

# Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares

Instituto Dan Beninson

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN



***“Evaluación de los efectos biológicos obtenidos en la utilización de dispositivos Beta Enhancers como herramienta complementaria a la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer”***

**Bioq. Susana Isabel Nievas**

**Trabajo final de Especialización**

---

**Ezeiza, Buenos Aires, Argentina, 2018**

**TÍTULO:** Evaluación de los efectos biológicos obtenidos en la utilización de dispositivos *Beta Enhancers* como herramienta complementaria a la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer.

**AUTORA:** Bioq. Susana Isabel Nievas

**DIRECTORA:** Dra. María Alejandra Dagrosa

**Co-DIRECTOR:** Ing. Juan Manuel Longhino

**LUGAR DE REALIZACIÓN:** Instituto Dan Beninson, Universidad Nacional de San Martín.

**AÑO DE PRESENTACION:** 2018

**FIRMA DEL ESPECIALIZANDO:** \_\_\_\_\_

**FIRMA DE LA DIRECTORA:** \_\_\_\_\_

**FIRMA DEL Co-DIRECTOR:** \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos y Dedicatorias**

A la Directora de tesis Dra. María Alejandra Dagrosa y al co-Director de tesis Ing. Juan Manuel Longhino, por su ayuda y por ser mis guías para la realización de este trabajo.

A los directivos del Instituto Beninson y a todos los docentes, que impartieron sus conocimientos con dedicación y profesionalidad y a todo el personal auxiliar que nos hizo más amena la cursada.

Al Dr. Gustavo Santa Cruz, por darme la posibilidad de realizar este posgrado. A mis compañeros de cursada, por el gran grupo formado. A Graciela, Mariana y Ricardo, por los cafecitos compartidos y a su apoyo para terminar la cursada.

A mi familia, mi esposo Flavio, por ser mi ejemplo de constancia y a mis hijos Augusto y Esteban, por el aguante de pasar fines de semana en casa porque mamá tenía que estudiar. Gracias por su paciencia infinita.

Dedicado a la memoria del Dr. Rómulo Cabrini, quien me enseñó a mirar más allá de los preparados histológicos.

A mi familia que aunque está lejos, siempre se alegra con mis logros: mi papá, mis hermanos, cuñados y sobrinos.

A la memoria de mi madre.

***"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad  
y la energía atómica: la voluntad"***

Albert Einstein

# Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
<b>1.1. TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO</b>	<b>6</b>
<b>1.2. COMPUESTOS BORADOS</b>	<b>7</b>
<b>1.3. FACILIDAD DE BNCT EN RA-6</b>	<b>9</b>
<b>1.4. CARACTERÍSTICAS DOSIMÉTRICAS Y RADIOBIOLÓGICAS DE BNCT</b>	<b>9</b>
<b>1.5. ESTUDIOS CLÍNICOS EN ARGENTINA</b>	<b>11</b>
<b>1.6. BETA ENHANCERS Y SUS CARACTERÍSTICAS RADIATIVAS</b>	<b>11</b>
<b>1.7. LA AUTOFAGIA</b>	<b>15</b>
<b>1.8. LAS CÉLULAS MADRE EN EL CÁNCER (CSC)</b>	<b>17</b>
<b>1.9. ESTUDIOS PREVIOS</b>	<b>23</b>
<b>2. OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1 LÍNEA CELULAR</b>	<b>26</b>
<b>3.2 MODELO ANIMAL</b>	<b>26</b>
<b>3.3 OBTENCIÓN DE LOS TUMORES</b>	<b>27</b>
<b>3.4 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE BPA</b>	<b>28</b>
<b>3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL EN RA-6</b>	<b>28</b>
<b>3.6 DISPOSITIVO DE IRRADIACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>3.7 CARACTERÍSTICAS DE LOS DISPOSITIVOS BE</b>	<b>31</b>

<b>3.8</b>	<b><i>DOSIMETRÍA</i></b>	<b>33</b>
<b>3.9</b>	<b><i>EVALUACIÓN DE LOS ANIMALES POST IRRADIACIÓN</i></b>	<b>34</b>
<b>3.10</b>	<b><i>HISTOLOGÍA</i></b>	<b>35</b>
<b>3.11</b>	<b><i>INMUNOHISTOQUÍMICA</i></b>	<b>36</b>
<b>3.12</b>	<b><i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i></b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b><i>RADIOTOXICIDAD</i></b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b><i>CRECIMIENTO TUMORAL</i></b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b><i>ESTUDIOS HISTOLÓGICOS</i></b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b><i>ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS</i></b>	<b>45</b>
<b>4.5.</b>	<b>DOSIMETRÍA</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>55</b>

# 1. Introducción

## 1.1. *Terapia por captura neutrónica en Boro*

La terapia por captura neutrónica en Boro (BNCT) es una terapia binaria que ha sido utilizada principalmente para tratar distintos tipos de cáncer, debido a que puede atacar selectivamente el tejido neoplásico. Su acción se basa en la reacción nuclear que ocurre cuando el isótopo estable  $^{10}\text{B}$  es irradiado con neutrones térmicos ( $n_{\text{th}}$ ) de baja energía ( $<0.4$  eV) (Figura 1). Tras la captura del neutrón térmico, el átomo de boro se fisiona inmediatamente generando un núcleo de Litio ( $^7\text{Li}$ ) y una partícula alfa ( $^4\text{He}$ ), ambos de alta transferencia lineal de energía (LET) y con un alcance menor al diámetro de una célula (Taylor H, 1935), (Fairchild RG, 1986). Por esta razón, es necesaria la localización específica de dicho átomo en el tejido a destruir. El éxito de esta terapia para el control local del tumor dependería en primera instancia de la habilidad del compuesto de boro utilizado para concentrarse selectivamente en el tumor y de la dosis física total absorbida por las células tumorales.

Si bien en la comparación el  $^{10}\text{B}$  es el elemento que mayor porcentaje de neutrones captura, el nitrógeno y el hidrogeno que componen el tejido humano también son capaces de capturar neutrones y producir radiaciones relevantes mediante las reacciones  $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{H}$  y  $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ . A pesar de que la sección eficaz de captura de estos elementos es pequeña respecto a la del boro, la presencia de estos elementos en altas concentraciones induce una inevitable dosis en todos los tejidos expuestos a los neutrones. La dosis máxima que puede ser entregada a un tumor por lo tanto estará limitada por la tolerancia de los tejidos normales circundantes a la radiación secundaria (protones y rayos gamma) que resulta de la reacción de captura en nitrógeno e hidrógeno (Barth RF, 1992) (Barth R, 2012), más la dosis derivada de contaminaciones en el haz primario de neutrones.

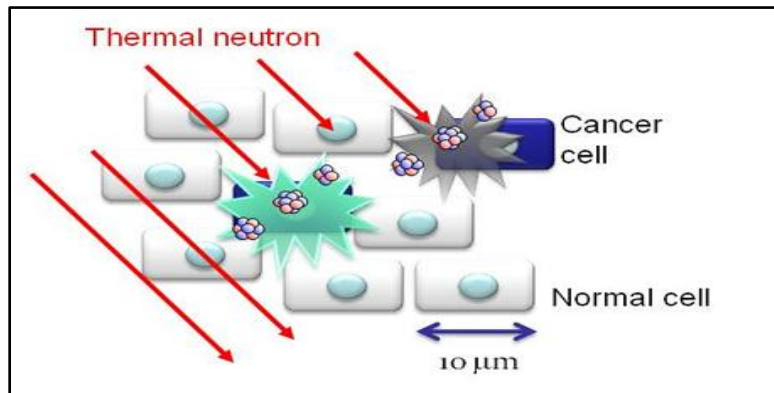


Figura 1. Reacción de captura neutrónica en boro. (<http://www.med.kyoto-u.ac.jp/en/wp-content/uploads/sites/2/2013/07/5621deba8a18b839c7a4321764bb05e8.jpg>)

## 1.2. Compuestos borados

La efectividad de la terapia por captura neutrónica en boro requiere, como se ha visto, la acumulación selectiva de boro en el tumor respecto a los tejidos normales circundantes. Tras el fracaso de los primeros ensayos clínicos de BNCT usando bórax o pentaborato de sodio, en la década de 1960 se inició la búsqueda de nuevos compuestos borados. Para que la terapia resulte efectiva, los compuestos borados utilizados deben reunir una serie de características específicas (Barth, 1998):

- Concentrarse selectivamente en las células tumorales, preferentemente dentro o cerca del núcleo, alcanzando una concentración intracelular mínima de  $10^9$  átomos de  $^{10}\text{B}$  por célula o  $20\text{-}35 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$  de tejido.
- Lograr una relación en la concentración entre el tumor y el tejido normal/sangre igual o superior a 3.
- Poseer una cinética apropiada, esto significa que deben ser eliminados rápidamente de la sangre y los tejidos normales pero persistir en el tumor durante la aplicación de la terapia.
- No ser tóxicos al alcanzar las concentraciones tumorales necesarias.

De la totalidad de compuestos borados que han sido sintetizados puede distinguirse la p-dihidroxiborofenilalanina (BPA, Figura 2), sintetizado a fines de 1950 (Snyder H, 1958), (Soloway A, 1967). Este compuesto se caracterizó por tener baja toxicidad, una mayor permanencia en los tumores en comparación a otras moléculas relacionadas y una relación en la concentración entre el tumor y la sangre mayor a uno. Cuando se sintetizó el BPA se buscaba un compuesto que se acumulara en los gliomas y no cruzara la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el cerebro normal (Coderre JA, 1999) pero, al penetrar la BHE, su utilización fue descartada. Esto fue así hasta que Mishima y colaboradores, tomando ventaja de su estructura similar a los precursores de melanina, iniciaron un programa de investigación BNCT para melanoma (Mishima Y, 1989). Se ha demostrado que la captación preferencial de BPA está simplemente relacionada con la elevada tasa de transporte de aminoácidos a través de la membrana celular de las células tumorales que conforman el tumor (Wittig A, 2000).

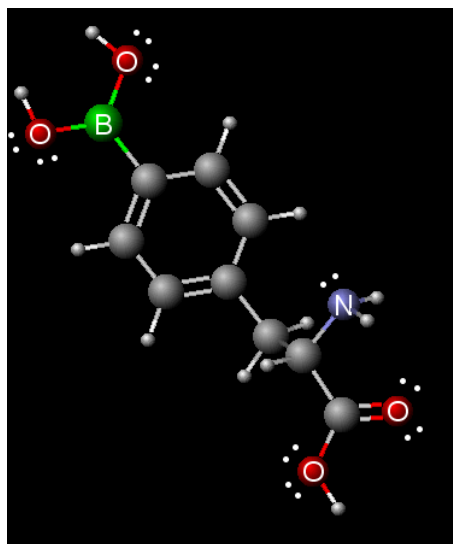


Figura 2. Estructura química de 4-boro-L-fenilalanina (BPA)

### 1.3. Facilidad de BNCT en RA-6

En nuestro país, se ha desarrollado una sala de tratamiento en el Reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche (CNEA) ([www.cab.cnea.gov.ar](http://www.cab.cnea.gov.ar), 2012). El haz de neutrones desarrollado es llamado hipertérmico, siendo éste una combinación de un espectro de neutrones térmicos y epitérmicos, diseñado para el tratamiento de tumores superficiales y de poca profundidad (Figura 3), ya que su máximo de flujo de neutrones térmicos (y por ende la dosis por  $^{10}\text{B}$ ) se encuentra a 1 cm de profundidad.

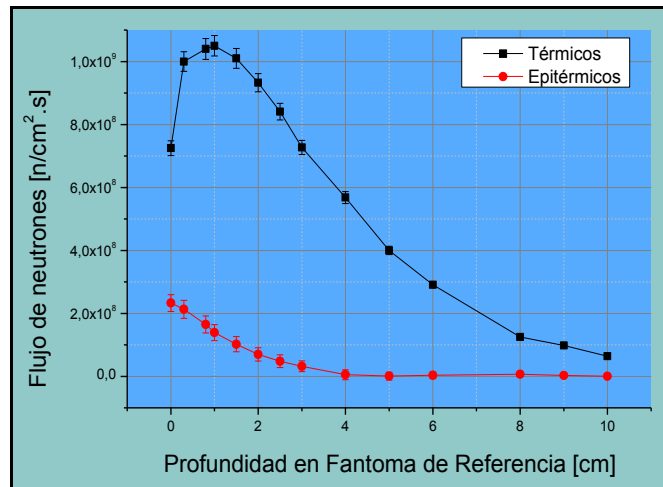


Figura 3. Comportamiento del flujo de neutrones térmicos y epitérmicos en profundidad de un fantoma estándar, similar al comportamiento en los primeros centímetros de profundidad de un paciente.

### 1.4. Características dosimétricas y radiobiológicas de BNCT

Los neutrones térmicos, necesarios para iniciar la reacción  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ , son atenuados exponencialmente en función de la profundidad del tejido que penetran, principalmente por la captura por parte de átomos de hidrógeno. Con el fin de superar esta limitación se desarrollaron haces de neutrones epitérmicos, es

decir de mayor energía (0,5-10.000 eV), los cuales al ser atenuados por colisiones contra los átomos del tejido, generan neutrones térmicos ( $n_{th}$ ) a mayor profundidad. Gracias a este avance en la tecnología de los reactores utilizados, fue posible aplicar la terapia a mayores profundidades protegiendo tejidos normales superficiales.

La transferencia lineal de energía (LET) es una medida de la densidad de ionizaciones producidas por la radiación al penetrar los tejidos. Puede decirse que a mayor LET aumenta la cantidad y la gravedad de las lesiones provocadas. La reacción de BNCT genera partículas de muy alto LET, pero por otra parte, la interacción del haz neutrónico con los núcleos de otros elementos del material biológico entrega una radiación de fondo inespecífica compuesta por componentes de alto y bajo LET. Todos estos componentes pueden ser resumidos en:

- Partículas  $\alpha$  (1,47 MeV, rango de alcance en tejido de 9  $\mu\text{m}$ ) y núcleos de  ${}^7\text{Li}$  (0,84 MeV, rango de alcance en tejido de 5  $\mu\text{m}$ ) generados por la reacción de captura neutrónica en  ${}^{10}\text{B}$ .
- Componente gamma del haz neutrónico (radiación de bajo LET).
- Rayos gamma (478 KeV de energía) producidos por la captura de  $n_{th}$  en el hidrógeno presente en los tejidos, en la reacción  ${}^1\text{H}(n,\gamma){}^2\text{H}$ .
- Protones de alto LET (590 KeV) producidos por la captura de  $n_{th}$  en nitrógeno, en la reacción  ${}^{14}\text{N}(n,p){}^{14}\text{C}$ .
- Protones recoil de alto LET generados por la colisión de neutrones rápidos (de energía cinética mayor a 10 KeV) del haz epitérmico con los núcleos de hidrógeno de los tejidos en la reacción  ${}^1\text{H}(n,n')p$ . (Coderre JA, 1999) .

La dosis entregada a los tejidos durante BNCT consiste entonces en los productos de la reacción  ${}^{10}\text{B}(n, \alpha){}^7\text{Li}$  sumada a una concomitante e inevitable radiación inespecífica, relacionada directamente a la duración de la exposición en el reactor e independiente de la concentración de boro en los tejidos. Por lo tanto, la dosimetría en BNCT es compleja, debiéndose buscar un balance entre la

captura neutrónica en boro en las células a eliminar y la tolerancia de los tejidos normales atravesados por el haz de neutrones utilizado. (Goorley JT, 2002).

### *1.5. Estudios Clínicos en Argentina*

En la Argentina se comenzó un protocolo de Fase I y II para tratar pacientes con melanomas cutáneos con la finalidad de evaluar eficacia y toxicidad. Para ello se ha desarrollado una sala de tratamiento en el Reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche (CAB-CNEA), ([www.cab.cnea.gov.ar](http://www.cab.cnea.gov.ar), 2012). Desde octubre de 2003 a junio de 2007 se han tratado en el haz de neutrones del RA-6 en el Centro Atómico Bariloche por BNCT siete pacientes con melanoma nodular en extremidades. Todos los pacientes tratados han mostrado un retraso en el crecimiento del tumor y ninguno ha exhibido efectos tóxicos en piel normal. Un paciente el cual fue tratado con dosis de radiación más altas mostró una regresión completa del tumor y no se han observado nuevos nódulos en los campos aplicados, en los últimos dos años post tratamiento, (Menéndez P R, 2009). Las irradiaciones fueron paradas por unos años con el propósito de trabajar en la adaptación del haz y la facilidad para otro tipo de localizaciones tumorales. En 2015, otro paciente se trató con la nueva configuración del haz de neutrones de dicho reactor, presentando una respuesta parcial al tratamiento a junio de 2017, encontrándose aún en evaluación.

### *1.6. Beta enhancers y sus características radiactivas*

Debido a las características hipertérmicas del haz de neutrones del RA-6 la dosis máxima por BNCT no está en la superficie del tumor sino a unos centímetros de profundidad, así, la dosis total absorbida en la superficie y en los primeros milímetros de la piel es menor respecto de la dosis máxima absorbida en profundidad. Para poder corregir estas variaciones de dosis, se implementó el

uso de dispositivos que permiten aumentar la dosis superficial, pero sin interferir en el tratamiento de BNCT. Algunos materiales como el rodio, la plata y el indio tienen una alta sección eficaz de captura neutrónica, productos de activación de rápido decaimiento y emisión de partículas beta de alta energía. Como la radiación beta tiene un corto rango de penetración en los tejidos estos dispositivos denominados Beta Enhancers (BE) pueden ser usados para compensar el gradiente de dosis superficial BNCT o incluso para incrementarla significativamente. En nuestros estudios previos demostramos que ratones *nude* portadores de tumores superficiales e irradiados por BNCT con el agregado de dispositivos BE de rodio no mostraron signos de radiotoxicidad. También mostramos su efectividad en controlar el crecimiento tumoral y los estudios histológicos revelaron mayor daño tumoral. (Nievas S. B. E., 2015).

*Tabla 1. Algunas características de los BE.*

<b>Material</b>	<b>Número atómico</b>	<b>Masa atómica</b>
<b>rodio (Rh)</b>	<b>45</b>	<b>102.905 uma</b>
<b>plata (Ag)</b>	<b>47</b>	<b>107.868 uma</b>
<b>indio (In)</b>	<b>49</b>	<b>114.818 uma</b>

Las características isotópicas de los BE utilizados que tienen la utilidad esperada están relacionadas a los isótopos estables de rodio, la plata y el indio y los productos de desintegración  $\beta^-$  de sus estados inestables luego de la captura neutrónica en los mismos con neutrones.

El  $^{103}\text{Rh}$  (abundancia 100%), al capturar un neutrón, tiene una baja probabilidad de que se convierta en  $^{104\text{m}}\text{Rh}$ , cuya vida media es de 4,4 min y que por transición isomérica (IT de sus siglas en inglés) tiene muy alta probabilidad de

pasar a  $^{104}\text{Rh}$  que decae por  $\beta^-$  a  $^{104}\text{Pd}$  (paladio 104) estable. Además, el  $^{104}\text{Rh}$ , obtenido tanto del decaimiento del  $^{104\text{m}}\text{Rh}$  como el directamente producido por captura en  $^{103}\text{Rh}$ , tiene un periodo de semidesintegración de 42 segundos y decae con altísima probabilidad a  $^{104}\text{Pd}$  estable al emitir una partícula  $\beta^-$  de 2,5 MeV de energía máxima y 995 keV de energía más probable, por lo que esta es la partícula secundaria cargada de interés en el uso de rodio como BE.

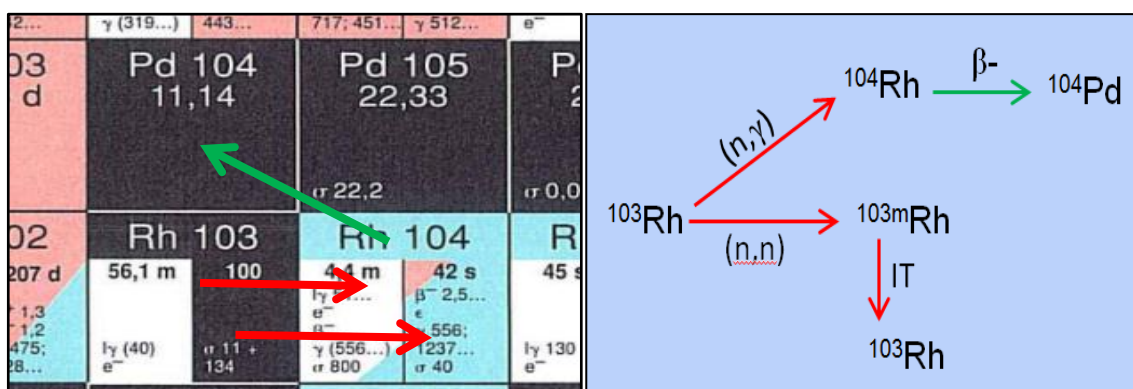


Figura 4. Esquema de las reacciones de interés inducidas en  $^{103}\text{Rh}$  por captura neutrónica. (Blachot, Nuclear Data Sheets for A = 104\*, 2007)

La plata (Ag) tiene dos isótopos estables:  $^{107}\text{Ag}$  y  $^{109}\text{Ag}$ , con abundancias de 52% y 48% respectivamente. La  $^{107}\text{Ag}$  al capturar un neutrón se transforma en  $^{108\text{m}}\text{Ag}$  de 438 años de vida media, por lo que se descarta la contribución a la dosis durante un tratamiento BNCT que se obtendría de su transformación por IT a  $^{108}\text{Ag}$  y el decaimiento  $\beta^-$  de este último. Por su parte, la  $^{109}\text{Ag}$  por captura neutrónica, tiene alta probabilidad de transformarse en  $^{110}\text{Ag}$ , con vida media de 24,6 segundos, que decae con altísima probabilidad a  $^{110}\text{Cd}$  (cadmio 110) emitiendo una partícula  $\beta^-$  de 2,9 MeV de energía máxima y 1,2 MeV de energía más probable.

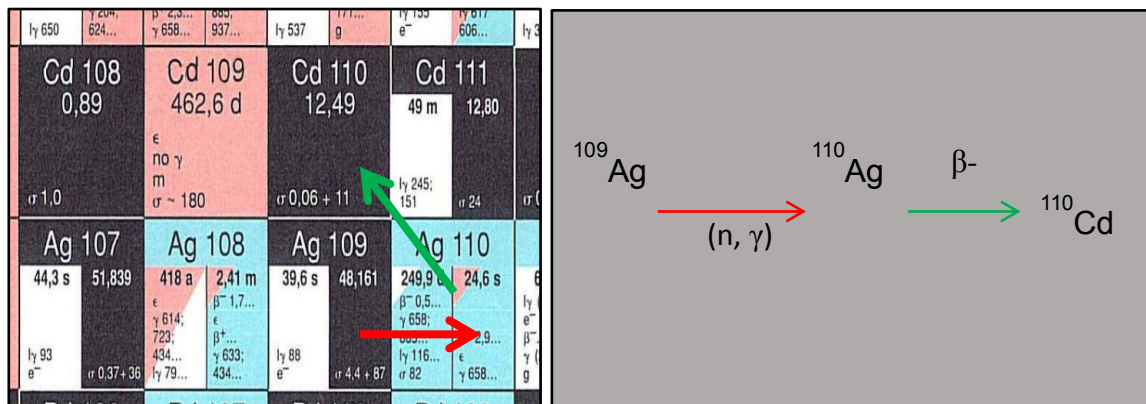


Figura 5. Esquema de las reacciones de interés inducidas en  $^{109}\text{Ag}$  por captura neutrónica. (GÜrdal G, 2012)

El indio (In) tiene dos isótopos que son de interés para su uso como BE; uno es su isótopo estable, el  $^{113}\text{In}$  con una abundancia menor al 5% y su isótopo cuasi estable, el  $^{115}\text{In}$ , con una abundancia mayor al 95% y un período de  $4,4 \times 10^{14}$  años.

El  $^{113}\text{In}$  por captura neutrónica pasa a  $^{114}\text{In}$  que decae con altísima probabilidad a  $^{114}\text{Sn}$  (estaño 114) estable en 71,9 segundos de periodo, al emitir una partícula  $\beta^-$  de 2 MeV de energía máxima y 780 keV de energía más probable. Por otro lado, el  $^{115}\text{In}$  al capturar un neutrón puede pasar a dos estados, uno de ellos metaestable:  $^{116\text{m}}\text{In}$  de 54 minutos de vida media; e  $^{116}\text{In}$  de 14,1 segundos de período. Además hay un segundo estado metaestable de 2,2 segundos de vida media que por IT pasa al estado metaestable de 54 minutos. Éste a su vez, decae a  $^{116}\text{Sn}$  estable por emisión de radiación  $\beta^-$  de 1 MeV de energía máxima y 350 keV de energía más probable con un 54% de probabilidad, además puede emitir una partícula  $\beta^-$  de 0,9 MeV de energía máxima y 300 keV de energía más probable con un 32% de probabilidad y también puede emitir rayos gamma ( $\gamma$ ) de 1,3 MeV (85%) y 1,1 MeV (60%). El  $^{116}\text{In}$  decae con un periodo de 14 s y con altísima probabilidad a  $^{116}\text{Sn}$  estable, emitiendo una partícula  $\beta^-$  de 3,3 MeV de energía máxima y 1,3 MeV de energía más probable.

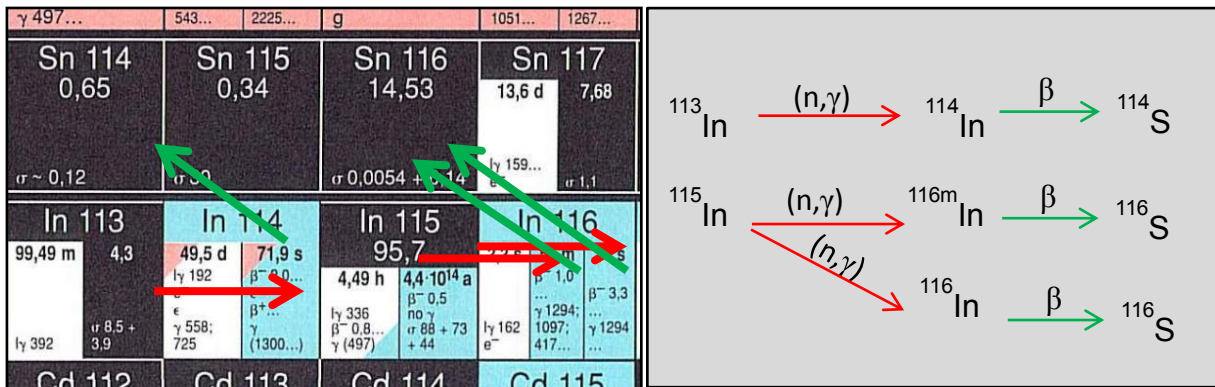


Figura 6. Esquema de las reacciones de interés inducidas en  $^{113}\text{In}$  e  $^{115}\text{In}$  por captura neutrónica. (Blachot, Nuclear Data Sheets for A = 114, 2012); (Blachot, 2010)

### 1.7. La Autofagia

La autofagia es un proceso altamente conservado de degradación celular en el que porciones de citoplasma y organelas se secuestran en una vesícula de doble membrana, el autofagosoma, y se introducen en una organela degradante, la vacuola-lisosoma, para descomponer y eventualmente reciclar las macromoléculas resultantes (Figura 7). Este proceso alivia la célula de varias condiciones de estrés. La autofagia juega un papel crítico durante el desarrollo celular y la diferenciación, funciona en la supresión tumoral y puede estar relacionada con la extensión de la vida. La autofagia también tiene diversos papeles en la inmunidad innata y adaptativa, como la resistencia a la invasión de patógenos. Se ha logrado un progreso sustancial en la identificación de muchos genes relacionados con la autofagia (ATG) que son esenciales para impulsar este proceso celular, incluidos los tipos de autofagia tanto selectivos como no selectivos. (Klionsky, 2009).

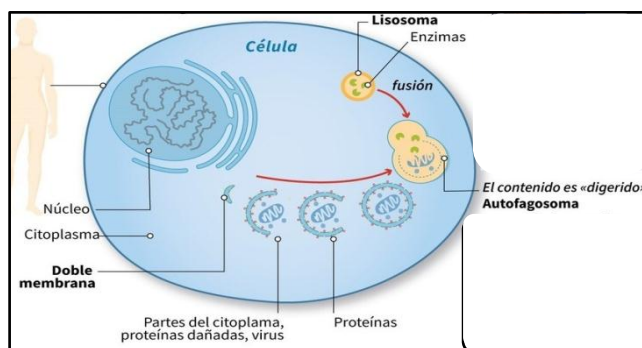


Figura 7. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2016/advanced-medicineprize2016.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2016/advanced-medicineprize2016.pdf)

En la mayoría de las células, la autofagia ocurre a niveles basales bajos, pero a menudo se induce para conferir resistencia al estrés y mantener la supervivencia celular en condiciones adversas, como una respuesta citoprotectora esencial. Las mutaciones en los componentes de la maquinaria autofágica están asociadas a una serie de trastornos humanos. El mal funcionamiento de la autofagia está implicado en la fisiopatología, como las miocardiopatías, las enfermedades infecciosas, la enfermedad de Crohn y los trastornos neurodegenerativos, incluidas las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson. (Helin Vakifahmetoglu-Norberg, 2015).

### 1.7.1. *El doble papel de la autofagia en el cáncer*

La autofagia, un mecanismo crucial en respuesta al estrés extra o intracelular, puede resultar en la supervivencia celular bajo ciertas circunstancias. Sin embargo, la sobreactivación de la autofagia puede conducir a la muerte celular autofágica en algunas condiciones difíciles, como la escasez nutricional persistente o la radiación ionizante, (Jun-jie Liu, 2011). Hasta el momento no se encontró en bibliografía la autofagia como mecanismo de muerte inducida por BNCT.

## 1.8. *Las células madre en el cáncer (CSC)*

### 1.8.1 *Las células madre normales*

La mayoría de los tejidos adultos se mantienen durante la vida del huésped mediante células madre normales que experimentan expansión y diferenciación para producir los elementos funcionales del órgano. A través del estricto proceso de autorrenovación, las células madre pueden funcionar a lo largo de la vida del huésped. Las restricciones genéticas sobre la autorrenovación restringen la expansión de las células madre en los tejidos normales. Las fallas en la regulación de la autorrenovación probablemente sean un evento clave en el desarrollo del cáncer, como lo demuestra el hecho de que varias vías implicadas en la carcinogénesis también desempeñan un papel clave en las decisiones de autorrenovación de células madre normales. Por lo tanto, los tumores malignos se pueden ver como un órgano anormal en el que una población minoritaria de células cancerígenas tumorigénicas ha escapado a las restricciones normales sobre la autorrenovación dando lugar a células cancerosas anormalmente diferenciadas que han perdido la capacidad de formar tumores.

Las células madre de tejido normal se definen por tres propiedades comunes: en primer lugar, la presencia de una amplia capacidad de autorrenovación que permite el mantenimiento del conjunto de células madre indiferenciadas a lo largo de la vida del huésped; segundo, regulación estricta del número de células madre; y tercero, la capacidad de experimentar una amplia gama de eventos de diferenciación para reconstituir clonalmente todos los elementos funcionales dentro del tejido. Es importante destacar que las células madre en cada tejido difieren con respecto a su capacidad intrínseca de auto-renovarse y diferenciarse en tipos particulares de células maduras, (Al-Hajj M, 2004).

#### 1.8.4 *Las células madre tumorales*

A lo largo de los años, se ha ido cambiando la concepción que se tenía sobre el cáncer en general y los tumores sólidos en particular, por la cual se concebían como masas celulares que crecían exponencialmente, sin orden ni control y de manera clonal. Los tumores sólidos presentan una compleja distribución celular dentro de la cual aparecen células capaces de generar vasos sanguíneos, células con distinta capacidad proliferativa o distinta resistencia a drogas. Dentro de estas poblaciones celulares, hay una que comparte una serie de características que las hace únicas como nicho que mantiene la supervivencia del tumor, son las células madre tumorales o CSCs (del inglés “cancer stem cells”).

Las CSCs pueden ser definidas como una subpoblación de células dentro del complejo entramado celular que aparece en los tumores sólidos. Presentan la capacidad exclusiva de autorrenovarse y generar cualquiera subpoblación celular del tumor, característica que recuerda mucho a la encontrada en las células madre normales, de ahí su denominación de CSCs. Estas células existen en la mayor parte de los tumores y son las responsables de su iniciación, progresión, metástasis y supervivencia (Al-Hajj M, 2004).

En un primer momento se pensaba que son las células a partir de las cuales se genera la masa tumoral, que crece y se desarrolla hasta formar el tumor. Por eso, con los primeros indicios de la existencia de estas células con características tan distintivas, se les denominó células madre iniciadoras de tumores (Bonnet D, 1997).

Las CSCs presentan tres capacidades principales que las diferencian de las células diferenciadas: la capacidad de autorenovación, de pluripotencialidad y de diferenciación. Son capaces de dividirse y generar una progenie con características idénticas a las células parentales manteniendo el pool de células madres en un número constante; pueden generar todas las diferentes estirpes

celulares en un medio que tenga los estímulos apropiados y otras pueden diferenciarse, dando origen a células con características morfológicas y funcionales diferentes a la célula madre que les dio origen. Estas capacidades se han visto asociadas a una gran resistencia a fármacos antitumorales. De esta manera, el modelo CSC explica la formación de un tumor de la siguiente manera: dentro del tumor se forma un nicho de CSCs que es el que mantiene su integridad, es capaz de generar los distintos grupos de células encontrados en un tumor y lidera su reaparición tras los tratamientos antitumorales (Huang E, 2008). Sin embargo, aún está por determinar la cantidad de células con estas características que permanecen en un tumor y su papel en el mismo.

En cuanto al origen de las CSCs, algunos autores plantean la posibilidad de que algunas células madre existentes en los tejidos mutan y provocan su aparición. Estas células utilizan la capacidad de autorrenovación que ya tenían y mutaciones oncogénicas provocan su transición hacia CSCs. Otros autores en cambio, postulan que las CSCs deben de ser producidas por mutaciones en células progenitoras o células diferenciadas tumorales, es decir, en células que han perdido la capacidad de autorenovación. Mutaciones que reviertan esta diferenciación y les proporcionen de nuevo esta capacidad las convertirá en CSCs (Magee, 2012). Ambas concepciones están representadas en la Figura 8.

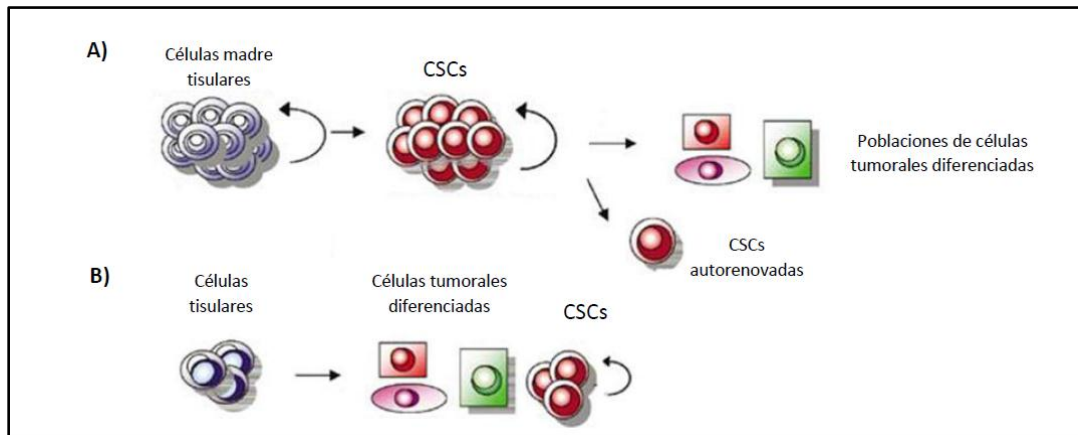


Figura 8. Representación de los modelos propuestos de formación de CSCs. A) Modelo célula madre: mutaciones oncogénicas en células madre con capacidad de autorrenovación presentes en el tejido originan la población de CSCs. B) Modelo de evolución clonal: mutaciones en células tumorales normales que reviertan el estado de diferenciación reactivando su capacidad de autorrenovación, originan la formación de CSCs.

Se ha observado una gran variabilidad en cuanto a la presencia de marcadores de superficie que puedan ser útiles para identificar las CSCs, incluso en pacientes con el mismo tipo y desarrollo de cáncer pueden aparecer distintos marcadores de superficie, remarcando de nuevo la importancia de un análisis funcional de dichas células que las definan como realmente células madre (Taussig DC., 2008).

En el carcinoma colorrectal, varios marcadores, incluidos CD133 y CD166, se utilizan comúnmente para la identificación y aislamiento de CSCs. Además, CD133 y CD166, entre otros, podrían tener funciones clínicas en la predicción de etapas patológicas, recurrencia del cáncer, resistencia a la terapia y supervivencia de los pacientes con carcinoma colorrectal. (Wahab S.R.M., 2017).

#### *1.8.4 Las CSCs y su resistencia a las terapias*

Las CSCs se asocian a múltiples mecanismos de resistencia, incluyendo quimio (Yi-Shiuan Liu, 2013) y radioresistencia (Krause M, 2017), lo que las convierte en una población que promueve la reaparición de la enfermedad, progresión y metástasis.

Las terapias actuales presentan una actividad citotóxica general que elimina a la mayor parte de las células tumorales pero muchas terapias no son efectivas totalmente y algunos tumores reaparecen, a veces incluso con mayor patogenicidad. Si se demuestra la importancia de las células madre en esta reaparición, las nuevas terapias deberían dirigirse específicamente contra las CSCs en un intento de impedir la resistencia a las mismas y la regeneración del tumor. Hasta el momento no existen datos que relacionen la terapia BNCT con las CSCs, por lo que resulta de utilidad abarcar este estudio.

#### *1.8.4 Antígenos de superficie CD133 y CD166*

La identificación de CSCs puede ser llevado a cabo con técnicas basadas en los distintos marcadores de superficie de las CSCs, asociados con la renovación celular y la resistencia a fármacos. En concreto, para las CSCs asociadas al carcinoma colorectal o CR-CSCs (del inglés “colorectal-cancer stem cells”) se han encontrado, entre otros, como candidatos los marcadores de superficie CD133 y CD166.

El CD133 fue identificado por primera vez en 1997 en las células madre hematopoyéticas (Yin AH, 1997). También conocida como prominina-1 o AC133, CD133 es una proteína transmembrana de peso 120 kDa localizada principalmente a nivel de protuberancias de la membrana plasmática. (Figura 9) Varios estudios inmunohistoquímicos muestran que CD133 se localiza exclusivamente en la membrana luminal de las glándulas cancerosas (Kojima M,

2008). Aun así, se desconoce por completo la ruta metabólica o de señalización en la que está implicado CD133. Estudios in vivo con ratones demostraron que la única población capaz de desarrollar tumores era la población CD133+ y además dicha población era mucho más resistente al tratamiento con quimioterapia, por lo que se propuso que CD133 podría ser un buen marcador de células madre tumorales (O'Brien CA, 2007).

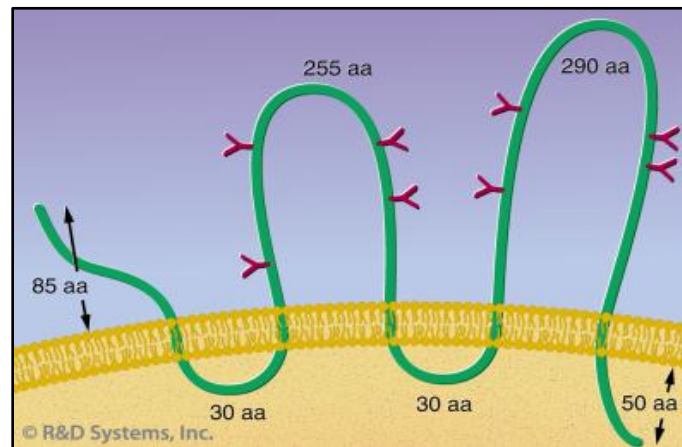


Figura 9. Esquema del modelo estructural del antígeno CD133. Esta glicoproteína tiene 5 dominios transmembrana, un grupo  $-NH_2$  extracelular y un grupo  $-COOH$  citoplasmático, (Miraglia S, 1997).

El CD166 (ALCAM: activated leukocyte cell adhesion molecule), o molécula de adhesión de leucocitos activados, es una molécula de adhesión perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Patel y cols., en 1995 caracterizaron una glicoproteína de superficie de 100 kDa con cinco dominios inmunoglobulina, con dos dominios amino terminales variables y tres dominios carboxilo terminales constantes, (Patel D.D., 1995). La cadena polipeptídica de CD166 es relativamente neutra y sin carga, con una corta cola citoplasmática sin motivos de señalización. (Lehmann, 1989), (Figura 10). El CD166 está asociado con la activación de células T mediante su receptor CD6 (Resnick, 1994); pero su utilidad potencial como marcador de CSCs también está atrayendo interés. En cáncer de colón, la expresión de CD166 normalmente está aumentada. Lo que sí

parece significativo es que su expresión en la membrana plasmática de las células del tumor está relacionada con una menor supervivencia del paciente (Weichert, 2004).

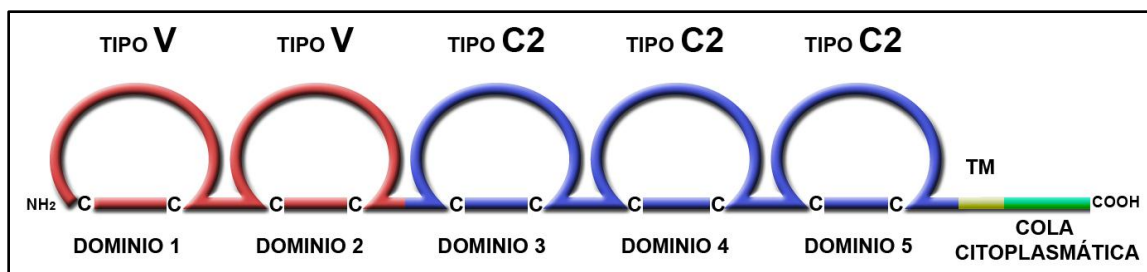


Figura 10. Estructura de CD166. Se muestran los dominios tipo inmunoglobulina. C indica los residuos de cisteína que forman el puente disulfuro en cada dominio. TM: Dominio transmembrana

### 1.9. Estudios previos

Los estudios preclínicos realizados en nuestro laboratorio usando BPA como compuesto portados de boro en el modelo de cáncer superficial en ratones NIH *nude* demostraron la eficacia de BNCT para controlar el crecimiento tumoral. (Dagrosa MA, 2007)

Más recientemente, con el objetivo de aumentar la dosis física total absorbida por el tumor, evaluamos dispositivos de rodio emisores de radiación beta. Estos estudios preliminares demostraron que los BE de rodio serían eficaces como herramienta complementaria a la terapia. Observamos mayores efectos de daño en los animales tratados con el agregado de hojuelas que en los grupos irradiados solo con el haz de neutrones y con el haz de neutrones más BPA únicamente. Tampoco en estos estudios se observaron evidencias de toxicidad asociada a los dispositivos BE. (Nieves S. B. E., 2015). Como una continuación de estos estudios con resultados alentadores, se comenzaron a evaluar otros dispositivos emisores de radiación beta (plata e indio). La comparación entre los

distintos materiales permitirá realizar la selección más adecuada para el tratamiento de este tipo de tumor.

## 2. Objetivos del trabajo

El objetivo general de este trabajo fue realizar un estudio comparativo entre distintos dispositivos BE (rodio, plata e indio) como herramienta complementaria de BNCT para el tratamiento del cáncer superficial en un modelo animal.

### 2.1. *Objetivos específicos*

Con este objetivo en mente, luego del diseño experimental y tratamiento de los animales se realizaron diferentes estudios enmarcados dentro de los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la radiotoxicidad de los dispositivos utilizados (BE de rodio, de plata y de indio).
2. Evaluar efecto de cada uno de los tratamientos sobre el crecimiento tumoral.
3. Analizar en muestras tumorales individuales diferentes parámetros histológicos indicadores de daño celular (% de áreas viables y necróticas, número de células en mitosis, número de vacuolas).
4. Estudiar la presencia y permanencia de células madre cancerosas (CSC) en los tumores para cada uno de los tratamientos a través de la detección de las mismas por distintos antígenos de superficie (CD133, CD166).

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 *Línea celular*

Se utilizó para estos estudios la línea celular de cáncer de colon humano HT-29 (ATCC® HTB-38) proveniente de un adenocarcinoma colorectal aislado de una paciente de 44 años (Fogh, 1975), gentilmente cedida por los Drs. G. Juillard, UCLA, USA y J. Fagin, Cincinnati, USA) Esta línea celular fue mantenida en medio de cultivo RPMI 164 suplementado con 154 mg/l de piruvato de sodio, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, con 10 % de suero fetal bovino, estreptomicina (100mg/ml) y penicilina (100UI/ml), a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación.

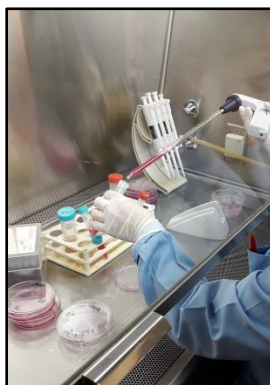


Figura 11. Cultivo y amplificación de la línea tumoral HT-29 en flujo laminar.

#### 3.2 *Modelo animal*

Se utilizaron ratones de la cepa NIH *nude* de 8 a 10 semanas de vida, de peso corporal entre 25 y 30 gramos, alimentados y mantenidos en condiciones óptimas para su crecimiento. Estos animales fueron criados en el bioterio de la CNEA y mantenidos en jaulas de acero inoxidable en flujo laminar, con libre acceso al agua de bebida y a los alimentos balanceados libres de patógenos. El bioterio está provisto de ciclos de luz-oscuridad y temperatura controlados como se indica en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, (Guide for the Care

and Use of Laboratory Animals, 2011).

Todos los protocolos de cuidado, mantenimiento y experimentación fueron aprobados por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de CNEA.



*Figura 12. Ratón nude implantado en forma subcutánea en el flanco posterior derecho con  $1,5 \times 10^6$  células de la línea HT-29, a los 15 días post inyección*

### **3.3 Obtención de los Tumores**

Los ratones fueron inyectados en forma subcutánea en el flanco posterior derecho con  $1,5 \times 10^6$  de células de la línea HT-29, resuspendidas en 100 $\mu$ l de buffer PBS 1X. A los 15 días de inoculados aproximadamente, los animales presentaron tumores de entre 150-200 mm<sup>3</sup>, (Figura 12). Los animales se utilizaron para realizar los siguientes estudios de irradiación en el RA-6: cinética tumoral y tratamiento de BNCT con BE.



Figura 13. Implantación de la línea tumoral HT-29 en flanco posterior derecho de ratones nude.

### 3.4 Preparación de la Solución de BPA

Esta solución fue preparada en una concentración de 30 mg  $^{10}\text{BPA}$ / ml (0,14 M). El compuesto de boro (L-fenilalanina enriquecido al 99% de átomos de  $^{10}\text{B}$  obtenido de Interpharma Praha S.A. (República Checa) fue combinado con fructosa en una relación 1:1. A continuación, el pH fue ajustado a 9,5-10 con una solución de hidróxido de sodio 10 N y la mezcla fue agitada hasta que todo el sólido se disolviera. Por último, el pH fue reajustado a 7,4 con ácido clorhídrico 6 N. Luego se esterilizó la solución con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  y se la conservó en heladera a 4°C.

### 3.5 Diseño experimental en RA-6

Cada ratón fue individualizado con una marca en la oreja y fueron trasladados al Centro Atómico Bariloche (CAB) para ser irradiados en el reactor nuclear RA-6. El haz de neutrones utilizado es un haz hipertérmico, que consiste de un campo mixto de neutrones térmicos (Energía más probable = 0.0253 eV) y de neutrones epitérmicos (Energías entre 0.5 eV y 10 keV) adaptado con un reflector/dispersor

de neutrones, con un flujo en tumor de  $2,5 \times 10^8 \text{n/cm}^2 \cdot \text{seg}$  y en un posicionamiento específico durante un tiempo de entre 41,3 y 43,2 minutos.

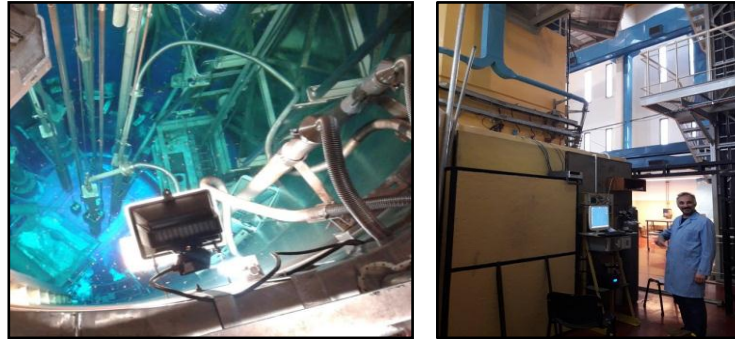


Figura 14. Reactor RA-6. Facultad BNCT.

La configuración de irradiación en el haz se muestra en la

Figura . Para adaptar el haz de BNCT clínico a pequeñas irradiaciones de animales, el cono protuberante se complementa con un reflector de neutrones.

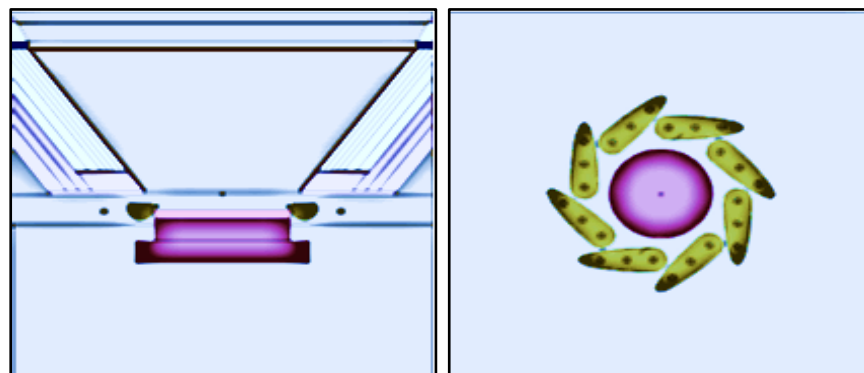


Figura 15. Montaje experimental para irradiaciones de pequeños animales. Izquierda: sobresalen cono y reflector de neutrones sobre el eje del haz. Derecha: pequeños animales posicionados alrededor del reflector de neutrones. (Boggio, 2015)

Los animales se distribuyeron en 4 grupos: 1) Control (n=12); 2) BNCT + hojuela de rodio (n=16); 3) BNCT + hojuela de plata (n=14) y 4) BNCT + hojuela de indio (n=14).



Figura 16. Distribución en grupo de los ratones.

Previamente, los animales de los grupos 2, 3 y 4 recibieron 350 mg/Kg de peso corporal de p-borofenilalanina ( $^{10}\text{BPA}$ ) en una solución acomplejada con fructosa. El tiempo de irradiación luego de la administración del compuesto borado fue seleccionado teniendo en cuenta estudios previos de biodistribución de BPA, (Dagrosa M.A., 2002). Estos tres grupos de ratones fueron anestesiados con una combinación de Diazepan (40mg/Kg) y Ketamina (200mg/Kg) ambos administrados de forma subcutánea con un lapso de 20 minutos entre ellos.

### 3.6 *Dispositivo de irradiación*

Se desarrolló un dispositivo capaz de posicionar adecuadamente en el haz de BNCT hasta 8 ratones durante una misma irradiación. Se procuró que el mismo permitiera el montaje fuera de la sala de tratamiento, para luego ser posicionado con facilidad y precisión sobre el haz.

Este dispositivo consiste principalmente de una placa cuadrada (MDF de ~5 mm de espesor) con un círculo calado en el centro de aproximadamente el diámetro

de la boca del cono del haz (16 cm). Sobre esta placa se posicionan los cuerpos de los ratones, fuera del radio efectivo del haz, con el correspondiente tumor asomando dentro de dicho radio efectivo. Para posicionar repetitivamente los volúmenes a irradiar, se adosó la placa mencionada una segunda placa, de menor espesor y con un calado circular de menor diámetro, ubicadas ambas en forma concéntrica. Esta placa tiene dibujada líneas circulares que representan niveles flujo neutrónico en esa posición. En la Figura 17 se puede apreciar este diseño.



Figura 17. Dispositivo de irradiación y reflector-dispersor de neutrones.

En este dispositivo se colocan los ratones en grupo de 8 para ser irradiados. Una vez ubicados los ratones en el dispositivo de irradiación, se colocaron las hojuelas de los distintos BE sobre los tumores (Figura 18). También se colocaron en diferentes puntos del dispositivo detectores de neutrones para hacer el cálculo de dosis.

### 3.7 Características de los dispositivos BE

Además de las características neutrónicas y radiactivas de los BE, es de importancia la disposición en un formato adecuado, en espesores tales que no perturben el haz de BNCT y que contengan la suficiente masa como para generar

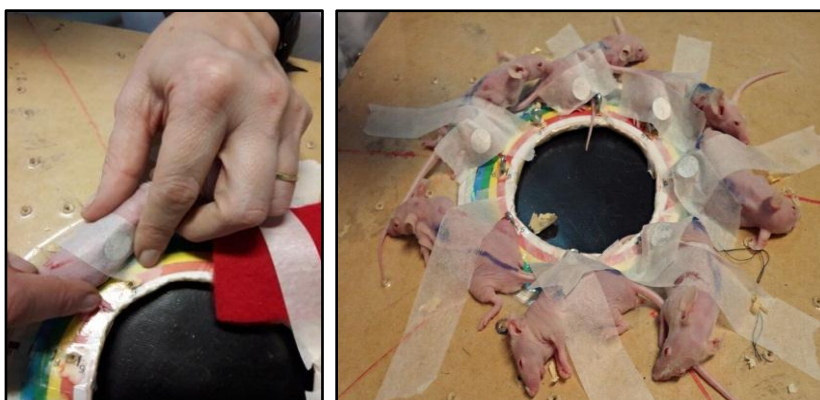
la contribución deseada a la dosis superficial (Boggio E, 2014). Las hojuelas y sus espesores utilizadas en este trabajo fueron: rodio: 0,025 mm; plata e indio: 0,127 mm. Sus principales características se enumeran en la Tabla 2.

Los BE son hojuelas de diferentes diámetros y espesores que se colocan en la superficie de tumor antes de la irradiación. (Boggio, 2015)

Tabla 2. Características radioquímicas de los BE

Material	Reacción de interés	Abundancia [%]	Sección eficaz térmica [b]	Energía $\beta$ - máx. [MeV]	Vida media [minutos]	Desintegraciones $\beta$ (-) [%]
Rodio (Rh)	$^{103}\text{Rh}(n, \gamma) ^{104}\text{Rh}$	100	143	2,5...	0.7	100
Plata (Ag)	$^{107}\text{Ag}(n, \gamma) ^{108}\text{Ag}$	52	38	1,7...	2.4	97
	$^{109}\text{Ag}(n, \gamma) ^{110}\text{Ag}$	48	91	,9...	0.4	100
Indio (In)	$^{115}\text{In}(n, \gamma) ^{116}\text{In}$	96	202	3,2...	0.2	100
	$^{115}\text{In}(n, \gamma) ^{116m}\text{In}$			1,0	54	100

Como se observa en la Tabla 2, las hojuelas de rodio y plata generan por activación neutrónica radioisótopos de vida media muy corta, (de 0,7 a 2,4 minutos), por lo que se asume que los decaimientos  $\beta$ - se producen durante la irradiación; así, los ratones y las hojuelas pueden manipularse una vez que salen de la facilidad de BNCT. En el caso de las hojuelas de indio, éste tiene un radioisótopo de período cercano a una hora, por lo que la manipulación de los animales debe ser retrasada hasta que decaigan estos productos activados o se retiren los BE adheridos al cuerpo, lo que fue realizado dentro del recinto del reactor.



*Figura 18. Colocación de hojuelas sobre los ratones. Izquierda: Hojuelas de BE sobre la superficie tumoral. Derecha: Ratones ubicados en el dispositivo con las hojuelas de BE.*

### 3.8 Dosimetría

Para la realización de los cálculos dosimétricos se asumió que los tumores son esféricos y que comienzan a 1 mm de profundidad y que ese mm de profundidad es la piel circundante. Los valores de concentración tisular de boro fueron tomados de estudios de biodistribución de BPA previos obtenidos en nuestro laboratorio. La concentración máxima de boro en tumor fue observada a la hora post administración del compuesto con un valor promedio de 20 mg/l, (Dagrosa M.A., 2002). Además se toman valores promedio de boro en los diferentes tejidos previamente obtenidos.

Mediante la integración de la función de Dosis vs. Profundidad en fantoma HIPS se pudo obtener el valor de las distintas componentes de la dosis física total. En la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos para tumores de 70 mm<sup>3</sup> promedio.

Tabla 3. Dosimetría convencional en BNCT

Órgano	Boro (ppm)	neutrones rápidos (cGy/min)	gamma (cGy/min)	<sup>14</sup> N (cGy/min)	<sup>10</sup> B (cGy/min)	Dosis física (cGy/m)
Tumor	21,01	1,55	2,90	0,37	3,08	7,90
Piel C	12,5	1,55	2,90	0,37	1,83	6,65
Piel D	9,42	1,16	2,02	0,17	0,65	4,00
Hígado	7,41	0,9	1,70	0,10	0,40	3,10
Bazo	10,30	0,9	2,08	0,17	1,49	4,64
Riñón	21,58	0,9	2,08	0,17	0,50	3,65
Pulmón	7,28	0,9	1,70	0,10	0,28	2,98

*Piel C: piel circundante; Piel D: piel distal*

### 3.9 Evaluación de los animales post irradiación

Los animales de los distintos grupos fueron evaluados durante 30 días post tratamiento. A los 8 días se sacrificaron animales y se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

#### 3.9.1 Radiotoxicidad

Se evaluó la toxicidad de las hojuelas de BE a corto plazo a través del control del peso corporal total durante el tiempo de evaluación y la aparición de signos tóxicos en piel como eritema en sus diferentes fases y ulceración.

### 3.9.2 *Cinética tumoral*

Para la realización del estudio de la cinética tumoral se midieron los tumores dos veces a la semana con un calibre graduado. El volumen fue calculado mediante la siguiente fórmula (Lee Y.S, 1988).

$$\text{Volumen tumoral}=(A^2*B)/2$$

Con A = diámetro menor y B = diámetro mayor.



*Figura 19. Medición del tamaño de los tumores con calibre.*

### 3.10 *Histología*

Para los estudios histológicos los tejidos se fijaron con formol al 10% a pH 7, luego se incluyeron en parafina y se realizó la tinción con hematoxilina y eosina. En nuestro laboratorio estamos utilizando con éxito un modelo que consiste en explorar en cortes histológicos tumorales de cada muestra una banda rectangular (300 x 6400  $\mu\text{m}$ ) que comprende todo el crecimiento del tumor que es de valores constantes (600  $\text{mm}^3$ ). Esto permite valorar con regularidad en diferentes animales todo tipo de respuesta observable a nivel celular. En particular con este tipo de análisis hemos podido hacer estudios de áreas de necrosis y proliferación celular entre otros estimadores. El área explorada de carácter rectangular y de

valores constantes se puede comparar a una exploración de estudios por punción con cilindro de tejido que se usan habitualmente en el estudio de tejido tumoral en patología diagnóstica. Por otra parte es un indicador adecuado de la relación de datos bioquímicos con los valores reales de tejido viable, tejido en regeneración y áreas de muerte celular. Mediante un programa de imágenes (IMAGE-PRO PLUS Versión 6.0) se evaluaron porcentajes de área viable y área necrótica, números de células en mitosis y número de vacuolas a lo largo de esta banda rectangular.

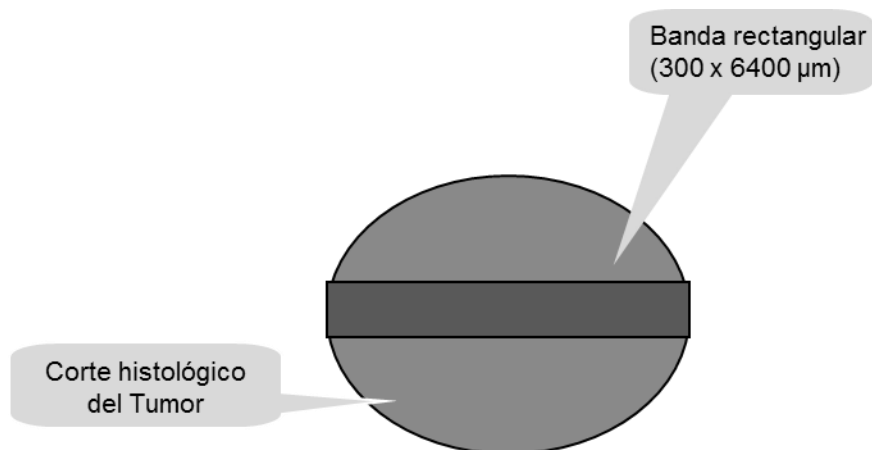


Figura 20. Esquema de exploración de muestras histológicas con microscopio.

### 3.11 Inmunohistoquímica

Para los estudios de inmunohistoquímica se utilizaron duplicados de muestras de tumores provenientes tanto de los 3 grupos irradiados como del grupo Control al día 7 post irradiación. Los tejidos se fijaron con buffer formol 10% (pH 7,0) y luego se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 10 μm de espesor, luego los cortes fueron desparafinados y rehidratados con concentraciones graduadas de Etanol preparadas con agua destilada. Los portaobjetos se transfirieron a una solución Tris 0,05 M en NaCl 0,15 M con 0,1% v/v Triton-X100, pH 7,6 (TBST). La peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% durante

10 minutos. La recuperación del antígeno se realizó utilizando microondas en buffer citrato a pH 6,0. Un primer grupo de portaobjetos se incubó en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal puro, de ratón, Anti-CD133 (AC133) humano (Miltenyi Biotec, N° 130-090-422), un marcador de CSC, (O'Brien CA, 2007). El grupo restante fue incubado también en cámara húmeda pero con el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-CD166 humano (ABCAM, AB 49496), presente en cáncer de colon. (Weichert, 2004).

Después, los cortes se incubaron con un anticuerpo secundario, el cual consiste de inmunoglobulinas de cabra biotiniladas (específicas para las especies animales ratón y conejo), seguido por la incubación con el marcador (una estreptavidina marcada con la enzima). El marcador de estreptavidina tiene una fuerte afinidad de unión con los residuos biotina del anticuerpo secundario, (CytoScan, HRP Detection System; Cell Marque, N° 951D-20). A continuación, el complejo completo anticuerpo-enzima se hizo visible por incubación con una solución cromógena que tiene tetracloruro de diaminobencidina (DAB substrate kit; Cell Marque, N° 957D-20), con peroxidasa de rábano, hasta la aparición de un precipitado de color marrón. Los portaobjetos se lavaron con agua para detener la reacción y se montaron con bálsamo de Canadá para la observación microscópica.

La cuantificación inmunohistoquímica se realizó mediante análisis de imagen. Se tomaron imágenes digitales usando un microscopio Zeiss MPM con un objetivo 20X. Se exploró también una banda rectangular, tomando imágenes consecutivas, que comprende a todo el crecimiento del tumor, abarcando la zona central de cada corte histológico. Esto permite valorar con regularidad en diferentes animales todo tipo de respuesta observable a nivel celular. Las mediciones se realizaron con el programa de análisis de imágenes IMAGE-PRO PLUS Versión 6.0. Se evaluaron los números de células positivas CD133 y CD166.

### 3.12 *Análisis Estadístico*

Mediante un programa estadístico (GraphPad InStat, versión 3.10, 2009) se utilizó el método de análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc. que usa el test de Tukey-Kramer para realizar una comparación múltiple de las medias de los volúmenes tumorales de los 4 grupos, se determinó cuál de ellas son significativamente diferentes. Se fijó un nivel de significancia P para el test de 0,05.

## 4. Resultados

### 4.1 Radiotoxicidad

La evaluación del peso corporal en los animales, como indicador de radiotoxicidad no mostró variaciones significativas a lo largo del tiempo de evaluación hasta los 20 días post tratamiento para ninguno de los grupos. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos (Figura 21).

En cuanto a la aparición de signos de radiotoxicidad en piel sólo se observó un eritema leve en la zona tumoral y piel circundante al tumor en el grupo BNCT-In sólo durante los primeros días post irradiación (fase inicial del eritema), que luego remitió.

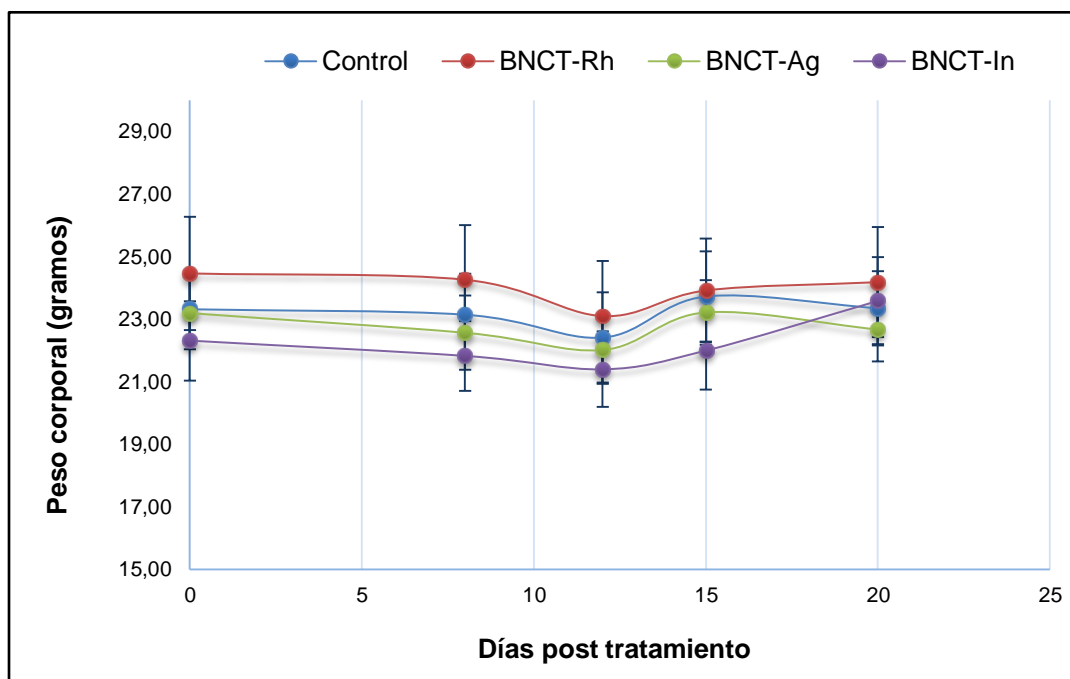


Figura 21. Curva de control de pesos. No existen diferencias significativas entre los 4 grupos.

## 4.2 Crecimiento tumoral

Se realizaron curvas de crecimiento tumoral en función del tiempo. Se observó una inhibición del crecimiento tumoral en los 3 grupos BNCT más BE. A la primera semana post irradiación ya se observan diferencias significativas entre el grupo Control (sin tratamiento) y los tres grupos tratados ( $P < 0,001$ ). A los 20 días post tratamiento se obtuvieron valores promedio de volumen tumoral relativo de 6,46 para el grupo Control; 3,31 y 2,13 para los grupos BNCT más rodio y plata respectivamente y 1,79 para el grupo BNCT más indio, observando también diferencias significativas entre el grupo Control y los 3 grupos tratados con BNCT-BE. ( $P < 0,01$  para Control versus BNCT-Rh y  $P < 0,001$  para Control versus BNCT-Ag y Control versus BNCT-In).

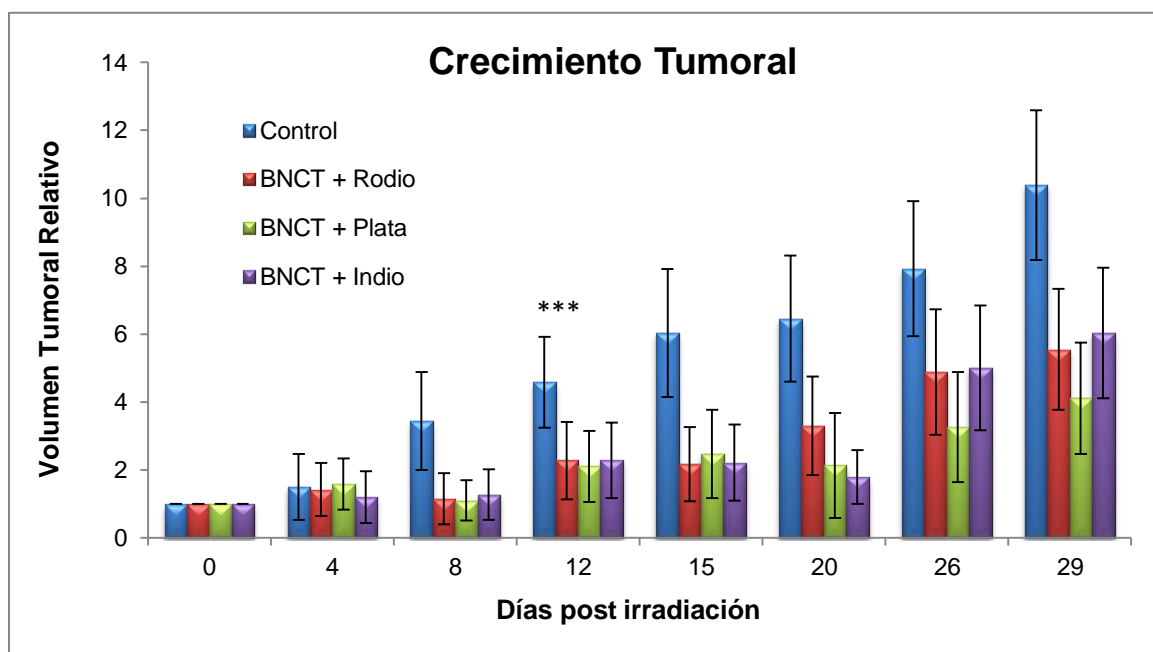


Figura 22. Volumen tumoral relativo de cada grupo de ratones en función del tiempo. El tiempo 0 es el día la irradiación. Se muestran las medias de cada grupo y su intervalo de confianza del 95 %. Al día 8 existen diferencias significativas entre el grupo Control y los 3 grupos tratados. (\*\*\*) =  $P < 0,001$ .

### 4.3 Estudios Histológicos

Los estudios histológicos mostraron una correlación entre el área de necrosis tumoral y la dosis física total absorbida.

Analizando las zonas viables de casos individuales a los 8 días post irradiación se observó menor número de células en mitosis, mayor presencia de vacuolas y núcleos picnóticos en los extendidos con BE. (Figura 23 y Figura 27).

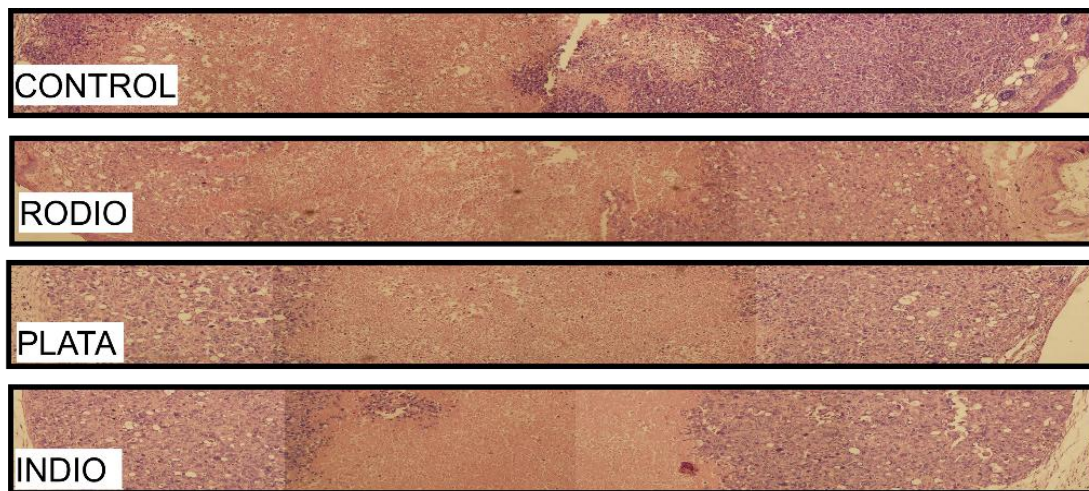


Figura 23. Cortes histológicos con tinción de HE, aumento 20X. ( Porción rectangular que atraviesa todo el tumor)

#### 4.3.1 Viabilidad Tumoral

Cuando se analizó mediante un programa de imágenes (IMAGE-PRO PLUS Versión 6.0) las zonas viable y necróticas de cada tumor a la primer semana post irradiación no se observaron diferencias significativas entre los grupos, además de observar mayor cantidad de tejido viable en el grupo BNCT-In, que fue el grupo de animales con mejor respuesta a lo largo de las tres semanas de observación ( Figura 24).

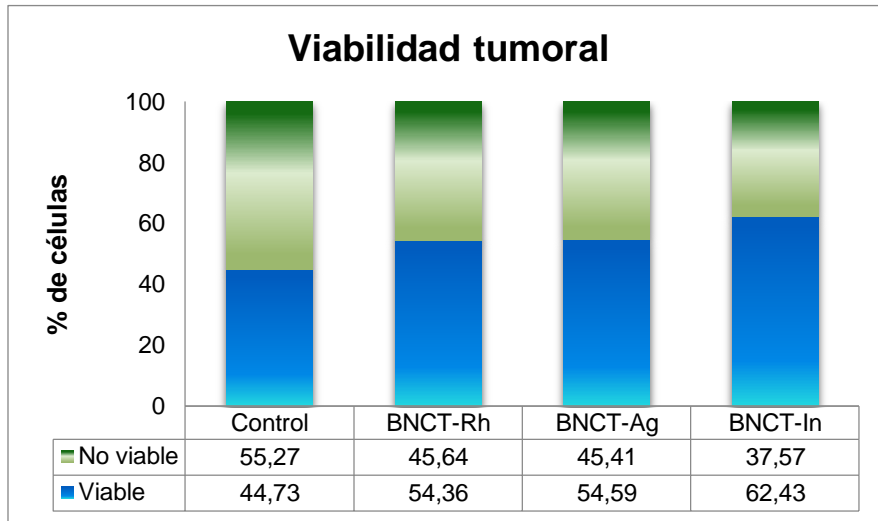


Figura 24. Relación de células viables y no viables en tumor.

Sin embargo, cuando analizamos la fracción viable de cada grupo en función del volumen tumoral, se observa una disminución de dicha fracción en los grupos tratados respecto del Control, lo que concuerda con el menor volumen tumoral observado a la primer semana en los grupos sometidos al tratamiento BNCT-BE, (Figura 24 y Tabla 4); indicando que efectivamente se produce un control sobre el tumor post tratamiento.

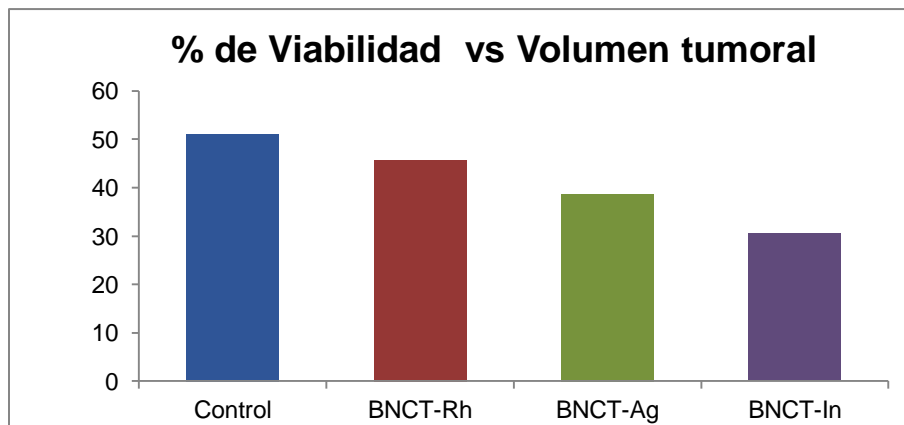


Figura 25. Porcentaje de células viables respecto del volumen tumoral.

Tabla 4. Viabilidad y Volumen tumoral

Muestra	Viabilidad (%)	Volumen tumoral (mm <sup>3</sup> )	% Viabilidad en función del volumen tumoral
Control	44,73	328,74	51,06
BNCT-Rh	54,36	242,47	45,77
BNCT-Ag	54,59	204,16	38,70
BNCT-In	62,43	140,9	30,54

#### 4.3.2 Células en Mitosis

Al analizar el número de células en proceso de mitosis, se observa que las muestras provenientes de animales que no recibieron ningún tratamiento tienen un mayor número de células en proceso de división celular con respecto a los animales tratados.

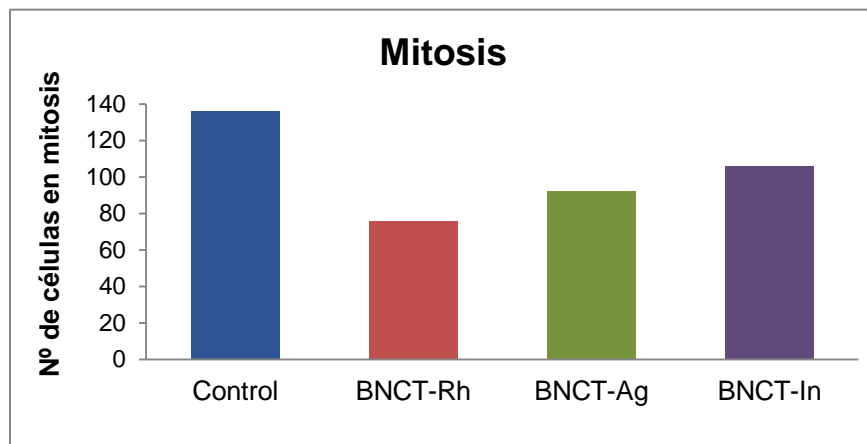


Figura 26. Análisis de células en mitosis.

### 4.3.3 Cantidad de vacuolas

El análisis de vacuolas mostró que los tres grupos BNCT presentaron un mayor número de esta organela que el grupo Control, siendo mayor el número de vacuolas en el tejido tumoral tratado por BNCT con hojuelas de indio. Estos resultados podrían ser indicadores de un aumento en la muerte celular por autofagia en animales tratados por BNCT-In, como posible respuesta a la radiación.

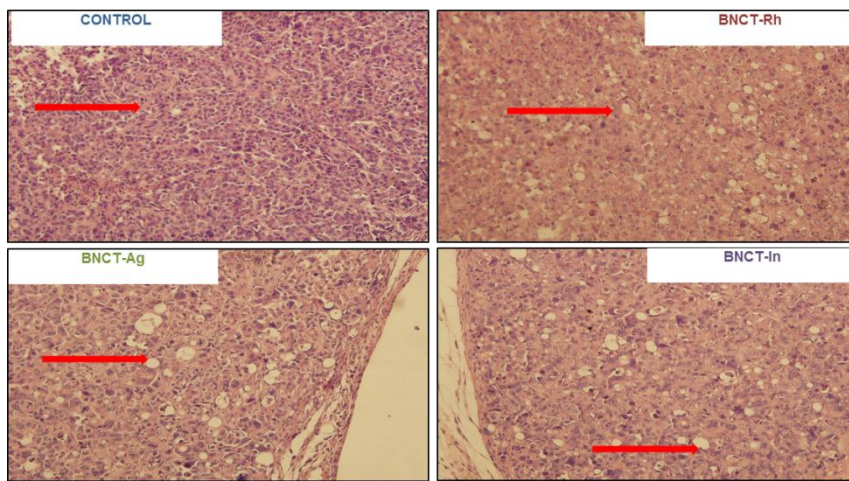


Figura 27. Número de vacuolas. Fotomicrografía de una sección viable de los tumores de cada tratamiento, incluido el control. Las vacuolas están identificadas con flechas rojas.

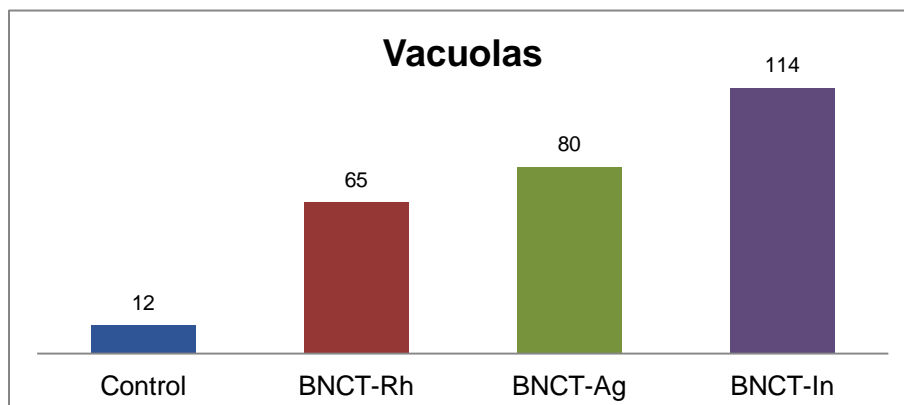


Figura 28. Cantidad de vacuolas por sección de tejido.

#### 4.4 Estudios Inmunohistoquímicos

En primer lugar, en los animales de los grupos Control, que no recibieron ningún tratamiento observamos la presencia de células positivas para los dos marcadores de superficie analizados en este trabajo en la línea de cáncer de colon HT-29, CD133 y CD166. Esto concuerda con los trabajos publicados por otros autores. (Gemei M., 2013).

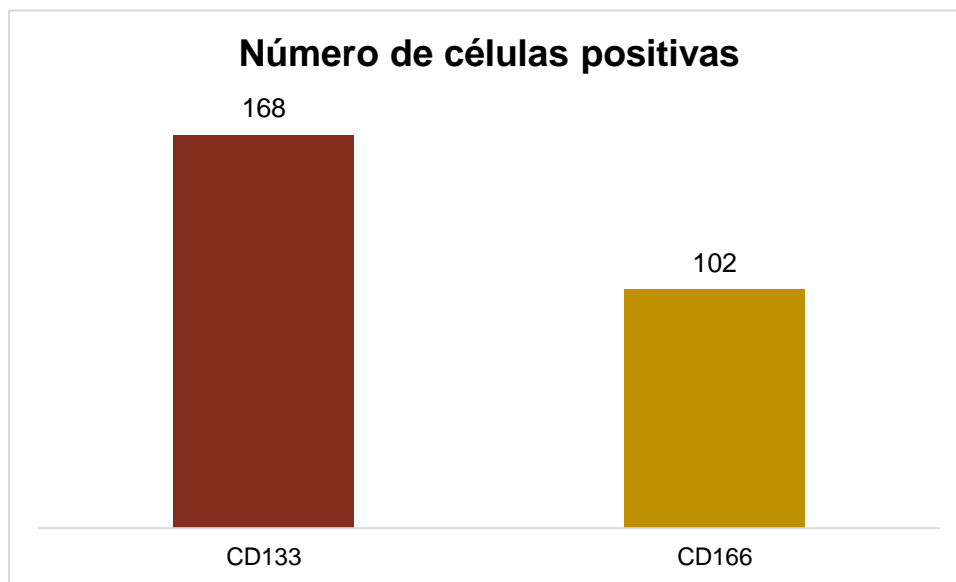


Figura 29. Células HT-29 positivas para CSCs.

##### 4.4.1 Antígeno de superficie CD133

Los estudios inmunohistoquímicos revelaron la presencia de CSCs positivas para CD133 sólo en la zona viable del tumor, lo que podría sugerir que las mismas están asociadas a la proliferación del tumor observado luego del día 20 post tratamiento.

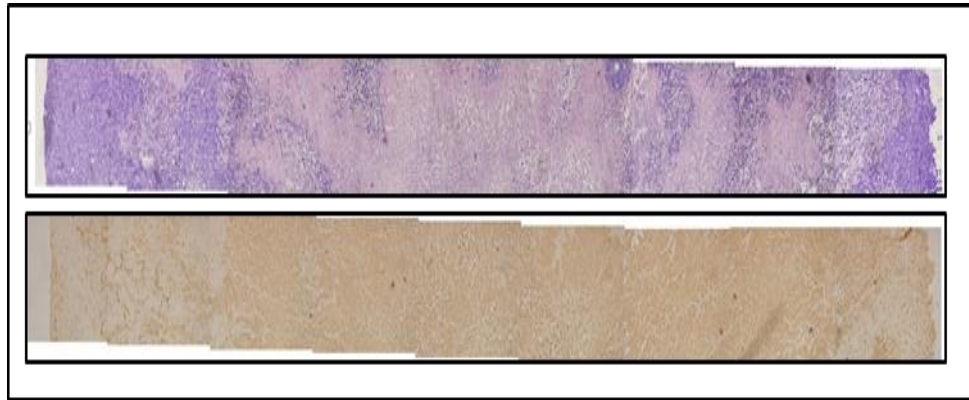


Figura 30. Mismo corte de muestra de tratamiento BNCT-Rh. Arriba: Tinción H-E. Abajo: Tinción CD133.

El análisis de las secciones de tejido de los tres grupos tratados y el Control, mostraron una marcada diferencia en el número de células CD133 positivas entre el Control y los tres grupos tratados en la primera semana post irradiación.

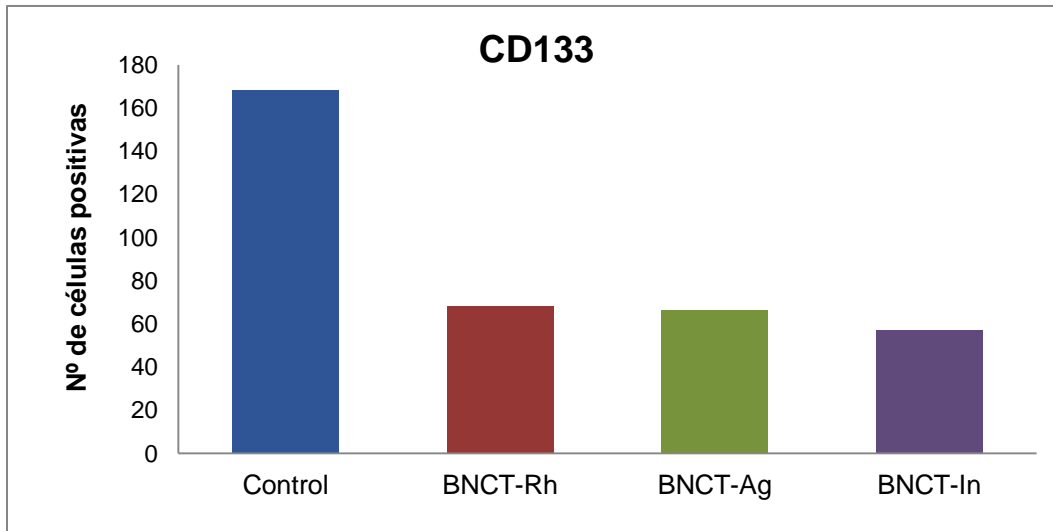


Figura 31. Número de células CD133 positivas a la primera semana post irradiación.

#### 4.4.2 Antígeno de superficie CD166

El estudio del antígeno de superficie CD166, mostró una disminución del número de células positivas a la semana post irradiación respecto al grupo Control, demostrando que el número de CSCs detectadas a la semana post tratamiento también disminuye.

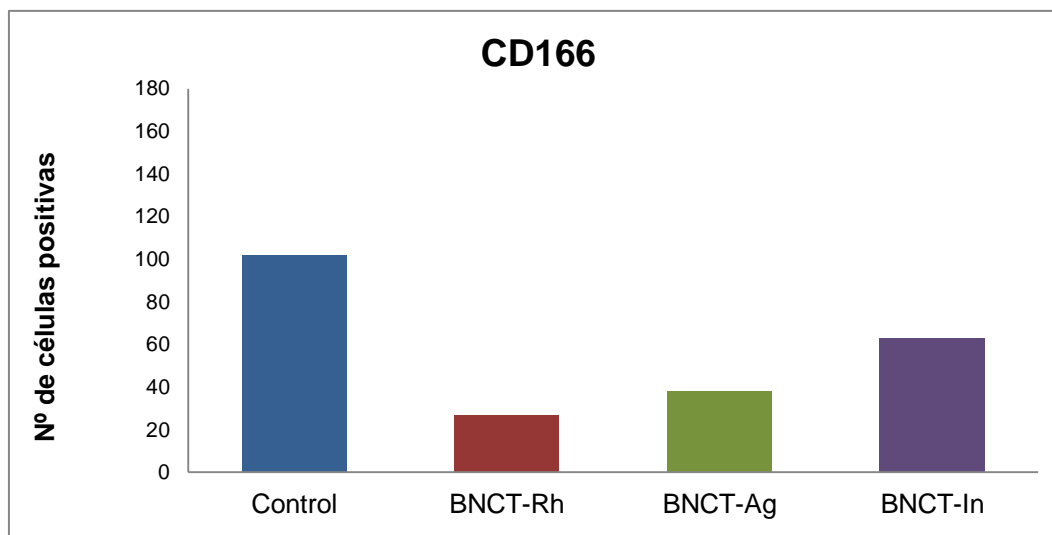


Figura 32. Número de células CD166 positivas a la primera semana post irradiación.

#### 4.5. Dosimetría

Los estudios dosimétricos realizados permitieron calcular la tasa de dosis física total para un tumor promedio de  $180 \text{ mm}^3$ , siendo de 9,9; 9,4 y 7,6 cGy/min en los grupos BNCT-Rh, BNCT-Ag y BNCT-In respectivamente. Con respecto a la dosis física total absorbida en el tiempo de irradiación por los tumores de cada uno de los tratamientos, se obtuvieron valores muy similares entre los tres grupos tratados (Tabla 5), siendo mayor que la dosis física total obtenida para BNCT sin sumarle la contribución de la radiación Beta (3,35 Gy). La dosis en piel para estos tres grupos respecto a BNCT solo fue mayor debido a la contribución en superficie aumentada por la presencia de los dispositivos BE.

Tabla 5. Dosimetría BNCT más BE

		<b>Dosis total con BE (Gy)</b>		
<b>Órgano y ppm de B</b>		<b>BNCT-Rh</b>	<b>BNCT-Ag</b>	<b>BNCT-In</b>
<b>Tumor-E<sup>1</sup></b>	21	7,31	7,34	6,59
<b>Tumor-I<sup>2</sup></b>	21	7,2	7,23	6,49
<b>Piel C-I<sup>3</sup></b>	12,5	15,5		
<b>Piel D</b>	9,4	1,7		
<b>Hígado</b>	7,4	1,3		
<b>Bazo</b>	10,3	2		
<b>Riñón</b>	21,6	1,5		
<b>Pulmón</b>	7,3	1,3		

1: Tumor Externo de 180 mm<sup>3</sup> promedio. 2: Tumor Interno, pequeño. 3: Primer Milímetro =30cGy/min. Piel C: piel circundante; Piel D: piel distal

## 5. Discusión

En estudios previos de BNCT usando BE de rodio y realizados en el modelo de cáncer superficial en ratones *NIH nude* demostramos la eficacia de estos dispositivos respecto a la aplicación de la terapia sin agregar los mismos. Tampoco se observaron evidencias de toxicidad asociada a su uso. Otro hallazgo evidente fue un mayor número de mitosis atípicas en los preparados histológicos de los tumores del grupo de ratones tratados con BNCT-Rh sugiriendo mayor daño celular en la zona viable del tumor (Nievas S. B. E., 2015). Estos resultados preliminares demostraron que este dispositivo emisor de radiación beta podría ser una herramienta complementaria a BNCT en el tratamiento de tumores superficiales. En este nuevo trabajo que rerealizamos y estamos presentando se planteó evaluar y comparar tres materiales distintos emisores de radiación beta: rodio, plata e indio, con la finalidad de seleccionar el más apropiado para optimizar la aplicación de BNCT.

Luego de la distribución de los animales en los distintos grupos se realizaron las irradiaciones correspondientes. A continuación de las mismas se evaluó la posible toxicidad radioinducida. Por un lado se controló el peso corporal de los animales durante el tiempo de seguimiento y además se realizó la observación visual de la zona tumoral expuesta a la radiación. En cuanto al peso no se observaron diferencias significativas en el peso de los animales luego de la irradiación. Tampoco se observó diferencias entre los grupos tratados y el grupo Control. En el grupo BNCT con hojuelas de indio se observó un eritema leve en la piel circundante al tumor durante los primeros días post tratamiento. Este eritema revirtió a la semana y su desarrollo concuerda con las características descriptas para la fase inicial en la evolución de un eritema inducido por radiación, presentadas en la Guía de Protección Radiológica de los Pacientes de la IAEA.

La curva del volumen tumoral en función del tiempo mostro que el tumor detuvo su crecimiento después de la irradiación hasta la tercer semana post tratamiento en los tres grupos irradiados, siendo esta disminución del volumen tumoral con respecto al grupo sin irradiar (Control) más pronunciada para el grupo BNCT-In. A partir del día 20 todos los animales muestran una pérdida de inhibición sobre el crecimiento tumoral. Estos resultados concuerdan con resultados previos obtenidos por nuestro grupo aplicando BNCT sin el agregado del dispositivo BE para tumores superficiales mayores a 50 mm<sup>3</sup> (Dagrosa MA V. M., 2003), (Dagrosa MA, 2007). En la literatura está descrito un comportamiento de este tipo para tumores irradiados con dosis subóptimas de radiación convencional (Prasad, 1995). Por otro lado los tumores obtenidos y utilizados en estos experimentos fueron de un tamaño mayor (100-180 mm<sup>3</sup>) y es sabido que los estudios clínicos predicen mejor pronóstico para tumores pequeños (Dutreix, 1988).

En este trabajo los estudios histológicos del tumor mostraron un menor porcentaje del área viable en los grupos tratados, siendo aún menor respecto al volumen tumoral para el grupo BNCT-In. El análisis de células en mitosis demostró que el número de células que se están dividiendo es menor en los tres tratamientos y más acentuada la disminución en el grupo BNCT Rh. Otros estudios demostraron un arresto en G2/M y defectos en la mitosis de diferentes líneas celulares de cáncer (Qiu L, 2000) (Taddei A, 2001) (Bali P, 2005), (Dowling M, 2005), (Nome R.V, 2005), (Wong C.F, 2005). Nuestros resultados confirmarían el arresto en esta fase del ciclo celular luego de exponer células tumorales en cultivo a dosis físicas totales de 3 Gy proveniente de BNCT (Perona M, 2013).

Los mecanismos de muerte celular producidos por radiación de alto LET (como la proveniente de BNCT) que han sido descriptos en la literatura indican muerte por catástrofe mitótica o necrosis tisular principalmente, aunque también se señala al proceso de apoptosis como otra vía probable y secundaria de muerte

radioinducida. Un tercer proceso biológico de muerte celular sería la autofagia, la cual fue descrita como un proceso catabólico de degradación en respuesta a diferentes tipos de estrés. Algunos estudios señalan a este mecanismo como una modalidad de muerte celular tumoral (Kondo Y, 2005). Otros estudios mostraron que en células con el gen Bcl XL antiapoptótico sobreexpresado se induce la muerte por autofagia (Shao Y, 2004). Nuestros resultados estarían de acuerdo con estos tres mecanismos y en esa misma proporción señalada, aunque el mayor número de vacuolas observadas para el grupo BNCT-In podría indicar un aumento de la autofagia probablemente asociado a la mayor energía de la radiación beta emitida o a otras formas de decaimiento del indio activado que no fueron considerados en los cálculos dosimétricos de este trabajo.

Las células positivas CD133 y CD166 indican la presencia de CSCs en la zona viable del tumor generado en los ratones *nude* por la implantación de células de la línea de carcinoma humano HT-29. Su persistencia, aunque disminuida, a la semana post irradiación, parecería estar asociado a la proliferación del tumor y pérdida del control sobre el crecimiento de la terapia con cualquiera de los dispositivos utilizados. Estudios de oncología muestran que estas son las células más radioresistentes y que deberían ser el blanco de cualquier terapia que se implemente ya que son las que poseen las propiedades para generar nuevamente el tumor (Baumann M, 2008), (Krause M, 2017).

Las dosis física totales absorbidas por los tumores no mostraron diferencias significativas entre los 3 grupos tratados y fueron de 7,31 Gy para BNCT-Rh, de 7,34 Gy para BNCT-Ag y de 6,59 Gy para BNCT-In. A nivel macroscópico en concordancia con esos valores de dosis no se observaron diferencias significativas en el crecimiento del tumor entre los 3 grupos tratados. Sin embargo a nivel microscópico con el BE de indio se obtuvo mayor efecto biológico en cuanto a menor porcentaje de área viable y mayor proporción de área necrótica y también mayor número de vacuolas indicadoras de muerte celular por autofagia. Esta diferencia observada a nivel celular/tisular usando el

indio podría estar asociada las mayores energías de las radiaciones beta emitida (de hasta 3,3 MeV) y a muchos otros decaimientos de radiaciones no beta, de radiaciones gamma y de IT que no fueron considerados en la dosimetría de este trabajo.

Por lo tanto, estos estudios no mostraron diferencias significativas en el uso de los tres dispositivos BE evaluados como herramienta complementaria de BNCT. A nivel histológico el elemento indio mostró inducir mayor daño celular por distintos procesos tisulares/celulares. Sin embargo se requieren otro tipo de estudios para analizar los distintos procesos radioquímicos inducidos que podrían ser la causa de este mayor efecto.

## 6. Conclusiones

- ✓ Los resultados obtenidos mostraron que el peso de los animales no se modificó luego del tratamiento, y que el eritema leve observado en el grupo BNCT-In revierte a la semana, demostrando que ninguno de los dispositivos sería radiotóxico.
- ✓ Los tres tipos de BE mostraron eficacia para controlar el crecimiento del tumor post irradiación hasta la tercera semana. No observándose diferencias significativas entre los tres grupos tratados.
- ✓ El porcentaje de área viable en relación al volumen tumoral total disminuyó en los tres grupos tratados respecto al grupo Control. Esta disminución fue mayor para el grupo BNCT-In.
- ✓ El número de células en mitosis disminuye en los tres grupos BNCT con las hojuelas, siendo mayor esta disminución para el grupo BNCT-Rh. Esta disminución estaría asociada al arresto celular en G2/M observado previamente en células irradiadas por BNCT.
- ✓ El mayor número de vacuolas en los animales tratados con el BNCT-In, puede estar relacionado a la muerte celular producida por el proceso de autofagia, demostrando que uno de los efectos biológicos diferenciales del BE de indio sería la

inducción de este mecanismo de muerte celular.

- ✓ Las poblaciones de CSCs positivas para CD133 y CD166 están presentes en el grupo Control, aunque en cantidades diferentes, siendo mayor las CSCs positivas para CD133. Ambos subgrupos de CSCs disminuyen a la primera semana post tratamiento en los tres grupos BNCT-BE y su persistencia estaría relacionada a la proliferación tumoral observada a partir del día 20 de evaluación.
  
- ✓ Las dosis físicas absorbidas en los tres grupos BNCT-BE son similares, aunque la diferencia en las energías de la radiación *Beta* y otros decaimientos no evaluados en este estudio podría causar el mayor daño celular en los animales tratados con el BE de indio.

***Estos estudios demostraron que los tres dispositivos serian no tóxicos y efectivos como herramientas complementarias a BNCT para el tratamiento de tumores superficiales. El BE de indio podría causar mayor daño tumoral sin embargo se requieren más estudios para clarificar los procesos radioquímicos involucrados.***

## 7. Bibliografía

- Al-Hajj M, e. a. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 23 (43): 7274-7282.
- Bali P, P. M. (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 280, 26729-26734.
- Barth R, G. H. (2012). Current status of BNCT of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol*, 7: 146-.
- Barth RF, S. A. (1992). Boron neutron capture therapy for cancer. Realities and prospects. *Cancer*, 70 (12) : 2995-3007.
- Barth, R. (1998). Rat brain tumor models in experimental neuroncology; the 9L, C6, T9, F98, RG" (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J. Neuro-Oncol*, 36, 91-102.
- Baumann M, M. K. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature Reviews Cancer*, 8; 545-554.
- Blachot, J. (2007). Nuclear Data Sheets for A = 104\*. *Nuclear Data Sheets* 108, 2035–2172.
- Blachot, J. (2010). Nuclear Data Sheets for A = 116. *Nuclear Data Sheets*, 111: 717–895.
- Blachot, J. (2012). Nuclear Data Sheets for A = 114. *Nuclear Data Sheets*, 515–714.
- Boggio E, L. J. (2014). Beta enhancers: hacia una nueva implementación para BNCT en tumores superficiales. *12º Congreso Argentino de Física Médica*. Buenos Aires, Argentina.
- Boggio, E. L. (2015). Beta Enhancers: towards a local dose enhancer device for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) on superficial tumors. *IFMBE Proceedings. World Congress on Medical Physics and Biom*, 51, 607-613.
- Bonnet D, e. a. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature*, 3: 730-737.
- Coderre JA, M. G. (1999). The radiation biology of boron neutron capture therapy. . *Radiat Res* , 151: 1-18.
- Dagrosa M.A., V. M. (2002). Selective uptake of p-borophenylalanine by undifferentiated thyroid carcinoma for boron neutron capture therapy. . *Thyroid*, 12; 7-12.
- Dagrosa MA, T. L. (2007). Optimization of the application of boron neutron capture therapy (BNCT) to the treatment of undi. *Radiat. Oncol. Biol. Phys*, 69 (4): 1059-1066.

- Dagrosa MA, V. M. (2003). Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15;57(4):1084-92.
- Dowling M, V. K. (2005). Mitotic spindle checkpoint inactivation by trichostatin a defines a mechanism for increasing cancer cell killing by microtubule-disrupting agents. *Dowling M, Voong K.R, Kim M, Keutmann M.K, Harris E, Kao G.D. Mitotic spindle checkpoint inactivation by trichostatin* *Cancer Biol. Ther*, 4:197-206.
- Dutreix, J. T. (1988). An approach to the interpretation of clinical data on the tumour control probability-dose relationship. *Radiother. Oncol.* , 11; 239-248.
- Fairchild RG, G. D. (1986). Microanalytical techniques for boron analysis using the  $^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha)^7\text{Li}$  reaction. *Med Phys*, 13 (1): 50-56.
- Fogh, J. a. (1975). New Human Tumor Cell Lines. En F. J. (eds), *Human Tumor Cells in Vitro* (págs. 115-159.). Boston, MA: Springer.
- Gemei M., R. D. (2013). Cytometric profiling of CD133+ cells in human colon carcinoma cell lines identifies a common core phenotype and cell type-specific mosaics. *Int J Biol Markers*, 28 ( 3 ): 267-273.
- Goorley JT, K. W. (2002). Goorley JT, Kiger WS, Zamenhof RG. Reference dosimetry calculations for neutron capture therapy with comparison of analytical and voxel models. *Med. Phys.*, 29(2):145-56.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (2011). Washington, D.C.: THE NATIONAL ACADEMIES PRESS.
- Gürdal G, K. F. (2012). Nuclear Data Sheets for A = 110\*. *Nuclear Data Sheets 113*, 1315–1561.
- Helin Vakifahmetoglu-Norberg, H.-g. X. (2015). Pharmacologic agents targeting autophagy. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1):5–13.
- Huang E, W. M. (2008). Colon cancer stem cells: implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med*, 14 (11): 503-509.
- Jun-jie Liu, M. L.-y.-k. (2011). Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Letters 300*, 300; 105–114.
- Klionsky, Z. Y. ( 2009). An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*, 335: 1–32.
- Kojima M, I. G. (2008). Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* , 99 (8): 1578-1583.
- Kondo Y, K. T. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. . *Nat Rev Cancer.* , (9):726-34.
- Krause M, A. D. (2017). Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 109 (2017) 63–73.

- Lee Y.S, B. D. (1988). Therapeutic efficacy of antiglioma mesenchymal extracellular matrix 131 I-radiolabeled murine monoclonal antibody in a human glioma xenograft model. *Cancer Research*, 48: 559- 565.
- Lehmann, J. R. (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 9891-9895.
- Magee, J. A. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* , 21 (3): 283-296.
- Menéndez P R, R. B. (2009). BNCT for skin melanoma in extremities: update Argentine clinical results. *Appl Radiat Isot*, 67 (7-8): S50-S53.
- Miraglia S, G. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 90(12):5013-21.
- Mishima Y, I. M. (1989). New Thermal Neutron Capture Therapy for Malignant Melanoma: Melanogenesis-Seeking <sup>10</sup>B Molecule-Melanoma Cell Interaction From in Vitro to First clinical Trial. *Pigment Cell Research*, 2:226-234.
- Nievas S., B. E. (2015). Estudios preclínicos para optimizar la aplicación de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer superficial. *AATN. XLII Reunión Anual*. CABA, Argentina.
- Nome R.V, B. A. (2005). Cell cycle checkpoint signaling involved in histone deacetylase inhibition and radiation-induced cell death. *Mol. Cancer Ther*, 4:1231–1238.
- O'Brien CA, P. A. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445 (7123): 106-110.
- Patel D.D., S. W. (1995). Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med* , 181: 1563–1568.
- Perona M, R. C. (2013). Improvement of the boron neutron capture therapy (BNCT) by the previous administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate for the treatment of thyroid carcinoma. *Radiat Environ Biophys.*, 52(3):363-73.
- Prasad, K. N. (1995). Handbook of Radiobiology. En K. N. Edition, (*Handbook of Radiobiology. Kedar N Prasad Secon Edition 1995. CRC Press. Cap 6. Pag 91-96*) . (págs. Cap 6. Pag 91-96). CRC Press.
- Qiu L, B. A. (2000). Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. . *Mol. Biol. Cell.*, 11(6):2069-83.
- Resnick, D. P. (1994). The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* , 19: 5-8.
- Shao Y, G. Z. (2004). Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 18030-18035.
- Snyder H, R. J. (1958). Syntesis of aromatic boronics acids, aldehydo boronic acids and

- a boronic acid analog of tyrosine. *J Am Chem Soc*, 80: 835-838.
- Soloway A, H. H. (1967). Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds. *J Med Chem*, 10 (4): 714-717.
- Taddei A, M. C. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.*, 3, 114-120.
- Taussig DC., M.-M. F.-A. (2008). Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity. *Blood*, 112 (3): 568-575.
- Taylor H, G. M. (1935). Detection of nuclear desintegration in a photographic emulsion. *Nature*, 135: 341-348.
- Wahab S.R.M., F. I.-y. (2017). The Identifications and Clinical Implications of Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, Volume 16, Issue 2, Pages 93-102.
- Weichert, W. K. (2004). ALCAM /CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol*, 57; 1160-1164.
- Wittig A, S. W. (2000). Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res*, 153(2):173-180.
- Wong C.F, G. A. (2005). Exploiting novel cell cycle targets in the development of anticancer agents. *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:85-102.
- www.cab.cnea.gov.ar. (2012). *Terapia para el cáncer por captura neutrónica BNCT*. Obtenido de [www.cab.cnea.gov.ar/index.php/proyectos/bnct](http://www.cab.cnea.gov.ar/index.php/proyectos/bnct)
- Yin AH, M. S.-P. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 90 (12): 5002-5012.
- Yi-Shiuan Liu, H.-C. H.-C.-C. (2013). Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 67; 791-799.