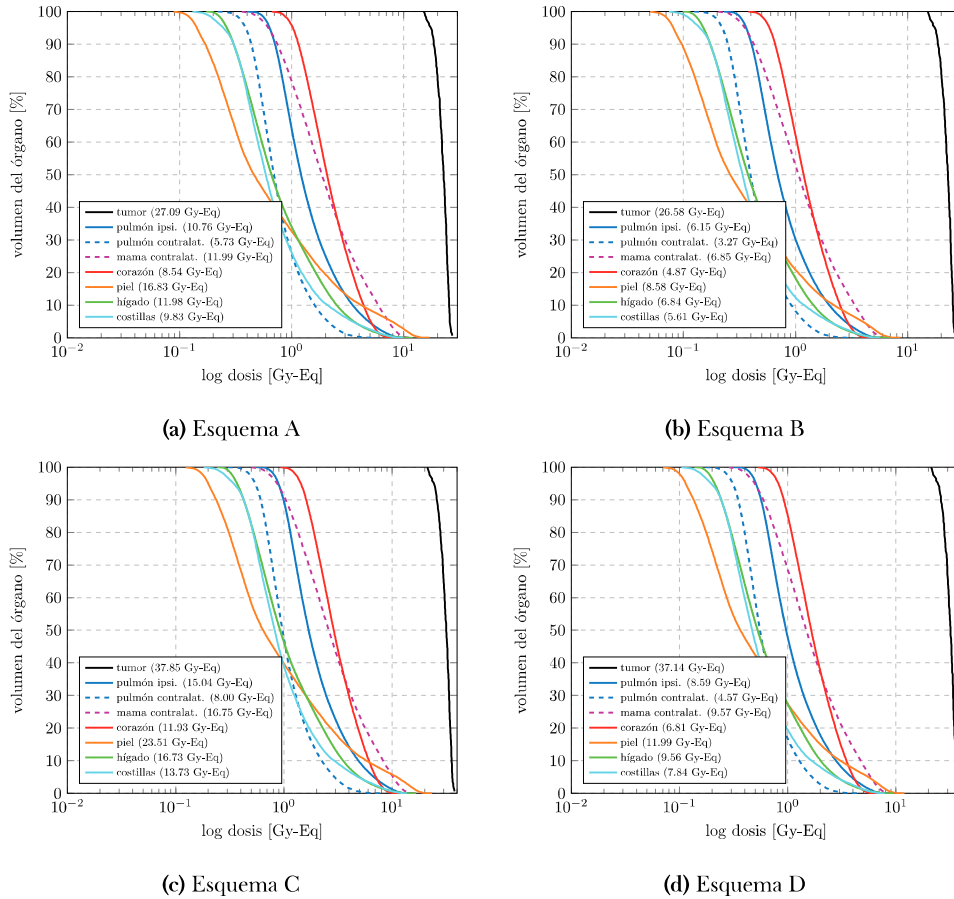


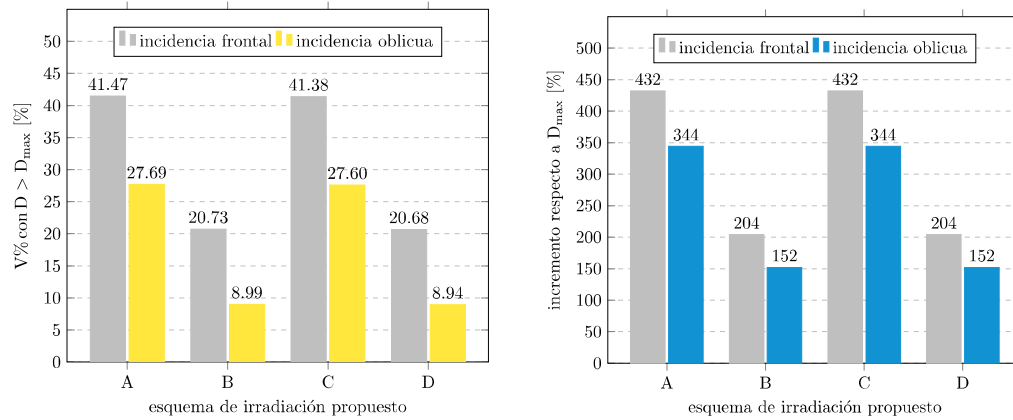
Figura 3.18: DVH obtenidos para el caso MAST300 evaluando diferentes esquemas de irradiación. En valor de dosis mostrado como (X Gy-Eq) en la leyenda de cada figura, corresponde al valor máximo de dosis alcanzada.

reciben una dosis mayor al límite establecido y el incremento respecto a este valor es del 20 %. Por otra parte, para los esquemas A y C estos parámetros están por encima de los recién descritos, por lo cual no se abordan en particular. Respecto a la mama contralateral, en todos los esquemas propuestos, tanto el incremento de dosis como el volumen porcentual que recibe una dosis por encima del límite establecido se sobrepasan ampliamente. Para los esquemas A y C, se tuvo un incremento porcentual del 432 % y un volumen porcentual del órgano involucrado del 41.5 %, mientras que en esquemas B y D, en estos mismos términos se obtuvo un incremento de 204 % y un volumen del órgano de 21 %.

3.5.4.4. Caso de recaída posmastectomía - haz oblicuo

Tal como se presentó en los casos BCT, dados los marcados incrementos en la mama contralateral, se propuso evaluar los efectos debido a la incidencia oblicua del haz con un ángulo de 12°. En cuanto a la dosis recibida en los pulmones, corazón, piel, hígado y costillas, los valores alcanzados con la incidencia oblicua no presentan variaciones apreciables respecto a las dosis entregadas con la incidencia frontal, presentándose un leve incremento en el hígado pero por debajo del valor de dosis límite establecido. Excepto en el pulmón contralateral, en todos estos órganos el volumen porcentual involucrado de cada órgano se mantiene entre los valores encontrados en el caso de irradiación con incidencia frontal.

Para este último parámetro, en el caso del pulmón contralateral, el volumen involucrado se mantiene por debajo del 1.5 % en todos los esquemas. En cuanto a la mama contralateral, los resultados que comparan la incidencia frontal con la incidencia oblicua se presentan en la figura 3.19. Se observa que para la incidencia oblicua y para todos los esquemas, el incremento de dosis respecto al valor establecido como dosis límite, disminuye levemente respecto a la incidencia frontal. Mientras que el volumen del órgano que recibe una dosis mayor al límite establecido disminuye aproximadamente a la mitad respecto al volumen porcentual involucrado en la incidencia frontal.



(a) Volumen porcentual del órgano que recibe una dosis mayor al valor de dosis límite establecido.

(b) Incremento porcentual de la dosis respecto al valor de dosis límite establecido.

Figura 3.19: Comparación entre la incidencia frontal y oblicua del haz en la mama contralateral para el caso MAST300 para los distintos esquemas de análisis propuestos.

3.5.5. Comentarios finales

La aplicación de BNCT conlleva la irradiación en presencia de campos de radiación de diferente LET, los cuales dan origen a las diferentes componentes de dosis, tal como fue descrito en la ecuación 3.15. En el caso de la dosis entregada para lograr el control tumoral, es claro que la componente de dosis que se desea maximizar es la componente D_B . Tal como se definió en el capítulo introductorio de esta tesis, ésta requiere de la presencia y combinación de un flujo de neutrones térmicos que alcance al tumor y átomos de ^{10}B que se concentren en el mismo.

Teniendo en cuenta las actuales características del haz de irradiación de la facilidad de tratamiento del reactor RA-6, sobre las cuales se basa la presente evaluación, los resultados muestran que el principal órgano en riesgo es la mama contralateral. A su vez, en todos los casos clínicos analizados y bajo los diferentes esquemas definidos, quedó evidenciado que se requieren condiciones de distribuciones de ^{10}B más exigentes que las signadas por la experiencia clínica en el empleo del compuesto borado BPA-f. Estas condiciones son mayormente exigentes en el caso del tratamiento de las recaídas posmectomía dadas por la ubicación superficial de la lesión a tratar. La inadecuada distribución del flujo neutrónico térmico en combinación con las concentraciones de ^{10}B evaluadas, hace que el tiempo de irradiación se incremente, con el consecuente aumento de la exposición de los órganos sanos alcanzando valores de dosis cercanos o superiores a los límites establecidos. En cuanto a la evaluación de la propuesta del tratamiento de los casos identificados como BCT, ya sea tumor primario o recaída de la enfermedad

en la mama ipsilateral, los resultados sugieren que estos imponen condiciones de distribución de ^{10}B más favorables en términos de las exigencias impuestas por el caso antes mencionado. Si bien los esquemas evaluados en base a la experiencia clínica con BPA-f no logran establecer condiciones seguras de irradiación, contemplando los órganos sanos, el escenario evaluado a partir de los resultados presentados en trabajos con liposomas transportadores de compuestos borados, permite vislumbrar condiciones factibles de alcanzar. En especial, en el cuadro 3.4 se muestra, en forma de resumen, los resultados obtenidos proponiendo una irradiación con incidencia oblicua del haz, para los distintos casos propuestos y contemplando los esquemas B y D, definidos en el cuadro 3.3. En cuanto a los esquemas analizados de 60 ppm, para los casos BCT, el volumen involucrado de la mama contralateral que recibe una dosis mayor a la dosis de tolerancia es menor a 3 cm^3 (en particular 1.8 cm^3 para el caso BCT300 y 2.8 cm^3 para el caso BCT600). La relación ($D_T : D_{\text{riesgo}}$) muestra que existe un importante gradiente de dosis, siendo la dosis mínima entregada en tumor entre 4 y 4.7 veces mayor a la dosis máxima alcanzada en la mama contralateral, y considerando la dosis máxima en tumor, esta relación varía entre 4.7 a 5.6. Estos valores son comparables a los publicados por Kennedy y col. para alcanzar un alto gradiente de dosis en una única fracción con haces externos y presentados bajo el concepto SFHGPI (acrónimo de Single-Fraction High-Gradient Partial Breast Irradiation) [211]. En el citado trabajo, la mediana de los tiempos de tratamiento fue de 25 min (con un rango entre 16 a 52 min), mientras que los tiempos de irradiación involucrados en el presente análisis se encuentran por debajo de los 30 min, tal como se muestra en el cuadro 3.4. Es importante remarcar que estos resultados se alcanzan sin el requerimiento de cambios en el haz de irradiación. Tal como fuera mencionado oportunamente, el empleo de nanovehículos transportadores permite explotar estrategias de direccionamiento que mejoren el desempeño de los mismos en la entrega de los átomos de ^{10}B , con el claro objetivo del aumento de la concentración en tumor y el incremento de la concentración diferencial con los órganos sanos.

Por otra parte, si bien no es trivial su implementación, pueden proponerse diferentes estrategias que mejoren las condiciones relacionadas a los aspectos del haz de irradiación o el posicionamiento de las pacientes. Teniendo en cuenta otras opciones que permitan disminuir la dosis alcanzada en los órganos sanos, una propuesta factible se vincula al diseño de un cono de tratamiento de menor diámetro. Esto reduciría el campo de radiación, dejando a la mama contralateral menos expuesta, y lo mismo para los demás órganos. La reducción del diámetro del cono está asociada a una disminución del flujo neutrónico, con lo cual se debe hacer una cuidadosa evaluación para establecer una condición de costo-beneficio en los tejidos frente a estos escenarios. En el caso particular del tratamiento posmastectomía, con el objetivo de lograr una mejor distribución del flujo de neutrones térmicos en el tumor, es posible emplear dispositivos denominados bolus, comúnmente empleados en la radioterapia (pero en este caso con características neutrónicas apropiadas). En este contexto, dicho dispositivo tiene como función proveer del medio requerido para la termalización de las componentes neutrónicas de mayores energías, es decir, cumpliría la función de la mama ipsilateral comentada en los casos BCT. Justamente teniendo en cuenta estos últimos casos, con el objetivo de disminuir la dosis entregada a los órganos sanos, una estrategia factible está vinculada al posicionamiento de la paciente durante la irradiación. Debido a que actualmente en dicha facilidad de tratamiento se cuenta con un puerto de irradiación cónico fijo, en este análisis se evaluó el posicionamiento frontal y oblicuo al haz de irradiación, lo cual como se reflejó en la discusión de los resultados, es una condición exigente en términos de la distribución de dosis y exposición de los órganos sanos al haz de irradiación. Es posible estudiar la propuesta de irradiación en posicionamiento decúbito prono (o boca abajo) de forma que la mama caiga por peso propio y quede

Parámetro	BCT300		BCT600		MAST300	
	Esquema B	Esquema D	Esquema B	Esquema D	Esquema B	Esquema D
$C_{10B} T$ [ppm] ^a				60		
$C_{10B} S$ [ppm] ^b				10		
$(C_{10B} T : C_{10B} S)$				6		
tiempo irrad. [min]	19.5	27.3	19.8	27.6	28.4	39.7
D_T [Gy – Eq] ^c	15	21	15	21	15	21
D_{riesgo} [Gy – Eq] ^d	3.7	5.2	3.2	4.5	5.7	7.9
$(D_T : D_{riesgo})$	4.0	4.0	4.7	4.7	2.6	2.6
$(D_{riesgo} : D_{tol.}^e)$	1.7	1.7	1.4	1.4	2.5	2.5
$V \% > D_{tol.}$	0.65	0.64	0.53	0.52	8.99	8.94

^a $C_{10B} T$ representa la concentración en tumor.

^b $C_{10B} S$ representa la concentración en órganos sanos.

^c Dosis mínima prescrita en tumor.

^d Hace referencia al valor de dosis entregada en la mama contralateral, definida como el órgano sano en riesgo en todos los casos analizados.

^e Dosis de tolerancia en mama contralateral, definida en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.4: Resumen de resultados obtenidos en el análisis realizado para los esquema B y D y para los diferentes casos clínicos estudiados con incidencia oblicua del haz de irradiación.

alejada de los órganos sanos, tal como lo han propuesto algunos estudios [213, 225]. Para ello, se requiere de una camilla de tratamiento de características específicas y cuya estructura debe considerarse por su contribución a la dispersión de neutrones y fotones que pueden alcanzar a la misma y que debe ser tenido en cuenta a la hora de evaluar dicha propuesta.

Finalmente, es relevante destacar que la evaluación del presente estudio de dosimetría tuvo como objetivo ulterior generar y poner a disposición la información necesaria, que claramente puede ser ampliada en un futuro, de manera que contribuya a la discusión multi e interdisciplinaria para la elaboración de una propuesta concreta de estudio para aquellas pacientes donde las características de BNCT resulten en una ventaja terapéutica.

4 | Diseño y desarrollo de nanomedicinas conteniendo compuestos borados

Introducción

Tal como se definió en el capítulo 2, actualmente el abordaje del tratamiento del cáncer de mama se realiza de manera multimodal en el cual convergen la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y la terapia dirigida. De acuerdo al tratamiento particular, las últimas tres se pueden combinar en la neoadyuvancia o en la adyuvancia al tratamiento primario que es la cirugía. La terapia contra el cáncer de mama basada en la cirugía, así como la radioterapia, es adecuada, por ejemplo, para el tratamiento de tumores sólidos en lugares accesibles, mientras que la quimioterapia es mayormente prescrita para la enfermedad difusa. Sin embargo, existen casos de pacientes en los que estas modalidades no pueden ser aplicadas ya sea por la ubicación del tumor, la presencia de células diseminadas o por la resistencia desarrollada a la droga terapéutica. La terapia dirigida ha mostrado ser de gran utilidad cuando las demás modalidades no son suficientes para el control de la enfermedad. En el presente capítulo, se expone el trabajo realizado referente al desarrollo y caracterización de nanomedicinas basadas en liposomas como nanovehículos transportadores de compuestos borados, su obtención a través de distintas metodologías, su caracterización físicoquímica y su incorporación celular en ensayos *in vitro* en un modelo de cáncer de mama HER2+.

4.1. La nanomedicina como estrategia para la entrega de fármacos

4.1.1. Definiciones y conceptos generales

La nanomedicina define la convergencia de la nanotecnología y de la medicina haciendo referencia a la aplicación médica de nanomateriales para el diagnóstico y tratamiento de sistemas biológicos. Las distintas disciplinas que confluyen en el campo de los nanomateriales permiten el diseño y el desarrollo de nanopartículas de distintas formas, tamaños y diferentes características físicoquímicas, de manera que se puedan lograr propiedades que permitan sortear las barreras biológicas y llegar a la zona de interés. Una nanomedicina es un sistema compuesto por un fármaco o droga conjugado o contenido en un nanomaterial que posee al menos una dimensión en la escala nanométrica, particularmente en el rango de 1 a 100 nm [228-230]. Su tamaño y la gran relación (superficie:volumen) le confieren propiedades diferentes respecto a las mismas partículas con mayor tamaño. Estas propiedades físicoquímicas pueden

modificar su interacción con los distintos procesos biológicos involucrados en la administración de nanomedicinas, las cuales hacen que éstas encuentren diversas aplicaciones en el campo de la biomedicina [231].

Las nanopartículas o nanomateriales que conforman una nanomedicina pueden tener distinta naturaleza y, de acuerdo a su origen, se los puede clasificar como orgánicas e inorgánicas. Las *nanopartículas orgánicas* son aquellas que basan su estructura y composición en elementos ricos en carbono, oxígeno, hidrógeno o nitrógeno, como lípidos (por ejemplo *liposomas*, *nanopartículas sólidas lipídicas*) o polímeros (por ejemplo *miscelas poliméricas*, *dendrimeros*) o una combinación de ambos, como las *nanopartículas híbridas lípido-polímero*. Por su parte, las *nanopartículas inorgánicas* están constituidas por distintos elementos, y generalmente prescinden de los mencionados anteriormente, como ejemplo las nanopartículas de sílica, de óxido de hierro y de oro, entre otras.

El empleo de nanomateriales o nanopartículas en el diseño de nanomedicinas ha despertado gran interés en la aplicación médica. En los últimos 20 años, se han realizado importantes desarrollos en la estrategia de entrega de nanomedicinas, ya sea para el transporte de agentes terapéuticos o de diagnóstico abarcando desde fármacos simples hasta moléculas complejas, como por ejemplo ácido desoxirribonucleico (ADN). Una característica de gran importancia de estos desarrollos, es la capacidad de modificar la superficie de las nanopartículas a través de la unión de ligandos seleccionados, los cuales permiten un direccionamiento selectivo a tejidos que tienen una expresión aumentada de receptores que reconocen específicamente los ligandos mencionados [229].

La aplicación clínica de una gran parte de los agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer se encuentra limitada ya sea por su dificultad para entregar altas concentraciones en el tumor, los graves efectos secundarios que pueden provocar en los tejidos sanos, que en un paciente oncológico pueden ser aún más graves debido al deterioro general del organismo que produce esta patología [232]. Entre las diferentes estrategias propuestas para superar estas limitaciones se encuentra la entrega selectiva de compuestos a las áreas afectadas empleando vehículos transportadores denominados *nanovehículos*. El uso de nanovehículos para el transporte de fármacos permite disminuir los efectos mencionados anteriormente, además de mejorar la solubilidad y vida media de los fármacos en circulación, es decir aumentan la biodisponibilidad de las drogas y, en consecuencia, permiten mayor acumulación en tumor. Otras de las ventajas que genera el transporte de las drogas en nanovehículos asociada a la reducción de toxicidad de la administración de las drogas libres es la posibilidad de combinar múltiples drogas con el objetivo de mejorar la eficacia terapéutica [233]. Finalmente, la administración de fármacos en nanovehículos permite la posibilidad de *decorar* su superficie con moléculas que posibilitan el reconocimiento selectivo de blancos terapéuticos. Estas características conllevan potenciales ventajas adicionales, como la simplificación de los protocolos de administración y, gracias a la reducción de efectos secundarios, permiten mejorar la calidad de vida de los pacientes. Debido a la versatilidad en las propiedades y características de los nanovehículos, se pueden definir estrategias de diseño que permitan atravesar las diferentes barreras biológicas y realizar la entrega dirigida y específica de agentes terapéuticos a un tejido u órgano de interés. De esta forma, los nanovehículos poseen el potencial de aumentar la selectividad de tratamientos terapéuticos, mejorando su eficacia antitumoral y reduciendo, además, el daño a los tejidos sanos [229, 233].

4.1.2. Vías de administración y barreras biológicas

Las vías de administración de las nanomedicinas varían de acuerdo al sitio donde se requiere la acumulación del agente terapéutico o diagnóstico transportado. Entre las principales vías de administración se pueden mencionar la *vía tópica* (a través de la piel y las mucosas), la *vía aérea* (típicamente la inhalación), la *vía enteral* (que comprende la vía oral, sublingual y gastroentérica) y la *vía parenteral* (que puede ser subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa). Esta última se caracteriza por la introducción de los fármacos a través de la ruptura de la barrera utilizando una aguja hueca, siendo la vía intravenosa la más rápida y efectiva para la entrega sistémica de drogas. También es adecuada para aquellos agentes terapéuticos que no pueden ser absorbidos por el tracto gastrointestinal o que no pueden ser inyectados en los músculos u otros tejidos. La principal ventaja de la administración intravenosa de fármacos es el rápido inicio de acción y la completa biodisponibilidad de los fármacos, incluso con dosis bajas. Existen también riesgos asociados con esta vía de administración ocasionados por la exposición directa de la droga al sistema circulatorio. Por otra parte, la administración por esta vía puede ser dolorosa para el paciente y requiere la asistencia de personal de salud especializado [232-234].

Una vez administradas, las nanomedicinas tienen el gran desafío de alcanzar el sitio de tratamiento de interés sin ser eliminadas por las diferentes barreras biológicas que existen en nuestro organismo. Cabe destacar que el conocimiento profundo de las mismas es de vital importancia en el diseño de la nanomedicina¹.

Los principales órganos y tejidos involucrados como barreras biológicas son la sangre, principalmente las células asociadas al sistema inmune, los pulmones, los riñones, el hígado y el bazo [232, 235]. En términos generales, existen dos sistemas de depuración: la filtración glomerular en los riñones, especialmente importante para las moléculas con un tamaño inferior a 40 kDa y el Sistema Fagocítico Mononuclear (MPS, por sus siglas en inglés), principalmente el hígado y el bazo. El sistema MPS comprende a los monocitos y los macrófagos, y cumple diferentes funciones entre las cuales se pueden mencionar: la eliminación de micro-organismos y células apoptóticas mediante fagocitosis, la secreción de enzimas, el procesamiento de antígenos y la destrucción de células tumorales [236]. Los monocitos son los principales fagocitos mononucleares de la sangre mientras que los macrófagos se encuentran mayoritariamente en el hígado (células de Kupffer), además de los pulmones (macrófagos alveolares), el bazo (macrófago de pulpa roja) y los nódulos linfáticos. La unión de proteínas de la sangre, tales como albúmina, anticuerpos, sistema de complemento (denominadas *opsoninas*), a la superficie del patógeno o agentes extraños al organismo que ingresan a la circulación sanguínea (en nuestro caso, las nanomedicinas), permite el reconocimiento por el MPS. Las opsoninas entonces *marcan* al patógeno o cuerpo extraño, como las nanomedicinas, proceso conocido como *opsonización*, facilitando la acción de los macrófagos, promoviendo, de esta forma, la respuesta inmunológica para su eliminación [232, 233, 236].

Existen diferentes estrategias para prolongar la circulación de las nanomedicinas en la sangre. Entre ellas se encuentra el empleo de *polietilenglicol* (PEG, por sus siglas en inglés) en la superficie del nanovehículo para evitar su reconocimiento por el MPS. El PEG es un polímero ampliamente aceptado por organismos regulatorios en la industria farmacéutica que puede utilizarse para invisibilizar a las nanomedicinas. Este polímero provee de la formación de una barrera física que dificulta la unión de las opsoninas y, en consecuencia, dificulta la acción de los macrófagos, prolongando de esta forma el tiempo

¹Existe una serie de mecanismos muy complejos involucrados en esta función y que no son objeto de estudio en esta tesis por lo que sólo se los menciona para dar una mínima comprensión de los procesos involucrados para que los nanovehículos alcancen la zona de tratamiento. Se puede encontrar una detallada descripción en [232, 235-237].

de circulación en sangre. El efecto protector del *pegilado* se incrementa con el largo del polímero y con el número de moléculas de PEG unidas. Sin embargo, la densidad óptima de moléculas de PEG unidas a la nanomedicina se encuentra en un punto de equilibrio entre una configuración de alta densidad (*configuración en cepillo*) y de baja densidad (*configuración mushroom*) [232, 238, 239].

En el recorrido de la nanomedicina hacia el sitio tumoral, ésta se enfrenta a la siguiente barrera biológica, que comprende la extravasación al tejido tumoral. En este proceso, la nanomedicina debe atravesar la monocapa de células endoteliales que conforman los capilares, y delimitan el lumen del capilar por donde circula la sangre. Entre las células endoteliales existen uniones, como la unión o juntura estrecha y la unión adherente, que proveen la estructura mecánica y crean una barrera con una permeabilidad selectiva a diferentes moléculas, cumpliendo un rol esencial en el mantenimiento de la homeostasis. La permeabilidad a las distintas moléculas en condiciones fisiológicas normales varía de acuerdo a los diferentes tejidos. En un extremo, se encuentra por ejemplo la barrera hematoencefálica, que presenta una monocapa con uniones estrechas que previenen de manera muy eficiente la entrada de agentes terapéuticos al cerebro. En el otro extremo se encuentra el endotelio del parénquima hepático, que se presenta fenestrado con aperturas del orden de los micrones [232-234]. Distintas condiciones patológicas alteran las uniones o junturas en el endotelio facilitando la extravasación.

A diferencia del revestimiento endotelial de la vasculatura normal, la vasculatura tumoral presenta una morfología irregular. La masa tumoral se compone de células cancerosas proliferantes y células del estroma suministrado por una matriz extracelular densa y una red vascular con crecimiento aberrante y de tipo tortuoso. La demanda metabólica de las células cancerosas de rápida división junto al aumento de los factores angiogénicos, resultan en la formación de vasos con una arquitectura defectuosa y que poseen una permeabilidad diferente a los tejidos sanos. Justamente, a partir de esta característica de la arquitectura del endotelio capilar de los tumores se define el *efecto de aumento de la permeabilidad y la retención*, denominado *efecto EPR*, acrónimo de Enhanced Permeability and Retention, y que fue reportado por primera vez por Matsumura y Maeda en 1986 [240]. Estas investigaciones mostraron que la permeabilidad vascular aumentada en los tumores, que asegura la provisión de nutrientes y oxígeno para afrontar los requerimientos del rápido crecimiento, también permite y facilita el transporte de macromoléculas al tejido tumoral, por el contrario este efecto no se observa en la vasculatura normal. El efecto EPR es un fenómeno que principalmente depende del peso molecular: las moléculas o partículas mayores a 40 kDa, el umbral de depuración renal, muestran una circulación prolongada. Estas moléculas pueden entrar al tumor en forma gradual y selectiva, pudiendo permanecer en el mismo durante períodos relativamente largos (incluso días) [241]. En un trabajo se ha estudiado la dependencia de la permeabilidad microvascular con el tamaño de las nanopartículas. En resumen, a partir de una serie de experimentos en tumores animales, se encontró que el tamaño máximo de las nanopartículas que pueden escapar del lumen de los vasos tumorales varía entre 400 y 600 nm. En comparación con otros sitios, se ha determinado que los sinusoides del hígado sano son permeables a nanopartículas de hasta 100 nm; este tamaño es casi el mismo que el tamaño promedio de los poros del sinusoide revelado por microscopía electrónica. El tamaño de corte de los vasos tumorales también fue confirmado mediante el uso de nanopartículas esféricas de látex decoradas con fosfolípidos. Estas esferas son más rígidas y no se deforman cuando atraviesan las paredes del vaso [242].

Aquellas nanopartículas que lograron atravesar la barrera endotelial se enfrentan a otra barrera sumamente compleja y heterogénea y que juega un rol fundamental en las limitaciones que existen en la entrega de nanomedicinas: el *microambiente tumoral*. Éste se compone de vasos sanguíneos, vascula-

tura linfática, células inmunitarias, fibroblastos, células residentes e infiltrantes, factores de señalización y proteínas que componen la matriz extracelular. El microambiente tumoral se caracteriza por poseer, además, ciertas características distintivas tales como bajo pH, baja oxigenación y una alta presión intersticial. Estas anomalías estructurales y funcionales dificultan la administración de terapias dirigidas y nanoterapéuticas administradas sistémicamente y disminuyen la eficacia de los agentes quimioterapéuticos, la radioterapia y las inmunoterapias [243, 244].

Una vez que las nanomedicinas extravasaron al microambiente tumoral, y luego de un extenso y complejo recorrido, se enfrentan con la última barrera biológica, la membrana celular, antes de lograr su internalización en las células tumorales. La internalización ocurre por medio de un proceso denominado *endocitosis*. Sin profundizar sobre este complejo proceso¹¹, sólo se menciona que la endocitosis se divide en dos tipos: la *fagocitosis* y la *pinocitosis*. La fagocitosis es el mecanismo preferencial para la endocitosis de partículas de tamaño mayor a 500 nm, mientras que la endocitosis de partículas de menor tamaño y/o agua, está dominada por la pinocitosis. A su vez, la pinocitosis se puede clasificar en: *endocitosis mediada por clatrina* (también llamada endocitosis mediada por receptor), *endocitosis mediada por calveolina* y *macropinocitosis*, entre otras. Luego de la internalización, las nanopartículas generalmente entran en la vía endosoma-lisosomal, donde liberan progresivamente su carga terapéutica [233, 247].

4.1.3. Direccionamiento o *targeting* pasivo y activo de las nanomedicinas

Una característica importante y de especial interés de la nanomedicina es la aplicación del concepto de *direccionamiento*, o *targeting*, en su denominación en inglés. Existen dos formas en las que puede ocurrir este direccionamiento o *targeting* selectivo: *pasivo* o *activo*. El efecto EPR es la base racional sobre la cual opera el direccionamiento pasivo. Precisamente, se aprovechan las condiciones especiales de permeabilidad y retención que presentan los vasos tumorales, asociadas a su malformación y a su drenaje linfático deficiente que generalmente tienen los tumores. Estas características únicas permiten el transporte y acumulación de macromoléculas al tejido tumoral en forma pasiva. Por otra parte, el direccionamiento o *targeting* activo se basa en el "decorado" de la superficie de la nanopartícula con moléculas o ligandos específicos. Esta estrategia hace uso del reconocimiento molecular específico a través de la unión del ligando a receptores, generalmente con expresión aumentada en tumores y, en consecuencia, generando una acumulación diferencial de los fármacos transportados en el entorno tumoral. La estrategia de direccionamiento activo también puede ser llevada a cabo a través del uso de nanomateriales que responden a estímulos físicos externos. En este caso, por ejemplo, es posible utilizar nanopartículas magnéticas que responden a campos magnéticos, lípidos o polímeros que responden a cambios de temperatura, entre otros estímulos. Los ligandos empleados para el *targeting* activo pueden incluir moléculas tales como transferrinas, péptidos, oligonucleótidos, anticuerpos, entre otros [232, 234]. Estos últimos constituyen la estrategia más ampliamente utilizada, haciendo uso de la expresión aumentada, o sobreexpresión, de ciertos receptores de membrana de las células tumorales que reconocen específicamente a estas moléculas (ver 2.5.2).

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas (Ig), son proteínas esenciales en el desarrollo de las funciones del sistema inmunitario. Al momento se han identificado cinco grandes clases denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada una con características estructurales específicas. En particular, el grupo IgG representa una clase dominante de inmunoglobulinas humanas, a su vez se subdividen en IgG1, IgG2,

¹¹Para una mejor comprensión sobre este complejo proceso biológico se recomienda consultar [245, 246].

IgG3 e IgG4, las cuales si bien poseen diferencias en regiones específicas, comparten una estructura general en común. Los anticuerpos IgG contienen cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas livianas (C_L) de 25 kDa, y dos cadenas pesadas (C_H) de 50 kDa. Estas cadenas poseen múltiples dominios y, en especial, el dominio variable (V) conforma la región terminal de unión al antígeno. Más allá de las regiones terminales, la estructura del anticuerpo presenta menor variabilidad, conformando las regiones constantes (C), tanto de las cadenas livianas como pesadas (C_L y C_H) [248]. Las cadenas C_H y C_L se mantienen unidas por medio de uniones disulfuro, conformando la estructura característica con forma de Y. Tal como se muestra en la figura 4.1, la estructura completa puede dividirse en términos de dos segmentos bien diferenciados: el segmento de la región de unión al antígeno, denominado F_{ab} , y segmento o región constante, F_C . A su vez, el segmento F_{ab} se subdivide en una región variable ($V_{H,L}$) y otra región constante ($C_{H,L}$) [249].

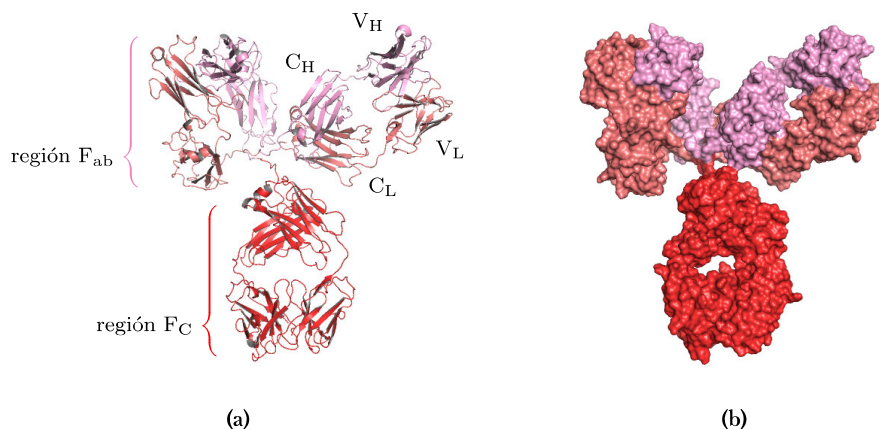


Figura 4.1: Estructura cristalográfica de una inmunoglobulina IgG1. Las imágenes fueron generadas empleando el código computacional PyMOL [250] empleando la información brindada por el Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) [251] a partir del identificador 1IGY [252].

De especial interés en la aplicación médica, las regiones de unión al antígeno F_{ab} pueden aislarse del resto de la estructura del anticuerpo, sin perder su funcionalidad. A partir de la aplicación de técnicas específicas, es posible separar y aislar esta región y generar nuevos fragmentos como $F_{(ab')_2}$, $F_{ab'}$ y F_{ab} . Estos fragmentos mantienen las capacidades de reconocimiento del antígeno, lo cual permite su aplicación en el direccionamiento activo otorgando la ventaja de diseñar vectores de menor tamaño y sin perder la especificidad del reconocimiento respecto al empleo del anticuerpo completo. Los primeros desarrollos en este campo se enfocaron en el empleo de anticuerpos completos como ligandos, obteniendo resultados poco alentadores principalmente vinculados a la baja estabilidad, rápida eliminación, alta inmunogenicidad y, en consecuencia, una eficacia menor a la esperada [253-256]. Los avances tecnológicos permitieron el desarrollo y aplicación de técnicas para la obtención de fragmentos funcionales de anticuerpos, como los mencionados anteriormente. A partir de su utilización en diferentes estudios, mostraron un mejor desempeño respecto al uso del anticuerpo completo, permitiendo importantes y destacados avances en este campo [257-259].

4.1.4. Desafíos y oportunidades en el campo de las nanomedicinas

La nanotecnología ha hecho importantes contribuciones a la oncología. Los liposomas fueron el primer tipo de nanomedicinas terapéuticas en recibir aprobación para su uso clínico en el tratamiento del cáncer, particularmente conteniendo la droga doxorubicina (nombre comercial Doxil [260]). La segunda clase de nanomedicinas, de gran éxito en los pacientes oncológicos, llegó de la mano de una nanopartícula de albúmina unida a paclitaxel (nombre comercial Abraxane [261]), permitiendo la formulación de fármacos hidrofóbicos que mitigan la necesidad de emplear excipientes tóxicos. El resultado fue un fármaco mejor tolerado que se puede administrar en dosis más altas y en forma más rápida [233]. A pesar del surgimiento de la nanomedicina y de los grandes avances realizados en los últimos años con el desarrollo de una cantidad considerable de nanomedicinas comerciales y otras tantas en fase clínica, los resultados de diversos estudios muestran que si bien las nanomedicinas permiten disminuir la toxicidad de los fármacos, la sobrevida general de los pacientes tratados con esta modalidad no supera a aquella alcanzada con la administración convencional de fármacos. Sin embargo, la disminución de los efectos secundarios mejora la calidad de vida de los pacientes [231, 233, 262-264].

El desarrollo de un tumor se encuentra fuertemente influenciado por las interacciones de sus células con su entorno que, en última instancia, determinan la progresión del tumor [237, 243, 264]. Es justamente este entorno, o microambiente, el que influye en la respuesta terapéutica y la resistencia tumoral a los tratamientos. El microambiente tumoral limita la distribución uniforme de las nanomedicinas administradas en forma sistémica o local, comprometiendo de esta manera su eficacia contra el cáncer [243, 263-265]. Por otra parte, los tumores presentan un alto nivel de heterogeneidad, no sólo en términos de tamaño y ubicación, sino también en el grado de desarrollo de la vasculatura, en el grado de desarrollo linfático, la densidad del estroma tumoral y la presión intersticial. Si bien el efecto EPR ha sido citado como el principal mecanismo por el cual los tumores sólidos pueden acumular y retener macromoléculas, dada la heterogeneidad en las diferentes características mencionadas, este efecto no se presenta de la misma forma en todos los tipos de tumores, sin mencionar la gran variabilidad entre pacientes [263, 264]. En un tumor sólido la zona central suele presentar baja densidad de vasculatura y, en consecuencia, además de recibir menores aportes de nutrientes y oxígeno, la acumulación de fármacos es ineficiente. La eficacia del tratamiento depende en gran medida de la estructura y función microvascular y de las propiedades de transporte de fármacos en tejido [241, 266].

El entendimiento de la biología tumoral es de gran importancia en la nanomedicina debido a que, como se mencionó anteriormente, es conocido y demostrado que el microambiente tumoral minimiza la eficacia de las nanomedicinas. Por esta razón, la modulación del microambiente tumoral y la estratificación del paciente se han propuesto recientemente como estrategias para mejorar el rendimiento de las nanomedicinas [233, 263, 264, 267]. A partir de estas evidencias, varios grupos han propuesto que los nanovehículos deben incorporar no sólo fármacos para el tratamiento del cáncer, sino que además, se debe contemplar la incorporación de compuestos que permitan normalizar la fisiología del microambiente tumoral para optimizar las terapias a través de la mejora de perfusión y reducción de los niveles de hipoxia [265, 267, 268].

Finalmente cabe mencionar, que se han identificado una serie de puntos críticos para mejorar la efectividad de las nanomedicinas para la obtención de terapias superadoras y su traslación a la clínica. Estos aspectos comprenden: (i) la heterogeneidad del cáncer y de los factores que poseen influencia en el comportamiento de las nanomedicinas en el microambiente tumoral; (ii) la transición desde la inves-

tigación basada en la formulación y los modelos *in vivo*; (iii) la implementación de modelos animales y protocolos de testeo de efectividad terapéutica de mayor relevancia; (iv) la preselección de aquellos pacientes que tengan mayor probabilidad de beneficiarse de las terapias con nanomedicinas, es decir la generación de nanomedicina personalizada [264].

4.1.5. Liposomas como nanovehículos para el transporte de fármacos

Dentro de la extensa variedad de diseños de nanovehículos empleados para la entrega de fármacos o drogas, se destacan principalmente: (i) *liposomas*, estructuras basadas en bicapas lipídicas; (ii) *nanoesferas poliméricas*, diseñadas con polímeros naturales o poliésteres biodegradables; (iii) *nanocápsulas poliméricas*, formadas por una membrana de polímeros que rodea a un centro acuoso; (iv) *miscelas poliméricas*, que se forman a partir de polímeros anfifílicos [246].

En particular, los *liposomas* son estructuras esféricas autocontenidas, formadas por una o más bicapas lipídicas, típicamente conformadas por *fosfolípidos* que encierran y contienen un interior acuoso. Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas, esto es que están formadas por una porción (o *cabeza*) polar o hidrofílica y una porción (o *cola*) hidrofóbica. La solubilidad en agua es extremadamente baja, por lo que se autoensamblan en medios acuosos. De esta forma, las porciones hidrofóbicas se posicionan enfrentadas entre sí quedando aisladas de dicha fase, mientras que las porciones hidrofílicas quedan expuestas conformando de esta forma una vesícula cuyo interior encierra a la fase acuosa (ver figura 4.2). Los fosfolípidos más empleados en el desarrollo de liposomas son la *fosfatidilcolina (PC)*, el *fosfatidilglicerol (PG)*, la *fosfatidilserina (PS)* y la *fosfatidiletanolamina (PE)*. Cada uno presenta una combinación diferente de las cadenas de ácidos grasos en la cola hidrofóbica de la molécula. Una característica relevante de los fosfolípidos es que son compatibles con las membranas biológicas, lo que los hace principalmente atractivos en el campo de la medicina.

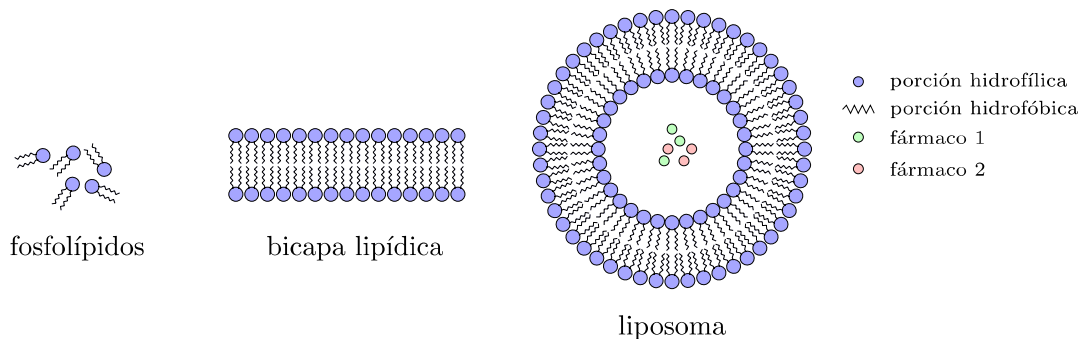


Figura 4.2: Representación esquemática de un liposoma y sus constituyentes.

Dadas sus propiedades y conformación, los liposomas permiten alojar fármacos o compuestos hidrofóbicos en su membrana y, como se dijo anteriormente, alojar compuestos solubles en su interior haciendo uso, de esta forma, de toda la estructura para el transporte o entrega de compuestos. Por otra parte, su estructura versátil permite modular sus propiedades como el tamaño, la carga y, especialmente, la superficie, que puede ser modificada de manera relativamente simple agregando moléculas específicas, de acuerdo a los requerimientos particulares de la aplicación. Dos ejemplos claros relacionados a la modificación de la superficie son el decorado con polímeros, como el PEG para aumentar el tiempo de

circulación en sangre (ver sección 4.1.2), y el decorado con fracciones de anticuerpos para ser dirigidos en forma específica a las zonas de interés que sobreexpresan el antígeno reconocido por el anticuerpo seleccionado (ver sección 4.1.3) [46, 269].

Los liposomas se pueden clasificar de acuerdo al número de bicapas lipídicas que los conforman, teniendo de esta forma liposomas *unilamelares* o *multilamelares*. Los liposomas unilamelares poseen una sola bicapa y pueden tener un tamaño que generalmente se encuentra en el rango de $\sim 50\text{ nm} - 1\text{ }\mu\text{m}$. Los liposomas multilamelares son vesículas gigantes formadas por capas concéntricas que pueden contener incluso vesículas más pequeñas en su interior y típicamente su tamaño se encuentra por encima de $1\text{ }\mu\text{m}$ [46].

4.1.5.1. Métodos de obtención de liposomas

Existen diversos métodos para la fabricación de liposomas, que van desde procedimientos relativamente simples, como el método de hidratación del film, la sonicación o la inyección de solvente en un medio acuoso, a técnicas más sofisticadas, como el empleo de la tecnología microfluídica [270, 271]. Estos métodos se diferencian principalmente en la forma en que se desarrolla la mezcla e interacción entre las dos fases necesarias para la generación de los liposomas: la *fase orgánica*, donde se encuentran los lípidos y potencialmente las sustancias de naturaleza hidrofóbica, y la *fase acuosa*, que puede contener o no drogas de naturaleza hidrofílica que se desean encapsular. La forma en que estas fases interactúan entre sí, tiene impacto en las características físicoquímicas de los liposomas obtenidos. A continuación, se hará una breve descripción de las técnicas empleadas en esta tesis para la obtención de liposomas: la técnica de hidratación del film y la tecnología microfluídica^{III}.

La *técnica de hidratación del film* es un método relativamente sencillo para la obtención de liposomas y se basa en la formación de una película de lípidos, previamente disueltos en un solvente orgánico que luego se evapora, por una corriente gaseosa o por liofilización, para la obtención del film. Posteriormente, este film se rehidrata con una solución acuosa que puede contener o no la sustancia a encapsular. Con esta técnica se obtienen liposomas multilamelares que luego, de acuerdo a la necesidad de tamaños requerida, pueden ser extrudados con filtros con el tamaño de poro adecuado para alcanzar el tamaño deseado. Los liposomas, finalmente, son separados y seleccionados haciendo uso de alguna técnica de separación, como por ejemplo, el empleo de una columna de exclusión molecular. A pesar que esta tecnología es técnicamente simple de implementar, es extremadamente laboriosa y con reproducibilidad y rendimiento moderados por sus múltiples pasos.

La *tecnología microfluídica* se basa en el control y proceso de fluidos confinados en una escala muy pequeña, empleando canales con dimensiones que pueden variar desde unos pocos a centenas de micrometros. La microfluídica debe considerarse como una disciplina en la que convergen diferentes áreas como la ingeniería, la física, la electrónica, la química y la biología, entre otras. Desde su surgimiento en la década de los 90, esta tecnología, fuertemente impulsada por el desarrollo del área de los dispositivos microelectromecánicos en la década previa, ha realizado grandes aportes en áreas muy diversas como en el campo biomédico, donde ha encontrado un gran despliegue de aplicaciones.

Al ser confinados a la microescala, los fluidos presentan cambios en sus propiedades exhibiendo comportamientos que difieren significativamente a los que percibimos en nuestra experiencia diaria en la macroescala. En particular, en la microescala cambia la importancia relativa de distintos fenómenos

^{III}No siendo el objetivo de esta tesis el desarrollo de estas técnicas, se sugiere la consulta de bibliografía más específica sobre las mismas [270, 272, 273].

físicos: las fuerzas superficiales prevalecen por sobre las fuerzas volumétricas, el proceso de difusión prevalece por sobre los fenómenos convectivos, y las fuerzas electrostáticas y la viscosidad, entre otras. En la macroescala, el transporte de masa en los fluidos está gobernado por fuerzas inerciales y viscosas, que dan origen a numerosas inestabilidades en el sistema, como por ejemplo las turbulencias. Estos efectos inerciales se vuelven insignificantes en la microescala, donde se observan bajo número de Reynolds y, en consecuencia, la transferencia de masa es dominada por la difusión. En particular, debido al régimen laminar dado por el confinamiento de fluidos en la microescala, el proceso de mezclado entre fases acuosas y orgánicas que contienen los diferentes tipos de reactivos necesarios para la obtención, por ejemplo, de los liposomas, es particularmente complejo de realizar. En líneas generales, el proceso químico involucrado en la formación de liposomas se denomina *nanoprecipitación controlada*. Generalmente, esta se produce cuando se ponen en contacto, bajo cierto procedimiento, una solución orgánica, que habitualmente contiene el o los precursores del nanovehículo y el principio activo a encapsular (si éste tiene características hidrofóbicas), y una solución acuosa, que puede o no contener el principio activo a encapsular (si éste tiene características hidrofílicas). La fase orgánica y la fase acuosa son introducidas por distintos puntos de entrada al sistema que conducen los fluidos a través de microcanales a una microcámara o microcanal común. Al encontrarse los fluidos de ambas fases, se producen interfases donde los precursores solubles en el solvente orgánico pierden solubilidad al entrar en contacto con el solvente acuoso y se produce el autoensamblado de los liposomas.

La aplicación de la tecnología microfluídica para la obtención de liposomas reduce sustancialmente el tiempo de síntesis, así como los costos asociados a los procesos. Por otro lado, estos sistemas pueden ser controlados, y en general este es el caso, por medio de un programa computacional que ayuda a darle reproducibilidad al sistema. El tamaño y eficiencia de encapsulación de principios activos en liposomas pueden ser controlados por la modulación de la relación de caudal entre las corrientes de las fases acuosa y orgánica. En líneas generales, el tamaño de los nanovehículos se puede regular, ajustando la relación de tasas de flujos (o en inglés Flow Rate Ratio, FRR) entre ambas fases, y el flujo total (o en inglés Total Flow Rate, TFR). De este modo, los pasos de posprocesamiento, inherentes a los métodos tradicionales, especialmente la reducción de tamaño mediante extrusión, se pueden evitar, generándose un ahorro de reactivos y de tiempo considerable. Otra característica, especialmente atractiva, que posee la microfluídica es la posibilidad de integración de las diferentes partes que intervienen en un proceso particular: la detección de moléculas, su separación, posterior transporte, posible mezclado y caracterización final se puede realizar en un único dispositivo de dimensiones reducidas.

A los dispositivos que realizan el mezclado en la microescala se los denomina *micromezcladores*. Estos dispositivos se pueden clasificar de acuerdo a diversas características, pero quizás la más general y abarcativa incluye la diferenciación entre *micromezcladores pasivos* y *micromezcladores activos*. Los primeros logran el proceso de mezclado manipulando las fases a mezclar sin emplear fuerzas externas, recurriendo al proceso de difusión y a la división y al plegado de sucesivas capas de las fases, mientras que los micromezcladores activos emplean fuerzas externas dadas por campos eléctricos, campos magnéticos, actuadores acústicos, entre otros [274]. En el caso de los micromezcladores pasivos, el mezclado está gobernado por el proceso de difusión, y el diseño del micromezclador se concentra en disminuir el tiempo de difusión de una fase a otra para obtener un proceso de mezclado más eficiente, como en el caso del diseño de *focalizado hidrodinámico* [275]. Si bien este es un diseño ampliamente utilizado, existen diversos diseños que permiten realizar el mezclado y que no se basan en el proceso de difusión. Entre ellos se pueden mencionar los micromezcladores de *adversión caótica* que fuerzan este fenómeno

incluyendo obstáculos en el recorrido del fluido generando corrientes caóticas que permiten alcanzar el mezclado [276, 277]. Otra propuesta para lograr el mezclado es el diseño de microcanales con cambios de dirección abruptos que se combina con el empleo de altos flujos (del orden del ml min^{-1}) de las fases a mezclar [278]. Este último es el diseño que se emplea en esta tesis para la obtención de liposomas y se muestra con mayor detalle en la sección 4.2.2.

4.2. Desarrollo de liposomas como nanovehículos transportadores de compuestos borados empleando tecnología microfluídica

Dadas las características de los liposomas para el encapsulamiento de fármacos, como su capacidad de alojar compuestos anfifílicos en membrana y compuestos hidrofílicos en el interior acuoso, y la versatilidad de modulación de su superficie para aumentar o mejorar la especificidad del direccionamiento o *targeting*, y fundamentalmente que es uno de los nanovehículos más aceptado a nivel regulatorio para el transporte de fármacos, en esta tesis se propuso emplear estos nanovehículos como nanotransportadores de compuestos borados. A partir de los trabajos previos realizados por Bohl Kullberg [279] y Mundy y col. [37], en el desarrollo de esta tesis además se propuso como objetivo producir liposomas modificando su superficie con fracciones funcionales del anticuerpo trastuzumab de forma de explotar las capacidades de direccionamiento del nanovehículo para su aplicación para el tratamiento del cáncer de mama HER2+ y sus recaídas. Si bien, debido a problemas en la disponibilidad de reactivos requeridos para obtener cantidades suficientes de fracciones funcionales del trastuzumab, en el trabajo de esta tesis no ha sido posible lograr el desarrollo final del inmunoliposoma propuesto, se han logrado probar y establecer algunos de los protocolos de trabajo relacionados a la obtención de las fracciones funcionales de los anticuerpos. Estos experimentos, que se describen en el anexo A.3, permiten sentar las bases de trabajo para el futuro desarrollo de inmunoliposomas.

La generación de liposomas para su aplicación en BNCT se logró aplicando dos métodos diferentes: la técnica de hidratación del film y el uso de la tecnología microfluídica. Se realizó una comparación entre ambos métodos de obtención de liposomas estudiando distintos parámetros físicos y químicos de los mismos, además de analizar los tiempos de síntesis que conlleva cada uno de los métodos. Dada su mayor eficiencia en términos de los parámetros analizados se optó por emplear la tecnología microfluídica. Por otra parte, esta tecnología aporta gran versatilidad para realizar cambios de tamaño en los liposomas a partir del simple control del TFR y del FRR entre la fase acuosa y la fase orgánica (ver sección 4.2.2). Cabe agregar que otra característica atractiva que ofrece la tecnología microfluídica es la posibilidad de realizar cambios de diseño del micromezclador: esto permite estudiar en profundidad el problema y optimizar el diseño del método de mezclado de forma de obtener liposomas de características especiales.

4.2.1. Formulación lipídica y compuestos borados empleados

La formulación lipídica empleada en este trabajo consistió en los siguientes lípidos: *1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine* (POPC) y colesterol (CHOL) como lípidos estructurales, el lípido catiónico *dimethyldioctadecylammonium bromide* (DDAB) a fin de otorgar una ligera carga positiva que facilite el encapsulado de los compuestos borados que tienen una ligera carga negativa y *methoxy-(polyethyleneglycol)-2000* (DSPE-PEG 2000), a fin de aumentar su estabilidad en el torrente sanguíneo

evitando su captación por el sistema fagocítico mononuclear, tal como fue descrito en la sección 4.1.2. Todos los lípidos fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids (EEUU). De esta manera la formulación lipídica empleada se definió como (POPC : CHOL : DDAB : DSPE – PEG2000) (55 : 32 : 12 : 1).

Por otra parte, se encapsularon dos compuestos borados: el lactosil-carborano (LCOB)^{IV} y el GB-10 (ver sección 1.1). El LCOB ($C_2B_{10}H_{11}$) es una molécula anfifílica conformada por un disacárido, en este caso la lactosa, y una "caja" de carborano. Este compuesto fue desarrollado y sintetizado para su aplicación en BNCT [280, 281], mostrando una captación diferenciada por las células tumorales con respecto a las células normales en diferentes pruebas *in vitro* [281]. En especial, el carborano posee una alta estabilidad intrínseca y presenta la atractiva característica de contener diez átomos de boro por molécula. La inclusión de un azúcar en el diseño de este compuesto busca explotar la ventaja asociada a la alta demanda metabólica por parte de las células tumorales. Por otra parte, en un trabajo publicado se probó su incorporación en el desarrollo de liposomas catiónicos para su empleo en BNCT obteniendo resultados prometedores [48]. En ese mismo trabajo, por medio de técnicas de dispersión de neutrones (*Small Angle Neutron Scattering*, SANS) y de rayos X (*Small Angle X-ray Scattering*, SAXS), se estudió la estructura de los liposomas desarrollados mostrando que el LCOB, dada su característica anfifílica, se aloja en la membrana del liposoma.

4.2.2. Fabricación y caracterización del chip micromezclador

El chip micromezclador se construyó en material polimetil-metacrilato o PMMA (Clarex, Japón), de 2 mm de espesor, empleando la técnica de micromecanizado con fresa con un controlador numérico computarizado (CNC). Brevemente, el diseño de los canales del micromezclador realizado con el programa de *diseño asistido por computadora* (CAD, por sus siglas en inglés) fue codificado en lenguaje de *fabricación asistida por computadora* (CAM, por sus siglas en inglés). De esta forma, el sistema CNC puede interpretar todos los movimientos necesarios para el mecanizado del material (lo que es comúnmente conocido como tecnología CAD/CAM). Una vez terminado el mecanizado, y de forma de quitar los restos de material productos del desgaste de la fresa, las piezas se sometieron a un proceso de sonicado. Luego, se limpiaron con alcohol isopropílico (Biopack) y se secaron aplicando un alto flujo de aire comprimido filtrado. A continuación, se procedió a realizar el proceso de pegado para el cual se empleó un protocolo de aplicación de radiación UV en las caras a pegar. Luego, se montó el chip en su conformación final y se le aplicó calor de manera uniforme sometido a la presión ejercida por una prensa hidráulica. El proceso de pegado propiamente dicho consta de unos breves minutos luego de lo cual se logró un pegado resistente y perdurable a lo largo de las experiencias. En la figura 4.3 se muestran distintas etapas del proceso de fabricación del chip micromezclador, desde el diseño CAD hasta su acabado final.

Una vez obtenido el chip micromezclador, se realizaron pruebas de hermeticidad para comprobar el pegado haciendo pasar agua destilada por los microcanales a un flujo superior al empleado en las experiencias para la obtención de liposomas. De forma de impulsar las distintas fases en los canales del chip micromezclador se emplearon dos bombas de jeringas de control independiente (modelo 22 multijeringa marca Harvard Apparatus, EEUU). Las jeringas contenedoras de cada una de las fases se conectaron al chip mediante conectores tipo *luer lock* de politetrafluoroetileno (PTFE o Teflon) y adap-

^{IV}Gracias a la colaboración establecida con el grupo de BNCT de la Universidad de Pavia (Pavia, Italia), fue posible extender la colaboración con el Dr. Luigi Panza de la Universidad del Piemonte Orientale (Novara, Italia) quien sintetizó y proveyó el LCOB empleado en el desarrollo de liposomas en esta tesis.

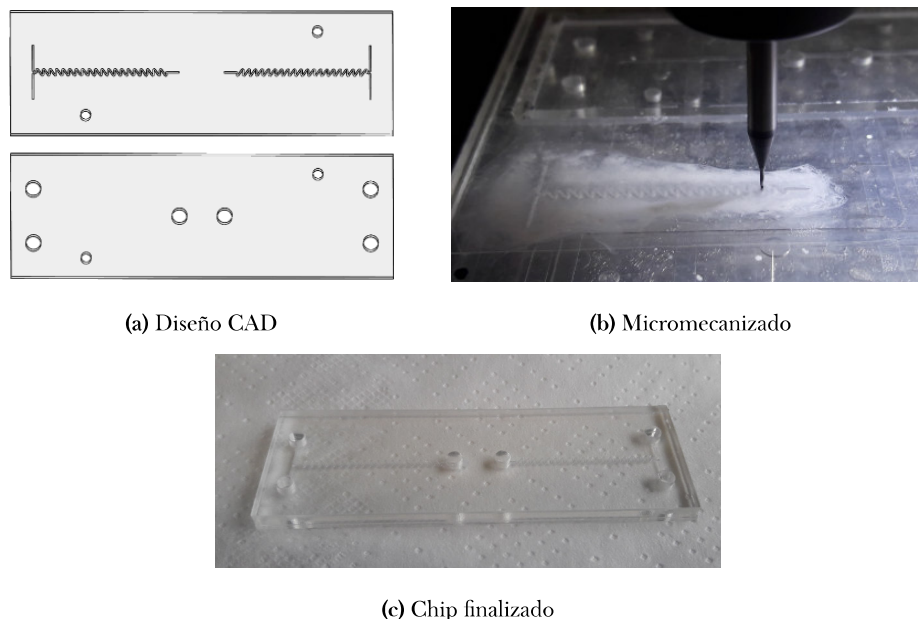
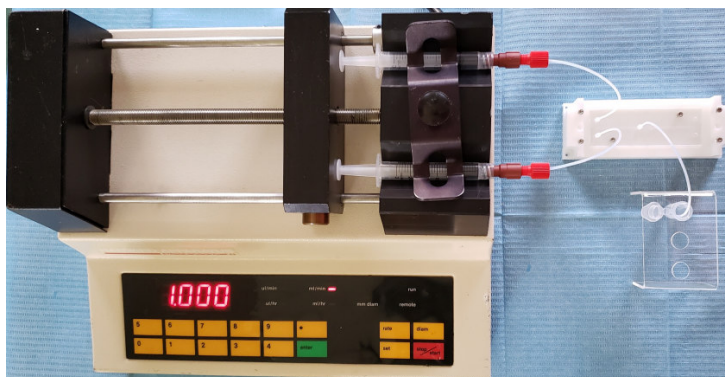


Figura 4.3: Distintas etapas de la fabricación del chip micromezclador: en la imagen (4.3a) se muestra el diseño CAD de las piezas que conforman el chip con dos micromezcladores; en (4.3b) el detalle del micromecanizado con fresa en CNC; y en (4.3c) el chip micromezclador finalizado.

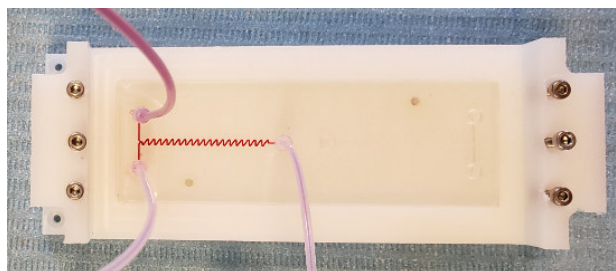
tadores de polioximetileno (Delrin) unidos a mangueras de PTFE insertas en soportes de silicona para evitar pérdidas a la entrada de cada una de las fases al micromezclador. El ensamble completo puede apreciarse en la figura 4.4.

De manera de inspeccionar las capacidades de mezclado del diseño del chip micromezclador, se estudiaron diferentes condiciones de flujo en las que se variaron el flujo total de entrada al chip, definido como TFR (sigla que deriva de su definición en inglés Total Flow Rate), y la relación entre el flujo de entrada de la fase acuosa y el flujo de la fase orgánica, definido como FRR (del inglés Flow Rate Ratio). Se emplearon dos tintas al agua, una roja y otra azul, de manera de observar el efecto de mezclado a lo largo de la serpentina del micromezclador. Se realizaron dos experimentos, el primero variando el TFR entre 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 ml min^{-1} con un FRR fijo de 1:1, y el segundo fijando el TFR a 2 ml min^{-1} y variando el FRR entre 1:1, 1:2, 1:4 y 1:6.

Los experimentos de caracterización de mezclado realizados con tintas, cuyos resultados se muestran en la figura 4.5, permiten observar y analizar el comportamiento del micromezclador en función de la variación de los parámetros mencionados. Se puede observar que a valores de TFR por debajo de 1 ml min^{-1} se tienen dos fases en régimen laminar claramente diferenciadas entre sí y, en consecuencia, no ocurre el proceso de mezclado. A partir de un valor de TFR de 1 ml min^{-1} se comienza a observar el mezclado y ya por encima de este valor el proceso de mezclado queda más notablemente establecido. Incluso se observa que en términos de la distancia recorrida a lo largo de la serpentina el proceso ocurre en los primeros ciclos a medida que se incrementa el TFR. Estas imágenes de mezclado de tintas pueden complementarse con los resultados del análisis del espectro de tamaños de liposomas obtenidos a diferentes TFR y manteniendo el FRR fijo que se muestra en la figura 4.6 en la siguiente sección 4.2.3.



(a) Ensemble completo



(b) Detalle del micromezclador

Figura 4.4: Conexión del chip micromezclador.

4.2.3. Obtención y caracterización de liposomas

La fase orgánica se conformó con los lípidos mencionados anteriormente junto al LCOB (consultar la sección 4.2.1) disueltos en etanol absoluto (Biopack) a una concentración final de 40 mM. En el caso de los liposomas encapsulando el compuesto borado GB-10, además del LCOB, a los que por simplicidad se denominan *liposomas borados*, la fase acuosa se preparó disolviendo GB-10 en buffer HEPES 20 mM a pH 7.4 a la concentración final requerida. Por otra parte, en el caso de la obtención de liposomas *control*, que no encapsulan compuestos borados, y a los cuales se designan como *liposomas vacíos* (ver sección 4.2.4), la fase acuosa consistió en el mismo buffer empleado para los liposomas con GB-10. Cada una de las fases orgánica y acuosa se cargaron en jeringas separadas. Luego, se montaron en las bombas de jeringa y se conectaron a las entradas correspondientes del chip, tal como se explicó en la sección 4.2.2. Una vez obtenidos los liposomas con los parámetros de control de flujo requeridos, se procedió a la diálisis de los mismos con el fin de eliminar los restos de etanol presente en la fase orgánica. Siguiendo las recomendaciones de uso propuestas por el fabricante para el proceso de diálisis, el volumen de muestra requerido se cargó en membranas de celulosa para diálisis de 14 MWCO (Spectra/Por®, Spectrum Chemical Corp., EEUU) y que luego fueron sumergidas en un recipiente con el mismo buffer mencionado anteriormente. Una vez finalizado este proceso, se retiraron las membranas del recipiente y se tomó el volumen dializado, que contiene los liposomas.

Siguiendo la metodología descripta anteriormente, se evaluaron los distintos parámetros microfluidicos de trabajo para la obtención de liposomas encapsulando LCOB y GB-10, como el TFR y el

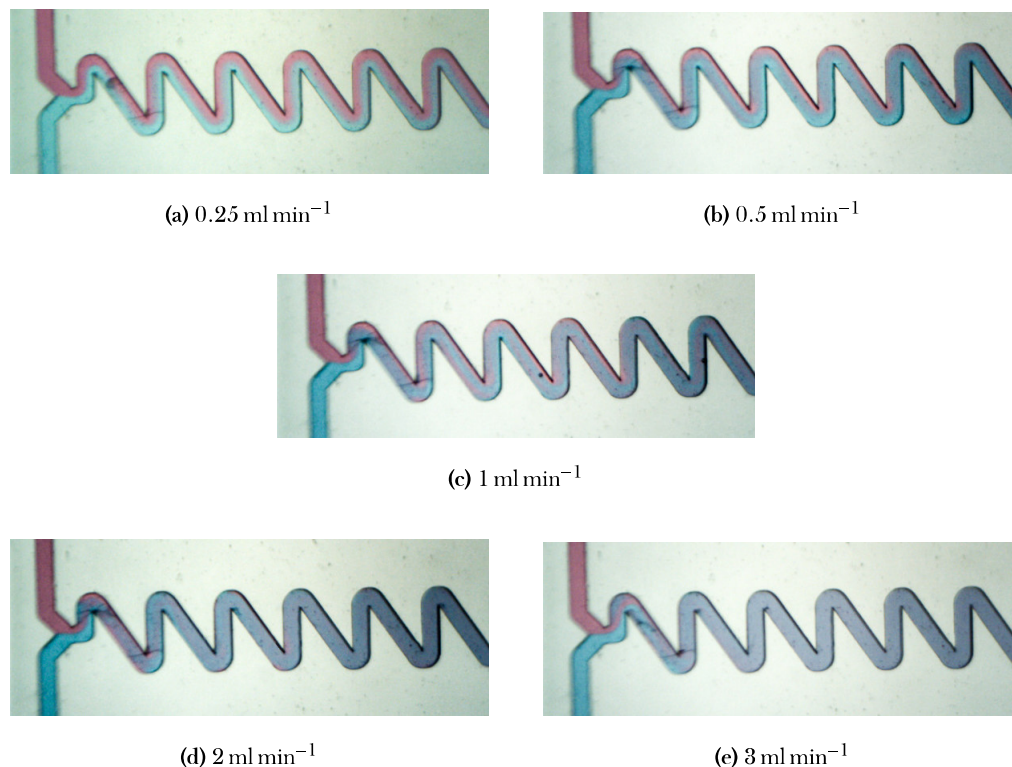


Figura 4.5: Evaluación cualitativa del chip micromezclador mediante el mezclado de tintas a diferentes valores de TFR.

FRR antes definidos (ver sección 4.2.2). A partir de la información obtenida en la experiencia previa de caracterización de mezclado con tintas, se seleccionaron distintos valores de TFR y de FRR. Los liposomas obtenidos en las diferentes condiciones fueron caracterizados mediante parámetros físicos y químicos. Se caracterizó el tamaño del liposoma por medio de la técnica DLS (acrónimo del inglés Dynamic Light Scattering) (equipo Nanosizer S series, Malvern Panalytical, Reino Unido) y, por otra parte, se cuantificó la concentración de boro y fósforo en los liposomas mediante espectrofotometría de emisión atómica ICP-OES (equipo marca Agilent, EEUU). Cabe mencionar que la cuantificación de la concentración de fósforo caracteriza la cantidad de fosfolípidos en los liposomas.

En la figura 4.6 se puede observar que a TFR 1 ml min^{-1} la distribución de tamaños es heterogénea, con la existencia de picos de intensidad anchos a diferentes tamaños y que se asocian a un proceso de mezclado poco eficiente. Por el contrario, a valores de TFR superiores, la distribución de tamaños se concentra en un sólo pico más angosto que el correspondiente al TFR menor. Considerando entonces que el proceso de mezclado es más eficiente para valores de TFR mayores a 1 ml min^{-1} , se determinó trabajar en el desarrollo de liposomas a un TFR de 2 ml min^{-1} .

Una vez determinado el TFR para la obtención de liposomas, se realizaron experimentos fijando el mismo y variando el FRR. Los liposomas obtenidos se caracterizaron en términos de tamaño, índice de polidispersión (PdI) y la concentración de boro y fósforo. Por otra parte, se estudió la concentración de boro alcanzado en los liposomas en función de la concentración de GB-10 de la fase acuosa de entrada al chip, observándose una relación lineal entre ambas. A partir de estos resultados se determinó trabajar con una concentración de GB-10 de 200 mM en la fase acuosa.

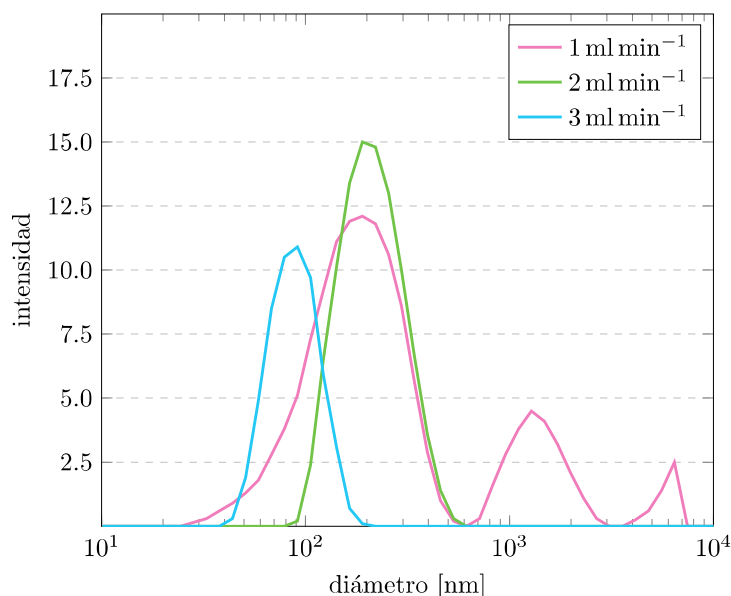


Figura 4.6: Distribución de tamaños de liposomas para distintos valores de TFR y FRR de 1:1.

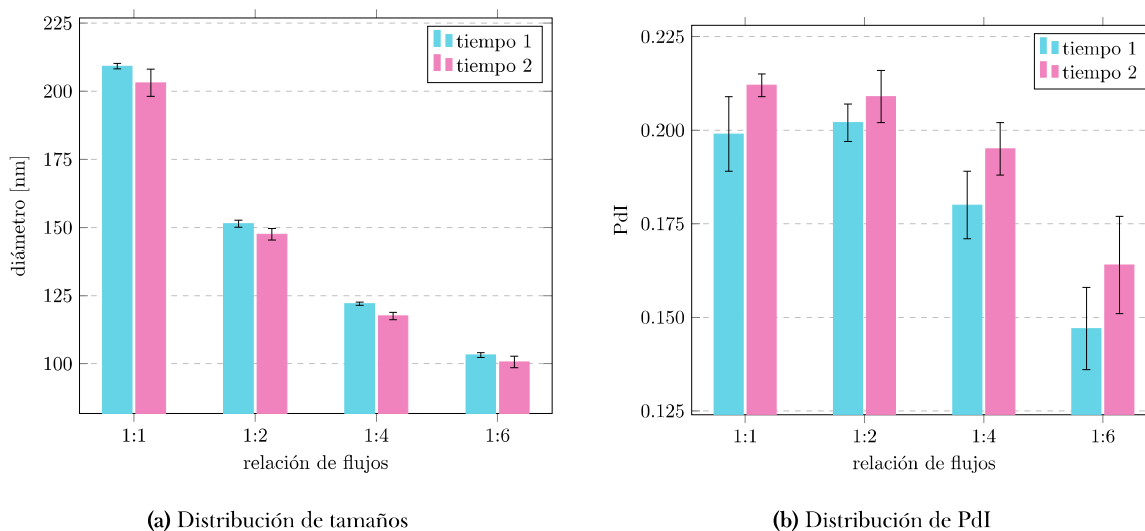


Figura 4.7: Distribución de tamaños y PDI de liposomas obtenidos a TFR 2 ml min⁻¹ para distintos valores de FRR.

En la figura 4.7 se puede observar que el tamaño de los liposomas obtenidos disminuye con el aumento del FRR, alcanzando un tamaño de 210 ± 2 nm para FRR 1:1 y 100 ± 1 nm para FRR 1:6. Esta misma tendencia se observa cuando se analiza el PDI, obteniéndose el valor más pequeño para un FRR de 1:6. Esto muestra que no solo cambia el tamaño con el aumento de la FRR sino que además se logra una distribución de tamaños menos heterogénea. La misma figura muestra, además, el tamaño de los liposomas y su PDI medido 15 días posteriores a su fabricación. Se observa un muy ligero cambio de tamaño, mostrando una disminución menor al 4 % en todos los valores analizados. A su vez, el PDI muestra un ligero aumento evidenciando un leve incremento de la heterogeneidad de la distribución de tamaños. Tanto para el caso del tamaño como del PDI, las barras de error se corresponden al desvío

estándar del promedio de cinco mediciones sucesivas sobre la misma muestra realizadas por el equipo. En este gráfico es clara la facilidad con la que se puede modular el tamaño de los liposomas: para un TFR fijo simplemente se recurre al cambio del FRR entre las fases constituyentes que ingresan al chip.

Por otra parte, se estudió la estabilidad del tamaño de los liposomas desarrollados al estar diluidos en el buffer de preparación o en el medio de cultivo McCoy's 5A. Este último es el medio en el cual se preparan los liposomas para su administración a cultivos celulares (ver sección 4.2.4). En la figura 4.8 se muestran los resultados de esta comparación. Primero se debe destacar la diferencia de tamaño de los liposomas que encapsulan compuestos borados respecto de aquellos constituidos solo por la formulación lipídica. Los primeros alcanzan aproximadamente el doble de tamaño respecto a los vacíos (220 ± 2 nm vs 105 ± 1 nm, respectivamente)^v. En cuanto a la estabilidad en términos del tamaño, se observa que las formulaciones comparadas no muestran cambios apreciables respecto al medio donde se encuentran diluidos (buffer HEPES o medio de cultivo). Por otra parte, respecto a la variación del Pdl, se observa un leve incremento no significativo en este índice cuando se comparan los liposomas en buffer HEPES y en medio de cultivo McCoy's 5A.

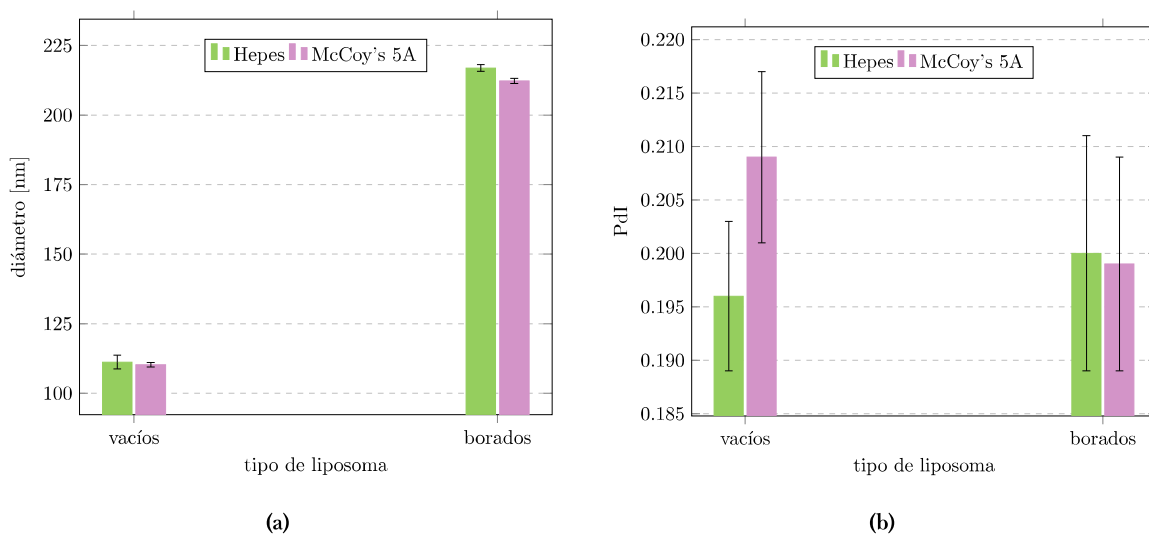


Figura 4.8: Comparación de tamaños (4.8a) y Pdl (4.8b) de liposomas vacíos y borados en búffer Hepes o medio de cultivo McCoy's 5A.

FRR	Concentración B [ppm]	Relación B/P	rendimiento P [%]
1:1	344.1 ± 5.2	4.9 ± 0.5	48.6 ± 4.9
1:2	294.4 ± 11.1	5.0 ± 0.6	65.6 ± 8.6
1:4	227.6 ± 15.5	5.2 ± 0.9	60.1 ± 8.7
1:6	180.9 ± 14.9	3.5 ± 0.7	35.8 ± 6.2

Cuadro 4.1: Resultados de la caracterización de los liposomas obtenidos a TFR 2 ml min^{-1} y diferentes FRR, en términos de la concentración de B y P.

^vLa comparación de estos tamaños en referencia a los mostrados en la figura 4.7 da una noción sobre la variación de los tamaños de los liposomas obtenidos en diferentes experimentos la cual, de acuerdo a lo realizado, no superó el 5 %.

El análisis en términos de la medición de la concentración de boro y fósforo realizadas en los liposomas obtenidos se resume en el cuadro 4.1. Los liposomas de mayor tamaño mostraron una concentración de boro mayor. Este resultado está asociado al aumento de la superficie del liposoma, donde se aloja el LCOB, y al aumento del volumen del interior hidrofílico, donde se aloja el GB-10.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó la obtención de liposomas empleando los siguientes parámetros de trabajo:

- TFR de 2 ml min^{-1}
- FRR de 1:1
- fase acuosa compuesta por una solución de GB-10 disuelto en HEPES 20 mM a una concentración final de 200 mM
- fase orgánica: (POPC:CHOL:DDAB:DSPE-PEG2000) $\equiv (55 : 32 : 12 : 1)$, disueltos en etanol absoluto a una concentración final de 40 mM
- LCOB al 50 % de la fracción molar de la solución de lípidos

Los liposomas obtenidos con estos parámetros fueron empleados en los ensayos de incubación para estudiar su incorporación en la línea celular SKBR-3.

4.2.4. Ensayos de incorporación de liposomas en cultivo celular

Se realizaron ensayos *in vitro* para estudiar la incorporación de los liposomas desarrollados en la línea celular de cáncer de mama SKBR-3^{vi}. Esta línea celular se caracteriza por sobreexpresar el receptor HER2 en membrana (consultar la sección 2.5.2) siendo, junto con la línea celular MDA-MB-453, una línea de referencia para el trabajo de investigación en este subtipo de cáncer de mama [282]. Con el fin de realizar los ensayos de incorporación, las células fueron mantenidas en estufa de cultivo a 37°C en CO₂ 5 % (vol/vol) con atmósfera húmeda y empleando medio de cultivo McCoy's 5A (Sigma Aldrich), suplementado con suero fetal bovino 10 % (vol/vol) (Natocor), junto con 1 mM de L-glutamina (Biopack), 100 IU ml⁻¹ de penicilina y 100 µg ml⁻¹ de estreptomicina (Sigma-Aldrich).

Previo a los ensayos de incorporación de liposomas, se estudió, por una lado, la citotoxicidad de la formulación lipídica de liposomas vacíos y, por otro, la toxicidad del diseño final de los liposomas encapsulando LCOB y GB-10. Los liposomas vacíos y borados mostrados en la figura 4.7 fueron empleados en los ensayos de toxicidad. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron empleando el método MTT (Sigma Aldrich), un ensayo colorimétrico que permite evaluar y determinar la viabilidad y proliferación celular. Las células se sembraron en placa p-96 y se incubaron por 48 h con una solución preparada con medio de cultivo y liposomas a diferentes concentraciones de fósforo. Luego de transcurrido el tiempo establecido de incubación se aplicó el protocolo del ensayo MTT. Los resultados obtenidos mostraron que tanto los ensayos de liposomas vacíos como los ensayos de liposomas encapsulando compuestos borados no presentaron toxicidad alguna en la línea celular para las concentraciones de incubación evaluadas.

^{vi}La línea celular para realizar los estudios fue provista por la Dra. Patricia Elizalde, directora del laboratorio de Mecanismos Moleculares de Carcinogénesis y Endocrinología Molecular del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), a quien el autor y sus directores agradecen su amabilidad y disponibilidad.

Por otra parte, con el objetivo de evaluar la incorporación de liposomas en la línea celular de interés, se realizaron diferentes ensayos de incubación *in vitro*. Estos ensayos se realizaron sembrando las células en placas p-24^{vii} y las incubaciones se realizaron a distintas concentraciones de boro y a distintos tiempos. Transcurridas 24 h desde su sembrado, las células fueron incubadas con una solución preparada con medio de cultivo y liposomas. De forma de determinar la concentración y tiempo óptimos de incubación tal que se logre la mayor incorporación de boro en las células, los ensayos se realizaron a diferentes concentraciones, 30, 60 y 125 ppm, y a diferentes tiempos de incubación, 6, 24 y 48 h.

Luego de transcurrido el tiempo establecido, se retiró la solución de incubación de cada uno de los pocillos y se realizaron tres lavados sucesivos empleando PBS (Biopack). A continuación, se aplicó tripsina-EDTA (Sigma Life Science) para desprender y levantar las células de cada uno de los pocillos. Se tomó una muestra de 10 µl para realizar el conteo de células con cámara de Neubauer y así determinar el número de células en la muestra. Finalmente, las células fueron reservadas en tubo tipo Falcon de 15 ml para aplicar el protocolo de digestión de muestras previamente establecido para la medición de la concentración de boro^{viii} y fósforo por medio de ICP-OES. Brevemente, el protocolo de digestión empleado para muestras biológicas consistió en el procesamiento de la muestra con ciclos de exposición con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno a diferentes temperaturas, con el fin de disgregar las moléculas exponiendo los elementos constituyentes para su medición en el equipo ICP-OES.

Como resultados de los experimentos, se observó una correlación directa de la incorporación de boro en función de la concentración ofrecida y del tiempo de incubación. Los experimentos de incubación a distintos tiempos, demostraron que a 48 h es donde se observa mayor incorporación de boro en las células. Por otra parte, la mayor incorporación de boro se alcanzó con una concentración de la solución de incubación de 125 ppm. En el cuadro 4.2 se presentan los resultados de las incubaciones a 6, 24 y 48 h para una concentración de incubación de 125 ppm.

Tiempo de incubación [h]	Masa B [µg/1.10 ⁶ células]
6	0.065 ± 0.009
24	0.138 ± 0.009
48	0.317 ± 0.030

Cuadro 4.2: Resultados del ensayo de captación a distintos tiempos de incubación y concentración de la solución de incubación de 125 ppm.

Tal como fue mencionado en la sección 3.4.5, los cálculos relacionados a la dosimetría requieren que los datos referentes a la concentración de ¹⁰B sean expresados en ppm en términos de las masas intervinientes, es decir la masa de boro y la masa del tejido o medio que contiene a los átomos de boro. Los resultados que se muestran en el cuadro 4.2 describen la incorporación de boro en las células pero, claro está, los valores mostrados como tales no permiten abordar el cálculo de dosis. De manera de poder

^{vii}De mayor superficie en comparación con las placas p-96, permite que se siembre una mayor cantidad de células y así aumentar el volumen de muestra compatible con la sensibilidad del ICP-OES para la medición de concentración de boro y fósforo.

^{viii}Es conveniente explicar que el equipo ICP-OES realiza una determinación de la concentración en términos del elemento boro natural, B. Es decir que no distingue entre isótopos, tal como lo puede hacer un equipo ICP-masa. Debido a que los liposomas desarrollados encapsulan dos compuestos borados, el GB-10 enriquecido en ¹⁰B y el LCOB sintetizado con B, y como no fue posible determinar en qué proporción se encuentran encapsulados, la masa reportada corresponde al B.

establecer un vínculo entre los resultados obtenidos y los cálculos mencionados, y que son requeridos en cualquier experimento de BNCT donde se evalúe la sobrevida de una población de células en función de la dosis recibida, se requiere entonces expresar la masa de boro relativo a la masa de las células involucradas.

A partir del procesamiento de las mediciones realizadas en ICP-OES en términos de la masa de boro medida, es posible realizar una estimación de la concentración en la definición de ppm requerida relacionando el número de células involucradas con su masa. Como parte de este abordaje se propuso medir la masa correspondiente a diferentes cantidades de células y de esta forma construir una curva que describe la masa en función del número de células. De esta forma los resultados obtenidos aplicando esta metodología fueron de (6.0 ± 3.7) ppm a 6 h, (16.0 ± 5.6) ppm a 24 h y (36.8 ± 8.0) ppm a 48 h.

Por otra parte, teniendo en consideración los resultados del cuadro 4.2, y que se ha establecido que en 1 cm^3 de tejido existen 10^8 células [288] y, además, asumiendo una densidad $\rho = 1 \text{ g cm}^{-3}$, es posible estimar la masa existente para un número determinado células. Bajo estas consideraciones, la concentración de boro para los tiempos de incubación del cuadro 4.2 presentado es (6.5 ± 0.9) ppm a 6 h, (13.8 ± 0.9) ppm a 24 h y (31.7 ± 3.0) ppm a 48 h.

Estos resultados de concentración de boro medida en la línea celular fueron tenidos en cuenta dentro de los rangos de estudio establecidos para los cálculos de dosis en la sección 3.5. Por otra parte, en el capítulo siguiente, se muestra el desarrollo y aplicación de una técnica de imágenes que permite el análisis complementario a estas mediciones y que muestra con detalle la distribución del boro en las células.

5 | Estudio experimental de la microdistribución de compuestos borados en cultivos celulares

En el capítulo anterior se describió el desarrollo y ensayo de liposomas propuestos como transportadores de compuestos borados. Los ensayos mostraron la incorporación efectiva de los liposomas en la línea celular de cáncer de mama SKBR-3. En este capítulo se presenta un método experimental para la evaluación de la incorporación de los liposomas desarrollados. El método propuesto se basa en la mejora de la combinación de dos técnicas de imágenes preexistentes: la autorradiografía neutrónica y la radiografía con UV-C. En este punto, se desarrollan los conceptos necesarios para abordar ambas técnicas y se explica la propuesta como mejora de la combinación de ambas. Finalmente, a partir de la aplicación de la técnica propuesta en la línea celular de interés, se describen las herramientas desarrolladas y aplicadas para el análisis de los resultados obtenidos y que permiten evaluar las densidades de trazas en los diferentes compartimentos celulares de interés: el núcleo y el citoplasma celular. En función de la densidad de trazas fue posible determinar las distribuciones ^{10}B en las células. Cabe destacar que el método experimental junto con las herramientas de análisis desarrolladas en esta tesis pueden ser aplicados para el estudio de cualquier otro tipo de compuesto borado independientemente de su tipo de transporte (ya sean compuestos administrados libres o encapsulados en transportadores).

5.1. Aplicación de técnicas de imágenes como herramientas para el estudio de la distribución de compuestos borados

5.1.1. Conceptos de autorradiografía neutrónica

Dentro de las diversas técnicas de imágenes nucleares, de las cuales se pueden mencionar la Tomografía Computada por Emisión de Fotón Único (SPECT) y la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), la autorradiografía permite obtener el registro bidimensional de la distribución de emisores de una muestra radiactiva con una resolución que se encuentra entre $\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ y $\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ [284]. La autorradiografía encuentra aplicación en el campo de la dosimetría de la radiación y en la protección radiológica. Se diferencia de la radiografía en el hecho que la radiación proviene de la misma muestra que se desea analizar y no de una fuente externa de radiación, como puede ser el caso de una fuente de rayos X empleada para tomar una placa radiográfica. A diferencia de las otras técnicas mencionadas, en comparación tecnológicamente mucho más complejas, la técnica de autorradiografía requiere del po-

sicionamiento de la muestra radiactiva en contacto con un material detector específico que registre las emisiones de dicha muestra. Seguido al posicionamiento se realiza la aplicación de un proceso de ataque químico, que tiene como finalidad la magnificación del daño producido por las partículas, de forma que este daño pueda ser visible a nivel de la microscopía óptica. Dependiendo del tipo de detector empleado, cuya diversidad cubre desde las películas de emulsión o films hasta detectores de estado sólido, se pueden registrar fotones, partículas β , partículas α y núcleos pesados. Las aplicaciones más avanzadas hacen uso de dispositivos CCD (Charge-Coupled Detector) que permiten registrar los eventos de emisión en tiempo real [285]. En el caso particular de la *autorradiografía neutrónica*, la muestra de interés, en origen no radiactiva, se irradia con neutrones de manera que en el material detector se registran los productos y/o subproductos de la reacción nuclear que tiene lugar entre los neutrones y los núcleos que conforman la muestra¹.

La aplicación de la autorradiografía empleando detectores de trazas nucleares de estado sólido, denominados SSNTDs por sus siglas en inglés, tiene su origen en el trabajo realizado por Young en 1958 al observar, luego de aplicar un proceso de ataque químico y empleando microscopía óptica y de transmisión electrónica, la generación de *marcas* en forma de puntos en un cristal de fluoruro de litio previamente irradiado por fragmentos de fisión [286]. En ese mismo trabajo, Young explicó que las marcas generadas eran producidas por el daño en el cristal a lo largo de la trayectoria de los fragmentos de fisión, encontrando además una correspondencia uno a uno con el número de fragmentos que alcanzaban el detector. Casi al mismo tiempo, y en forma independiente, Silk y Barnes observaron el mismo daño producido por fragmentos de fisión impactando en hojas delgadas de mica empleando un microscopio electrónico de transmisión [287]. Luego, en 1962, Price y Walker descubrieron que el daño producido por fragmentos de fisión en mica podía ser aumentado al nivel de ser observable bajo microscopio óptico previa aplicación de un ataque químico [288]. A partir de estas observaciones, el daño estructural referido se denominó *traza latente* y se determinó que puede ser magnificado por un ataque químico resultando en lo que finalmente se define como *traza*. Posteriormente, en respectivos trabajos, Fleischer y Price (1963) y Fleischer y col. (1964) encontraron que existe una amplia variedad de materiales aislantes dentro de los denominados SSNTDs, que incluyen detectores inorgánicos, como vidrios, hasta detectores orgánicos, como polímeros, que poseen la capacidad de registrar trazas [289-291].

Los detectores de trazas de estado sólido son atractivos para ciertas aplicaciones relacionadas a la dosimetría de la radiación debido a que, en general, son capaces de proveer información de la fluencia de las partículas cargadas (determinada a partir de la densidad de trazas), la dirección (dada por el ángulo de la traza) y/o la energía (asociada a la longitud de la traza). En comparación con los detectores inorgánicos, los detectores orgánicos poseen ventajas adicionales tales como presentar una baja contribución debido a la radiación de fondo, el montaje de la muestra sobre el detector es relativamente sencillo de realizar, y por otra parte, se encuentran en una amplia disponibilidad de formas y tamaños [292]. Entre los detectores poliméricos empleados se destacan el carbonato poli-alildiglicol (PADC), comercialmente conocido como CR-39, y la resina de policarbonato o policarbonato bisfenol A, denominado comercialmente como Lexan® (Lexan). Ambos materiales se caracterizan por sus propiedades ópticas, térmicas y mecánicas. El CR-39 posee excelentes propiedades ópticas al punto que ha sido empleado como re-

¹A diferencia de la técnica de *neutrografía*, en la cual la imagen se compone por la atenuación en la muestra de los neutrones empleados como fuente de radiación, es decir que los neutrones cumplen el rol de los rayos X en el caso de una placa radiográfica.

emplazo del vidrio en aplicaciones oftalmológicas. Por su parte, el Lexan es un plástico de ingeniería, considerado así por sus mejores propiedades mecánicas y ópticas respecto a plásticos comunes.

En la figura 5.1, a modo de ejemplo, se muestran las trazas reveladas en CR-39 productos de la irradiación con una fuente de ^{222}Cf . Dados los distintos tiempos de ataque químico, se observan trazas provenientes de diferentes productos: en la figura 5.1a sólo se observan las trazas correspondientes a los fragmentos de fisión mientras que en la figura 5.1b, además de las trazas mencionadas, se pueden apreciar las trazas provenientes de las partículas α . Cabe destacar que en el caso de las trazas de fragmentos de fisión de la figura 5.1b están magnificados respecto a los mismos mostrados en la figura 5.1a debido al mayor tiempo de ataque químico (15 min y 45 min, respectivamente).

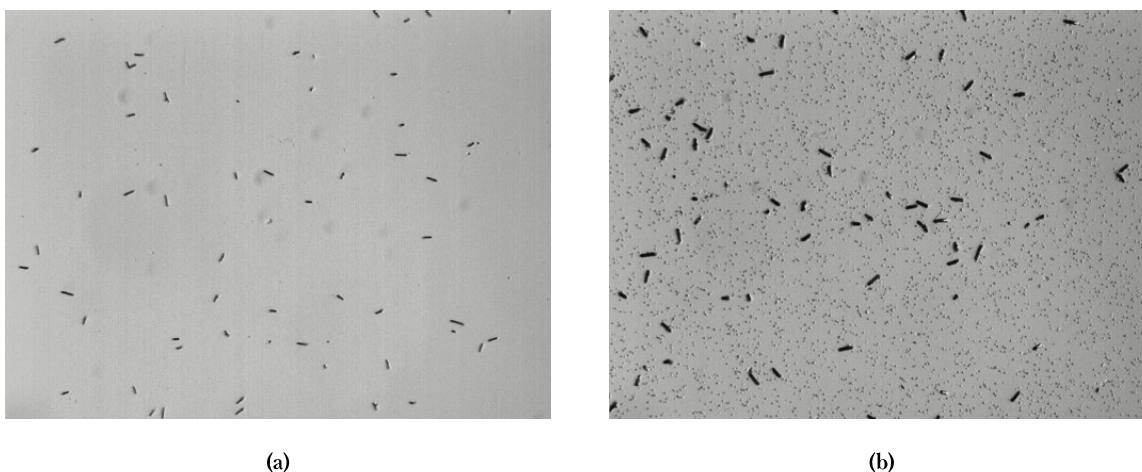


Figura 5.1: Trazas generadas con fuente de ^{222}Cf en CR-39 luego de aplicar un ataque químico empleando NaOH a una concentración 6.25 N, por un tiempo de 15 min (5.1a) o 45 min (5.1b).

5.1.1.1. Mecanismos de formación de la traza

Si bien se han logrado identificar diferentes modelos que caracterizan el proceso de formación de la traza, hasta el momento no existe una única teoría que explique los fundamentos físicos de este mecanismo. Se debe recordar, como se mencionó anteriormente, que el proceso de formación de la traza se inicia con el daño estructural en el material detector, la traza latente, y se consolida y magnifica con la aplicación de un ataque químico dando lugar, finalmente, a la traza.

En el proceso de formación de la traza latente se identifican dos fases involucradas claramente diferenciadas: una fase física y una fase físico-química. La primera fase se identifica con las ionizaciones y excitaciones dadas por la interacción de las partículas cargadas que atraviesan el material detector. El proceso de ionización que ocurre a lo largo de la trayectoria de cada partícula da lugar a la segunda fase que involucra la generación de un proceso químico que resulta en la creación de radicales libres y otras especies químicas reactivas, que alteran la estabilidad de la zona afectada. Precisamente, son estas regiones que presentan este tipo de daño que conforman las trazas latentes y, si bien se caracterizan por ser muy pequeñas para ser observadas bajo un microscopio óptico, bajo ciertas condiciones que así lo permitan pueden ser visualizadas empleando microscopía electrónica de transmisión. Se ha determinado que las trazas latentes no se forman en metales y semiconductores debido a que en estos materiales se

produce un proceso de recombinación, es por ello que sólo los materiales dieléctricos muestran regiones con un daño estructural irreversible.

Existen diversos formalismos propuestos para explicar el mecanismo de formación de la traza latente asociados al tipo de material detector bajo análisis. Si bien no hay un único modelo que explique completamente este mecanismo, existen principalmente dos que han sido mayormente aceptados y que lograron explicar en forma satisfactoria los datos experimentales: *Pico de Explosión Coulombiana* (empleado en el caso de detectores inorgánicos) y *Mecanismo de Daño Radioquímico* (aplicado para detectores orgánicos).

El primer modelo propone que la ionización primaria es la principal responsable de la formación de la traza latente. En su interacción, la partícula cargada crea iones generando una carga neta positiva a lo largo de su trayectoria en el material. La repulsión coulombiana causa una eyección de los mismos iones a lo largo de la trayectoria produciendo una región de daño latente. En diferentes ensayos fue evidenciado que los efectos de electrones secundarios energéticos junto con los procesos de excitación no son relevantes en sólidos inorgánicos [292].

En el caso de los detectores orgánicos, el segundo modelo considera que los procesos de ionización y excitación secundaria (además del proceso primario) no pueden desestimarse en el mecanismo de formación de la traza latente. Cuando la partícula pierde su energía en el material, parte de la misma es entregada a electrones energéticos, denominados rayos- δ , que típicamente depositan su energía lejos de la trayectoria de la partícula primaria. Sin embargo, una fracción de los mismos, aquellos de menor energía, depositan su energía en la región central o núcleo de la trayectoria de la partícula primaria. De esta forma, en 1970 Benton propuso describir este proceso contemplando la cantidad denominada *Pérdida de Energía Restringida* (REL, por sus siglas en inglés), expresada como $(-dE/dx)_{E_b}$, donde sólo se consideran las transferencias de energía menores a E_b [293]. Se determina entonces un valor de corte E_b de forma que sólo aquellos rayos- δ cuya energía es menor que E_b pueden dar lugar al rompimiento de cadenas poliméricas junto con la formación de radicales libres en la zona central de la trayectoria de la partícula. De esta manera, las trazas latentes se forman por la escisión radiolítica de cadenas de polímeros en fragmentos más cortos incrementando la reactividad química de la región dañada. Este modelo ha mostrado ajustar una gran cantidad de datos experimentales en forma adecuada [292].

Tal como se mencionó anteriormente, la técnica de autorradiografía empleando SSNTDs requiere de la aplicación de un ataque químico con el fin de magnificar el tamaño del daño producido a lo largo de la trayectoria de la partícula cargada en el detector. Al exponer el material a una solución química adecuada, las reacciones ocurren en todas direcciones pero más intensamente en las regiones de trazas latentes. El efecto del proceso de ataque químico produce un aumento del tamaño en la dirección de la traza latente expuesta y, con parámetros adecuados, se puede lograr que este daño sea visible con un microscopio óptico. Incluso si la densidad de trazas es alta, el conjunto de daños puede ser visualizado a ojo desnudo. Se destacan dos parámetros asociados a la tasa a la cual ocurre el ataque químico y que tienen un impacto directo en la formación de la traza: la *velocidad de traza* (V_T) y la *velocidad de bulk* (V_B). La velocidad de traza está asociada a la tasa de ataque químico que progresa a lo largo de la traza latente y, debido al daño producido por la partícula, esta velocidad de ataque no es constante. Por su parte, la velocidad de bulk representa la tasa de ataque químico en el resto del material que no ha sido alcanzado por tal daño, es característica del material y para parámetros fijos asociados al ataque químico, como la concentración y temperatura del reactivo químico empleado, no varía. Sin profundizar en el desarrollo

de los diferentes modelos de formación de trazasⁱⁱ, se pueden considerar diferentes casos de análisis, desde el más simplista que asume una V_T constante e incidencia normal u oblicua de la partícula, al más general y real que tiene en cuenta la variabilidad de V_T a lo largo de la traza latente. En la figura 5.2 se muestra el esquema de formación de la traza para una partícula con incidencia normal sobre el material detector. Se asume que V_T y V_B son constantes, es decir no varían durante el proceso de ataque químico. La traza en tres dimensiones puede visualizarse como un cono con un ángulo de desarrollo rotando alrededor de la trayectoria de la partícula.

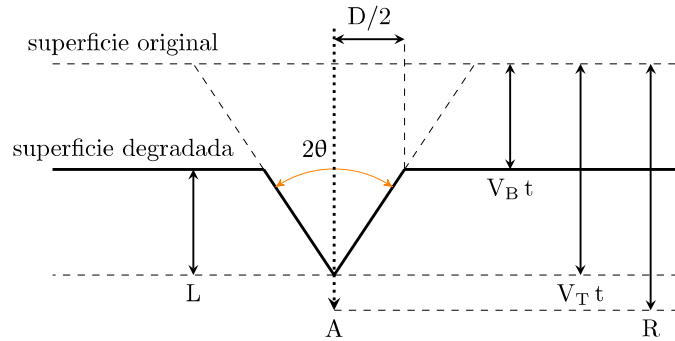


Figura 5.2: Parámetros del mecanismo de formación de la traza para una partícula con incidencia normal sobre el material. V_B : velocidad de bulk, V_T : velocidad de traza, t : tiempo de ataque químico, L : longitud de la traza en el material, D : diámetro de la traza, R : rango de la partícula en el material, A : dirección de la traza.

La formación de la traza depende del efecto competitivo entre V_T y V_B , tal como se puede observar en las siguientes relaciones que definen la longitud de la traza L , ecuación 5.1, y su diámetro D , ecuación 5.2. Considerando el esquema de la figura 5.2 y definiendo como t al tiempo durante el cual se expone el detector al ataque químico, se tienen las siguientes ecuaciones:

$$L = (V_T - V_B) t, \quad (5.1)$$

$$D = 2 V_B t \sqrt{\frac{V_T - V_B}{V_T + V_B}}. \quad (5.2)$$

De acuerdo a las ecuaciones 5.1 y 5.2, se puede apreciar el efecto competitivo entre V_T y V_B en el desarrollo de la longitud y el diámetro de la traza formada. La traza latente será magnificada por el ataque químico sólo si la tasa de ataque químico a lo largo de la trayectoria de la partícula, V_T , excede la tasa a la cual ocurre el ataque químico en la superficie, V_B , es decir, si $V_T > V_B$. Por otra parte, dado que para el caso de la irradiación con iones pesados o fragmentos de fisión ocurre que $V_T \gg V_B$, la capa de material detector removida, y por ende V_B , puede relacionarse con el diámetro de la traza D a partir de la siguiente expresión:

$$D = 2 V_B t. \quad (5.3)$$

ⁱⁱPara una detallada descripción de los modelos y parámetros asociados a cada uno se recomienda consultar [292, 294].

Por otra parte, para partículas incidentes en la superficie del detector con un ángulo θ (es decir, el ángulo entre la traza y la superficie del detector), la componente de V_T perpendicular a la superficie, $V_T \sin \theta$, debe ser mayor a V_B de forma de producir una traza visible, es decir $V_T \sin \theta > V_B$. De esta forma, queda definido un ángulo crítico para la formación de la traza, θ_C , por debajo del cual el daño producido por la trayectoria de la partícula no se desarrolla en una traza visible. Este ángulo crítico está dado por la siguiente ecuación:

$$\theta_C = \arcsin V_B/V_T. \quad (5.4)$$

Cabe mencionar que la tasa de ataque químico a lo largo de la trayectoria de la partícula, V_T , puede ser considerada constante sólo para tiempos cortos. Dado que V_T depende de la cantidad de daño molecular a lo largo de la trayectoria de la partícula, en general, este parámetro varía a lo largo de esta trayectoria en la mayoría de los materiales y se incrementa con el REL y, por ende, depende del término Z^2/β^2 de las partículas cargadas. De esta forma, no existe un ángulo crítico θ_C bien definido y la eficiencia del ataque químico es más compleja de describir de lo que ocurre en el caso de asumir un ángulo fijo θ_C . La forma de la traza en el material varía con la tasa de ataque en la traza latente, y solo bajo la condición de V_T constante en un medio isotrópico se obtiene una traza con forma cónica [292].

La expresión de la ecuación 5.2 es de gran importancia ya que, a partir de un parámetro que puede ser fácilmente medible como el diámetro de la traza D , permite caracterizar la cinética del proceso del ataque químico dada por la sustancia empleada. El parámetro V_B es uno de los más importantes involucrados en el control de la formación de trazas. Se ha demostrado que depende de diversos factores como la pureza de las sustancias químicas, la estructura molecular del polímero y de las condiciones en las cuales se produce el ataque químico, como la solución reactiva empleada, la concentración y la temperatura a la cual ocurre el proceso. Existen diferentes soluciones químicas empleadas, siendo las soluciones alcalinas, como el hidróxido de sodio (NaOH) y el hidróxido de potasio (KOH), las más empleadas en el uso con detectores poliméricos. El mecanismo del ataque químico de estas soluciones se basa en la hidrólisis de las uniones éster del polímero por la acción de los grupos OH^- [292]. Teniendo en cuenta que las condiciones de ataque químico dependen de la composición del material detector expuesto, típicamente la concentración empleada de estas soluciones varía entre 1 a 12 M para Lexan y CR-39, existiendo una relación de crecimiento exponencial entre V_B y la concentración. En cuanto a la temperatura, típicamente varía en el rango de aplicación entre 20 a 70°C, y a partir de diferentes trabajos, ha sido establecido que la tasa de ataque químico en detectores poliméricos se incrementa exponencialmente con la temperatura T a la cual ocurre el ataque químico, siendo esta relación aplicable tanto para V_B como para V_T [294].

Habiendo comentado los procesos relacionados a la formación de la traza y ya definidos los parámetros asociados, se puede entonces mencionar algunas de las características ventajosas del empleo de detectores de trazas poliméricos tales como el CR-39 o el Lexan, que se detallan a continuación:

- i. Son económicos y fáciles de manipular, permitiendo adecuar la geometría de acuerdo a los requerimientos de la implementación requerida.
- ii. Son fácilmente transportables, es decir, se puede realizar la irradiación en el sitio de interés. Luego los detectores pueden ser transportados al laboratorio para la aplicación del proceso de ataque

químico y posprocesamiento para la determinación de la densidad de trazas aplicando el procedimiento adecuado.

- iii. El proceso de ataque químico para la formación de traza es relativamente sencillo, no requiere de cuartos oscuros (en comparación con el revelado de placas radiográficas), las sustancias empleadas en este proceso son económicas y de fácil disposición.
- iv. Las trazas generadas son permanentes, se mantienen inalterables por cambios atmosféricos como temperatura, presión, humedad.
- v. Bajo ciertas condiciones, pueden ser empleados como umbral de detección ya que algunos plásticos no registran protones pero sí son sensibles a partículas cargadas pesadas. Este es el caso del Lexan.
- vi. La visualización de las trazas formadas sólo requiere de un microscopio óptico de características adecuadas.

5.1.2. Procesos involucrados en la sensibilización por radiación UV-C

De los diferentes detectores orgánicos, se abordará el caso del policarbonato y los mecanismos que explican cómo la luz del espectro ultravioleta (UV) actúa en su degradación permitiendo obtener una impronta de la muestra de interés en el material detector. Como se mencionó en la sección anterior, el policarbonato se caracteriza por exhibir una combinación única de propiedades. En consecuencia, el policarbonato se emplea en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo su utilización como sustituto más liviano y resistente del vidrio. Sin embargo, el policarbonato es susceptible a la fotodegradación bajo el efecto de la radiación UV, la cual causa la rotura del material, provocando coloración amarillenta, pérdida de dureza y fragilidad.

Cuando la luz UV alcanza el policarbonato, las moléculas que lo componen absorben la energía de ciertas longitudes de onda. Esto ocurre particularmente para los grupos éster y los anillos aromáticos que constituyen el polímero y que son fuertes absorbentes de esta radiación. De acuerdo a la longitud de onda λ , el espectro UV se divide en UV-A ($\lambda \sim 320 - 400$ nm), UV-B ($\lambda \sim 280 - 320$ nm) y UV-C ($\lambda \sim 200 - 280$ nm). La fotodegradación del policarbonato es una reacción superficial que produce el rompimiento de cadenas poliméricas, este proceso es fuertemente dependiente de la longitud de onda de la radiación [295-297]. En especial, en la región UV-C se ha observado que en el proceso de degradación del policarbonato coexisten dos mecanismos que se diferencian teniendo cada uno su propia ruta y productos de reacción [295, 298]: la *fotooxidación*, resultante en la escisión de la cadena polimérica [299] y el *reacomodamiento* de cadenas conocido como proceso *foto Fries* [300].

Luego de la exposición del policarbonato a la radiación UV, se forman dos capas: una capa superficial de tonalidad marrón, fuertemente oxidada, y bajo ella una capa de coloración amarillenta. La formación de la capa superficial se atribuye a la radiación de longitud de onda más corta debido a que la delgada capa superficial del polímero absorbe estas longitudes de onda. Las longitudes de onda mayor penetran en el polímero y son las promotoras de la formación de la segunda capa. El mecanismo de degradación puede entonces explicarse por una combinación del efecto foto Fries seguido por la fotooxidación [300]: la reacción foto Fries se activa a longitudes de onda $\lambda < 310$ nm mientras que la fotooxidación es favorecida por longitudes de onda en el rango de 290 – 350 nm [295].

La reacción foto Fries es promovida por la radiación de longitud de onda corta y no requiere oxígeno para ocurrir. En este mecanismo, la energía absorbida de la radiación UV promueve la escisión del enlace de carbonato, formando radicales libres. Estos radicales libres luego se reacomodan para formar otros grupos, tales como salicilatos de fenol y dihidroxibenzofenona [295]. La oxidación de estos grupos resulta en otras sustancias que absorben luz en el rango de la longitud de onda del azul y es la responsable de la coloración amarillenta de las muestras fotodegradadas [301]. Los productos formados durante la reacción foto Fries también pueden fotooxidarse, dando lugar a productos secundarios y terciarios de menor peso molecular.

Por otra parte, en el mecanismo de fotooxidación, la radiación UV es absorbida por impurezas en el polímero y, como resultado, los átomos de hidrógeno son extraídos de los grupos metilos formando radicales libres, iniciando así una reacción de escisiones de cadenas que propagan la fotooxidación. La acción de los radicales libres se propaga hasta que no queden sitios activos disponibles y hasta que no exista presencia de oxígeno que permita continuar la reacción [302]. En este mecanismo, la escisión de cadenas es favorecido por sobre el entrecruzamiento, particularmente cerca de la terminación de las cadenas poliméricas resultando en la formación de componentes de bajo peso molecular. A longitudes de onda más cortas, los radicales libres de las degradaciones tienden a recombinarse en productos, mientras que a longitudes de onda larga reaccionan en forma separada formando estructuras con grupos terminales fenólicos [302, 303].

Los daños causados por la fotodegradación debido a la exposición a la radiación UV-C en polycarbonato pueden magnificarse aplicando un ataque químico con una solución alcalina, tal como se explicó en la sección 5.1.1.1. Como resultado del ataque químico en las regiones fotodegradadas se obtiene que la V_B se incrementa en forma preferencial. De esta forma, si se interpone una muestra entre la fuente UV-C y el detector y luego se revela, la solución de ataque químico actuará preferencialmente (a mayor tasa V_B) en las regiones afectadas por la exposición directa a UV-C, mientras que en aquellas zonas protegidas por la muestra la V_B será menor. Esta diferencia genera un contraste en la degradación de la superficie del detector formando la impronta de la muestra de interés. En la figura 5.3, como ejemplo, se muestra la impronta celular obtenida en Lexan por la exposición a una fuente de UV-C y posterior revelado químico con solución a base de KOH a 70 °C.

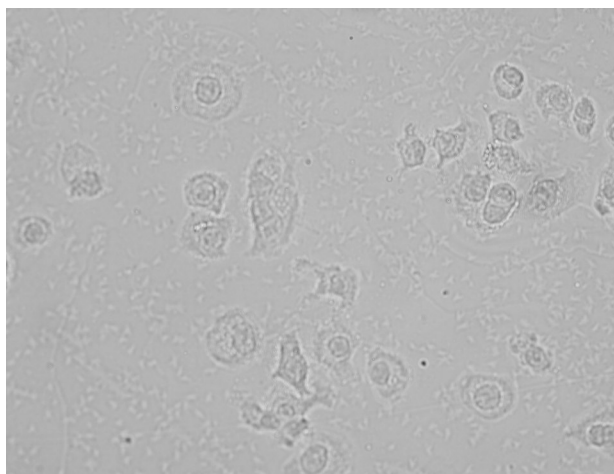


Figura 5.3: Impronta celular obtenida mediante la técnica de sensibilización UV-C en Lexan.

5.2. Combinación de la autorradiografía neutrónica y la sensibilización UV-C para la localización espacial de trazas y estructuras celulares

5.2.1. Fundamentos

Ya revisados los mecanismos de acción implicados en la formación de trazas por la autorradiografía neutrónica y la formación de improntas por la sensibilización UV-C en policarbonato, se explicará cómo ambas técnicas se combinan para obtener la distribución espacial de trazas generadas por la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ en estructuras celulares de interés para así estudiar la microdistribución de compuestos borados empleados en BNCT.

Como fue explicado en la sección 5.1.1.1, los productos emitidos por la reacción de captura en ^{10}B durante la irradiación neutrónica pueden ser registradas por un detector. Este concepto fue aplicado por primera vez por Mayr y col. en 1953 para determinar la distribución de ^{10}B en muestras biológicas empleando películas de emulsión fotográfica, obteniendo un alto ruido de fondo debido a la sensibilidad del detector a fotones y otras radiaciones. Posteriormente, el desarrollo de técnicas de registro de partículas cargadas con bajo ruido de fondo y con potencial aplicación en el análisis de macromoléculas con ^{10}B fue descrito por Fairchild y col. [304]. Luego fue empleado para el estudio de la distribución y la determinación de su concentración en muestras de tejido biológicos con interés de aplicación en BNCT [305]. En este marco de aplicación, el desarrollo y utilización de los SSNTDs para la detección de los productos de la reacción de captura neutrónica ha sido propuesta en diferentes trabajos para el análisis de la distribución de compuestos borados junto con la determinación de su concentración en diversas muestras biológicas, en especial cortes histológicos de tejidos [306-311].

Diferentes grupos han propuesto y desarrollado diversas técnicas con el objetivo de correlacionar la distribución de las trazas generadas en la reacción de captura neutrónica con respecto a la histología del tejido de la muestra bajo análisis. Uno de estos grupos propuso el empleo de Lexan como material detector en contacto con la muestra y montado sobre una delgada capa de vidrio de cuarzo de forma que pueda explorarse el tejido y las trazas bajo un microscopio óptico [312]. En investigaciones posteriores, se propuso el empleo de este concepto de forma de estudiar la histología de la muestra y la distribución del ^{10}B en cortes histológicos sucesivos [49, 313]. Por otra parte, otros trabajos han propuesto el empleo de CR-39 como material detector de trazas y sobre el cual se generó la impronta del tejido empleando la sensibilización con radiación UV-C, de forma de obtener en el mismo detector la distribución de trazas respecto al mismo tejido empleado en su análisis aplicando microscopía de fuerza atómica [314] o microscopía óptica [315].

Como parte de estas investigaciones, el grupo colaborador local de Imagenología del Boro perteneciente al Proyecto de BNCT de la CNEA, y gracias a su gran experiencia en la detección de trazas por medio de técnicas de imágenes nucleares, ha desarrollado la técnica y los protocolos experimentales para la visualización simultánea de improntas celulares, mediante la sensibilización UV-C, y de las trazas de la reacción de captura empleando Lexan como detector [316-318]. Sin embargo, se ha determinado que cuando un detector con trazas latentes es expuesto a la radiación UV-C, la densidad de trazas observadas luego del ataque químico se ve disminuida respecto al mismo detector sin irradiar. A este efecto se lo ha denominado *desvanecimiento de trazas* (descrito en inglés como *nuclear track fading*) y su nombre hace énfasis al efecto de desaparición o disminución del número de trazas. Si bien pocos trabajos incluyen el estudio en policarbonato, diferentes grupos han investigado este fenómeno pudiendo

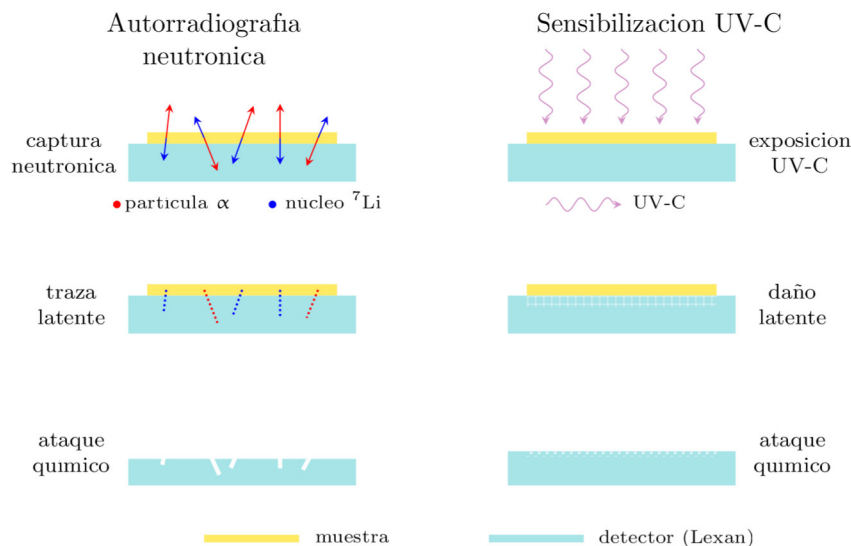


Figura 5.4: Esquema de aplicación de las técnicas de autorradiografía neutrónica y sensibilización UV-C.

establecer que el número de trazas disminuye con el tiempo de exposición a la radiación UV-C pero encontrando resultados contrapuestos sin llegar a una explicación satisfactoria sobre el mismo. Recientemente, un trabajo publicado por el grupo local mencionado propuso el estudio de este fenómeno en Lexan para diferentes partículas, incluyendo los productos de la reacción de captura neutrónica en ${}^{10}\text{B}$ y otros iones más pesados [319]. Se encontró que la remoción de la superficie expuesta a la radiación UV-C puede exceder largamente el rango de los iones en el detector, lo cual arroja una posible explicación para la pérdida de las trazas formadas en el detector. Por otra parte, ese mismo trabajo postuló que el daño por fotodegradación puede interferir con el daño producido por el ión impidiendo el ataque químico preferencial en las trazas latentes (y en consecuencia afectando el parámetro V_T), concluyendo además que este efecto debe contemplarse cuando se cuantifiquen las trazas empleando la combinación de ambas técnicas.

A partir de los trabajos mencionados, la propuesta de trabajo en esta tesis consistió en mejorar la resolución de esta técnica de forma que permita determinar la distribución de trazas nucleares provenientes de la reacción de captura neutrónica en ${}^{10}\text{B}$ en estructuras celulares de interés tales como el citoplasma y el núcleo. En la figura 5.4 se muestra un esquema conceptual de la aplicación de la autorradiografía neutrónica para la obtención de las trazas nucleares junto con la sensibilización UV-C para el desarrollo de la impronta de la muestra en el material detector. La propuesta de la combinación de ambas técnicas se centró en poder obtener las trazas nucleares y la impronta de la muestra en el mismo material detector.

Considerando que el núcleo celular posee una absorción UV mayor en comparación con el citoplasma [320] y que la hematoxilina, empleada en las técnicas de tinción histológica, actúa preferencialmente en el núcleo, se propuso mejorar el contraste entre estas dos estructuras celulares empleando la tinción con hematoxilina previo a la sensibilización por radiación UV-C y posterior a la irradiación neutrónica. El estudio se centró en la reducción del tiempo de exposición a la radiación UV-C, de forma de minimizar el efecto de desvanecimiento de trazas, logrando un mayor contraste entre las improntas

celulares y preservando las trazas nucleares en una misma imagen. El desarrollo de esta propuesta involucró diferentes fases de trabajo: desde el estudio de las condiciones para el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama SKBR-3 en el material detector, los parámetros experimentales de exposición UV-C y de ataque químico para la obtención simultánea de improntas celulares y trazas nucleares en Lexan, junto con el estudio del fenómeno de desvanecimiento de trazas bajo las condiciones propuestas.

5.2.2. Estudio de formación de improntas celulares

Los estudios se llevaron a cabo empleando la línea celular de interés SKBR-3 mencionada en la sección 4.2.4. Tal como fue descrito en dicha sección, esta línea se mantuvo en medio de cultivo McCoy's 5A (Sigma Aldrich) suplementado con 10 % (vol/vol) de suero fetal bovino (Natocor), 1 mM de L-glutamina (Biopack) 100 IU ml⁻¹ de penicilina y 100 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin (Sigma Aldrich). Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera húmeda con 5 % (vol/vol) de CO₂.

Se realizaron pruebas preliminares con el objetivo de establecer las condiciones experimentales para el pegado y crecimiento de las células en policarbonato (Lexan™8010, SABIC Innovative Plastics). A partir de películas de Lexan de 250 µm de espesor, se obtuvieron discos de diámetro compatible con el tamaño de los pocillos de placa de cultivo p-24. Estos discos fueron embebidos y esterilizados en etanol (Biopack) al 70 % durante 3 h antes del sembrado de las células. Luego de esterilizados, y de manera de estudiar distintas estrategias de pegado de las células, los discos detectores fueron pretratados con PBS (Biopack), medio de cultivo o suero fetal bovino (SFB) por 24 h previas al sembrado de células. Transcurrido el tiempo establecido, los discos detectores fueron lavados con PBS y colocados en diferentes pocillos de placa de cultivo p-24 (Jet Biofil) sin tratamiento^{III} y, a continuación, se sembraron las células en cada disco. Luego de 24 h, se removió el medio de cultivo, se realizaron tres lavados con PBS con el objetivo de remover las células muertas, y se aplicó glutaraldehído calidad TEM (Ted Pella) al 2 % en PBS durante 10 min a baja temperatura para la fijación de las células a los discos. Finalmente, se removió la solución de fijación y se dejó secar. Como control experimental del procedimiento, las células fueron sembradas en pocillos de placa p-24 tratadas, de acuerdo al procedimiento estándar. En todo el trabajo realizado, para el análisis de cada condición experimental propuesta se tomaron fotografías de las muestras analizadas empleando un microscopio óptico (Olympus BX51) acoplado a una cámara CCD (Olympus DP70).

En la figura 5.5 se muestran las fotografías tomadas de las células cultivadas con diferentes pretratamientos y fijadas al Lexan. En particular, se observa una muy buena distribución de células y morfología en el caso del disco de Lexan pretratado con PBS por sobre el disco pretratado con medio de cultivo McCoy's 5A. En ambos casos, si bien más claramente en el disco pretratado con PBS, es posible individualizar los núcleos celulares incluso sin haber realizado la tinción con hematoxilina. En el caso del disco pretratado con SFB se observa un crecimiento heterogéneo y una muerte celular apreciable.

A partir de la inspección de los discos de Lexan con las células fijadas, se escogió emplear PBS como pretratamiento y sobre esta condición se realizaron pruebas de tinción con hematoxilina (Biopack). Como se muestra en la figura 5.6, se obtuvo una apreciable tinción de las células. Se observa claramente la buena distribución y morfología de las células fijadas con una notoria marcación de los núcleos respecto del citoplasma. El protocolo de pegado y fijación logró un buen mantenimiento y calidad de la estructura

^{III}Cabe aclarar que para los ensayos de cultivo *in vitro*, las placas reciben un tratamiento en su fabricación con el objetivo de favorecer el pegado de las células al sustrato. En este caso, la propuesta requirió que las células crezcan en los discos de Lexan y no en los pocillos de la placa, los cuales, en este caso, sólo sirvieron de contenedores.

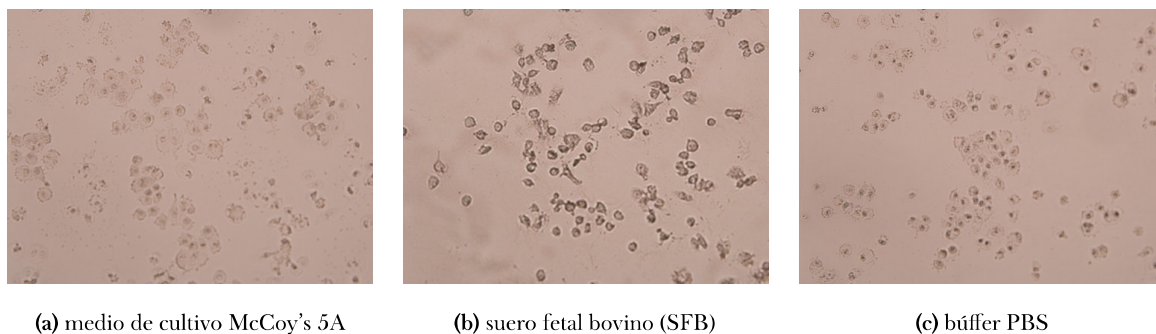


Figura 5.5: Resultados de los diferentes tratamientos aplicados en Lexan para el establecimiento celular.

celular. A partir de lo observado, se estableció como protocolo de trabajo de adhesión de células el uso de discos de Lexan embebidos en PBS 24 h antes de la siembra de células y el fijado de células empleando glutaraldehído calidad TEM.

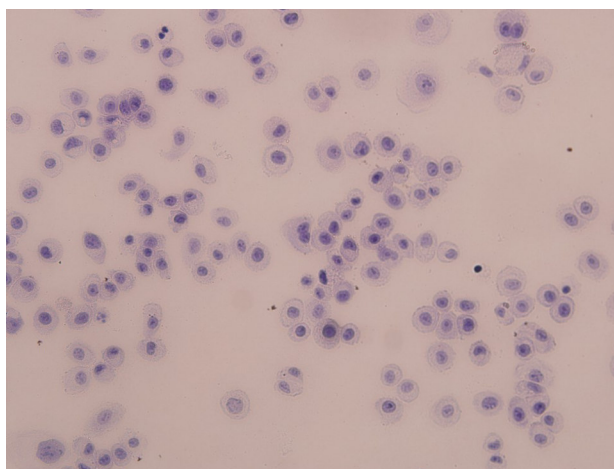


Figura 5.6: Células fijadas en Lexan con el protocolo de pretratamiento con PBS y tinción con hematoxilina.

Una vez determinado el protocolo de sembrado, establecimiento y fijación de células de la línea SKBR-3 en Lexan, se estudió la formación de improntas empleando tinción con hematoxilina a tiempos de 5 o 15 min, además de la evaluación de un grupo control sin tinción. Por otra parte, distintas muestras generadas fueron expuestas a radiación UV-C a diferentes tiempos: 2, 5, 15, 30, 60 y 120 min, empleando una lámpara de 15 W con una longitud de onda de 254 nm (G15T8, General Electric). Las muestras se expusieron a un campo homogéneo con una radiancia promedio de $(6,1 \pm 0,2) \text{ mW cm}^{-2}$ (radiómetro marca International Light Technologies modelo ILT77). Luego de la exposición, las células se despegaron de la superficie del detector empleando tripsina-EDTA (Sigma Life Science). A continuación, se aplicó un ataque químico con solución PEW (30 g de KOH, 80 g de alcohol etílico y 90 g de agua destilada) como agente químico a 70 °C, durante 2 o 4 min.

El uso de la hematoxilina como método de tinción antes de la irradiación con UV-C permitió que el núcleo pueda ser claramente distinguido respecto al citoplasma celular. Tal como se puede apreciar en la figura 5.7, y comparando la imagen 5.7a con las imágenes 5.7b y 5.7c, las improntas

reproducen los hallazgos en las imágenes originales de células con tinción, como por ejemplo el caso de células que poseen más de un núcleo. Siguiendo con la misma figura, se observa que el incremento del tiempo de ataque químico de 2 a 4 min presenta como resultado una mejora del contraste junto con la obtención de imágenes con menos artificios superficiales. Estos artificios se corresponden con imperfecciones en la superficie del detector originadas en su fabricación o bien en su manipulación y que son magnificadas por el ataque químico. Es por ello que para esta aplicación se requiere del empleo de láminas de Lexan de alta calidad óptica. Por otra parte, el incremento del tiempo de ataque químico permite obtener trazas nucleares más grandes haciendo que éstas sean más distinguibles respecto de las improntas celulares. Con respecto al tiempo de exposición a la radiación UV-C como parámetro en la formación de improntas, a medida que éste se incrementa, especialmente a 30 min o más, se puede apreciar una impronta más degradada, tal como puede ser observado en la figura 5.7, comprometiendo la capacidad de mejorar el contraste entre las estructuras celulares de interés. Por otra parte, tal como se abordará en la siguiente sección, la disminución del tiempo de exposición a UV-C es crucial para minimizar el efecto de desvanecimiento de trazas.

A partir de los resultados obtenidos, con el objetivo de establecer las condiciones óptimas que mejoren el contraste de las improntas y que permitan la visualización simultánea de trazas nucleares, y habiendo establecido el tiempo de ataque químico de 4 min, se estudió el efecto de la tinción con hematoxilina y de tiempos cortos de exposición a UV-C como parámetros en la obtención de improntas. En la figura 5.8 se muestra la comparación de los resultados obtenidos. La primera columna representa las improntas obtenidas sin la tinción con hematoxilina mientras que la segunda columna muestra la aplicación de hematoxilina por 15 min. Las filas en orden creciente establecen tiempos de exposición a la radiación UV-C de 2, 5 y 15 min, respectivamente. Se puede observar que sin aplicar la tinción con hematoxilina se logran improntas celulares de buena calidad incluso a 2 min de exposición, aunque el contraste y calidad de la imagen no es buena. El empleo de hematoxilina muestra una mejora en el contraste de las estructuras celulares en todos los tiempos de exposición a UV-C.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se estableció como protocolo el empleo de los siguientes parámetros de trabajo: tiempo de tinción con hematoxilina (t_{hem}) de 15 min, tiempo de exposición a la radiación UV-C ($t_{\text{UV-C}}$) de 5 min, solución de ataque químico PEW a 70°C y tiempo de ataque químico (t_{etch}) de 4 min.

5.2.3. Generación de trazas en Lexan y efecto de la exposición UV-C en la técnica propuesta

Para este análisis, en primera instancia se propuso estudiar el efecto de la exposición a la radiación UV-C en la cinética del ataque químico en Lexan. Por otra parte, se propuso estudiar el efecto del desvanecimiento de trazas en imágenes autorradiográficas con improntas celulares a partir del análisis cualitativo y cuantitativo de las densidades de trazas obtenidas bajo distintas condiciones experimentales. A partir de la ecuación 5.5, que relaciona el espesor de material removido, H , con la velocidad de bulk V_B durante el proceso de ataque químico a un tiempo fijo t , se estudió el efecto de la exposición a la radiación UV-C en la cinética del ataque químico en Lexan.

$$H = V_B \cdot t. \quad (5.5)$$