

ESTUDIOS TRASLACIONALES DE BNCT EN DISTINTOS MODELOS: METÁSTASIS DIFUSAS EN PULMÓN, EVALUACIÓN DE EFECTO ABSCOPAL Y ARTRITIS REUMATOIDEA.

Verónica A. Trivillin

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



Nuestro Team

Investigador Principal: Dra. Mandy Schwint
Co-director: Dra. Verónica Trivillin
Dra. Andrea Monti Hughes
Dra. Marcela Garabalino
Dra. Emiliano Pozzi
Lic. Elisa Heber

Grupo colaborador

- David W Nigg, Bill Bauer - Idaho National Lab, USA
- Frederick Hawthorne and Satish Jalisatgi et al. - Univ. Missouri, USA
- Saverio Altieri and Silva Bortolussi et al. - Univ. Pavia & INFN, Italy
- John Hopewell - Oxford University, UK
- Departamento de química, CNEA
- Personal técnico y profesional del RA-1, RA-3 y RA-6, CNEA
- Departamento de física, CNEA
- Departamento de instrumentación y control , CNEA
- Gerencia de reactores de investigación y producción, CNEA
- ME Itoiz & RF Aromando - Fac. Odontología, UBA
- Gisele Saint Martin & Agustina Portu - CNEA
- Sara González & Gustavo Santa Cruz et al. - CNEA
- Lucas Colombo & Jorge E. Cardoso - Instituto de Oncología Angel H. Roffo
- Sergio Ferraris & Juan Santa María et al. - Universidad Maimónides
- Nahuel Olaiz & Guillermo Marshall - Fac. de Cs. Exactas y Naturales , UBA
- VA Medina & DJ Martinel Lamas, Fac. Bioquímica, UBA

BNCT (Terapia de Captura Neutrónica en Boro)

TERAPIA BINARIA

1º componente: acumulación selectiva de portadores de ^{10}B en CÉLULAS TUMORALES

2º componente: irradiación con neutrones térmicos en TEJIDOS NORMAL Y TUMORAL

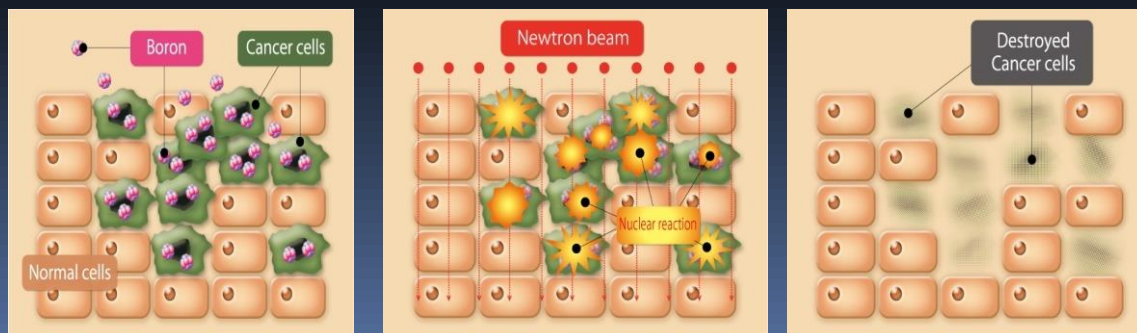


corto alcance

(5-9 μm = diámetro célula),

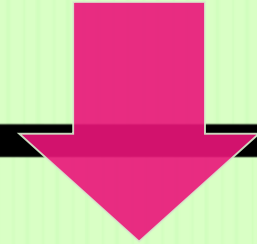
alto LET (Transferencia Lineal de Energía)

(Daño a la célula)

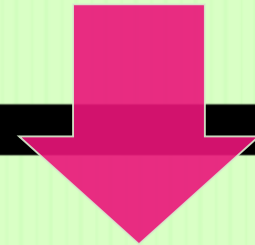


Así, BNCT dañaría las células tumorales selectivamente, preservando el tejido normal.

El pulmón es el sitio de metástasis más frecuente para muchos tipos de tumores y, para algunos determinados tipos de cáncer, es el único asiento de lesiones metastásicas (metástasis en pulmón por sarcoma de Ewing, por sarcoma de Wilms y enfermedades Oligometastásicas).



Cuando las mismas son múltiples, la resección quirúrgica no es una opción, y la mortalidad es del 100% a muy corto plazo.



A pesar de nuevas opciones de tratamientos quimioterápicos, estos pacientes no tendrían una alternativa terapéutica efectiva, resultando en un tratamiento paliativo.

BNCT ha sido propuesto para el tratamiento de tumores difusos de pulmón no resecables.



Ya que BNCT se basa en un targeting biológico y no en un targeting conformacional o geométrico como ocurre con la radioterapia convencional, resulta particularmente útil para tratar metástasis difusas, micrometástasis y focos infiltrantes no detectables.



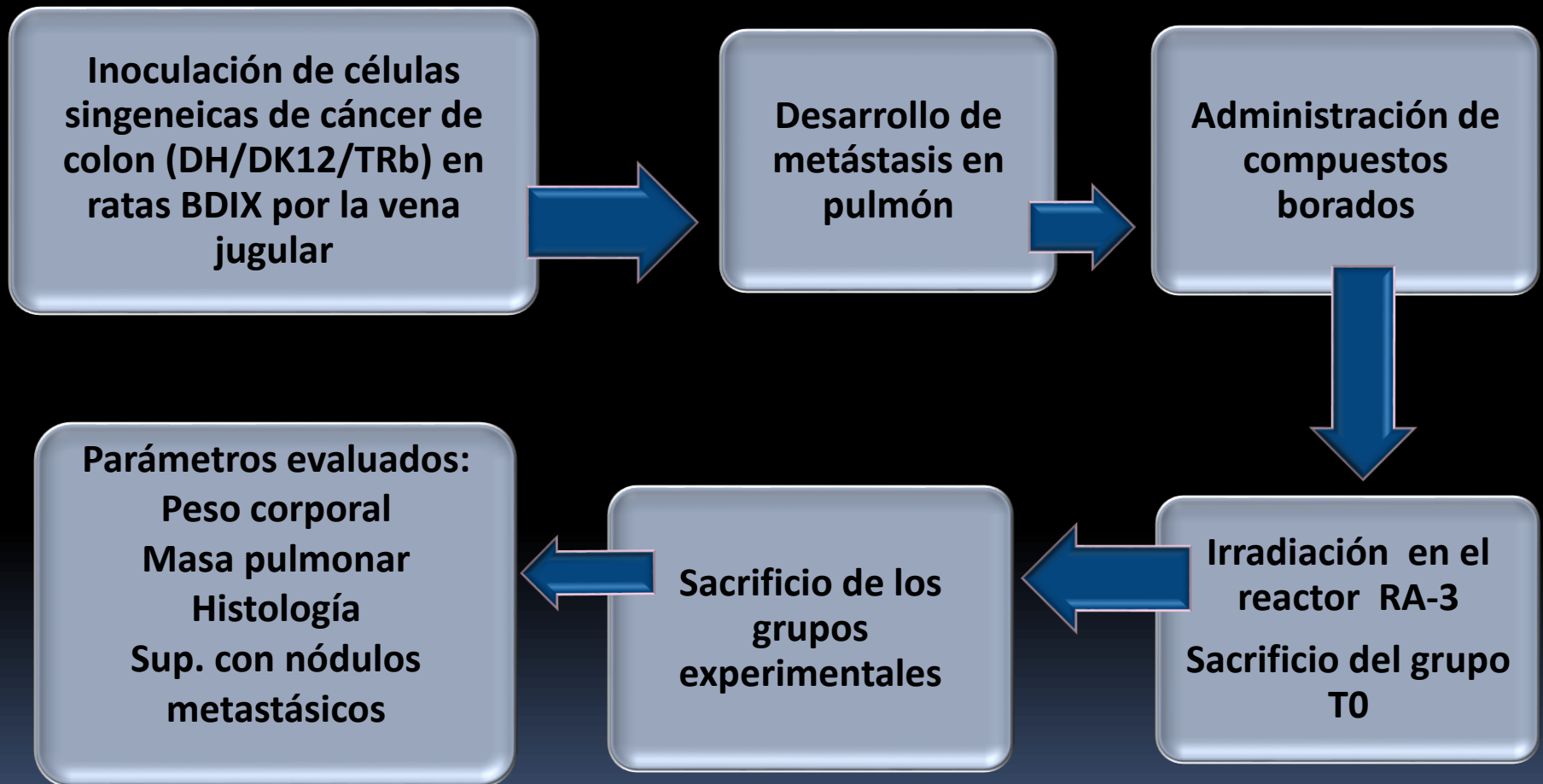
Por otra parte se vería minimizado el efecto del movimiento del órgano en la aplicación *in situ*, que dificulta la aplicación en las radioterapias convencionales.

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto multi-institucional (CNEA, U. Maimónides, Inst. A. Roffo y Fundación Favaloro) que tiene como objetivo primordial estudiar la factibilidad de aplicar BNCT *ex-situ* al tratamiento de pacientes con metástasis múltiples en ambos pulmones.

En el marco del Acuerdo Específico entre CNEA y la U. Maimónides (R.P. CNEA Nro. 136/2013), el proyecto se centra en la evaluación de factibilidad y radiotoxicidad de un protocolo novel de irradiación *ex-situ* en pulmón normal de oveja en colaboración con el CIDME de U. Maimónides, y en el estudio de eficacia terapéutica en un modelo experimental de metástasis en pulmón en rata.

El objetivo del estudio en el modelo de metástasis difusa de cáncer de colon en pulmón fue evaluar la eficacia terapéutica de BNCT en ratas, empleando diferentes parámetros como indicadores de control tumoral, y estudios de sobrevida.

Diagrama de estudio de BNCT in vivo



Se evaluó el estado general de los animales en términos de peso corporal, síntomas neurológicos y signos clínicos durante todo el proceso.

Tratamiento



3
semanas



2
semanas

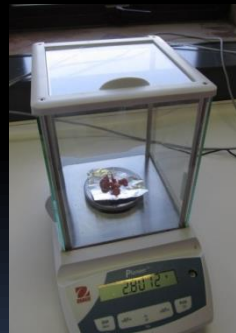
Sacrificio

Se inyectaron 3×10^6 células de carcinoma de colon (DHD/K12/TRb) iv. en la vena jugular.

Se analizó



% área ocupada por metástasis en cortes histológicos de lóbulos pulmonares.

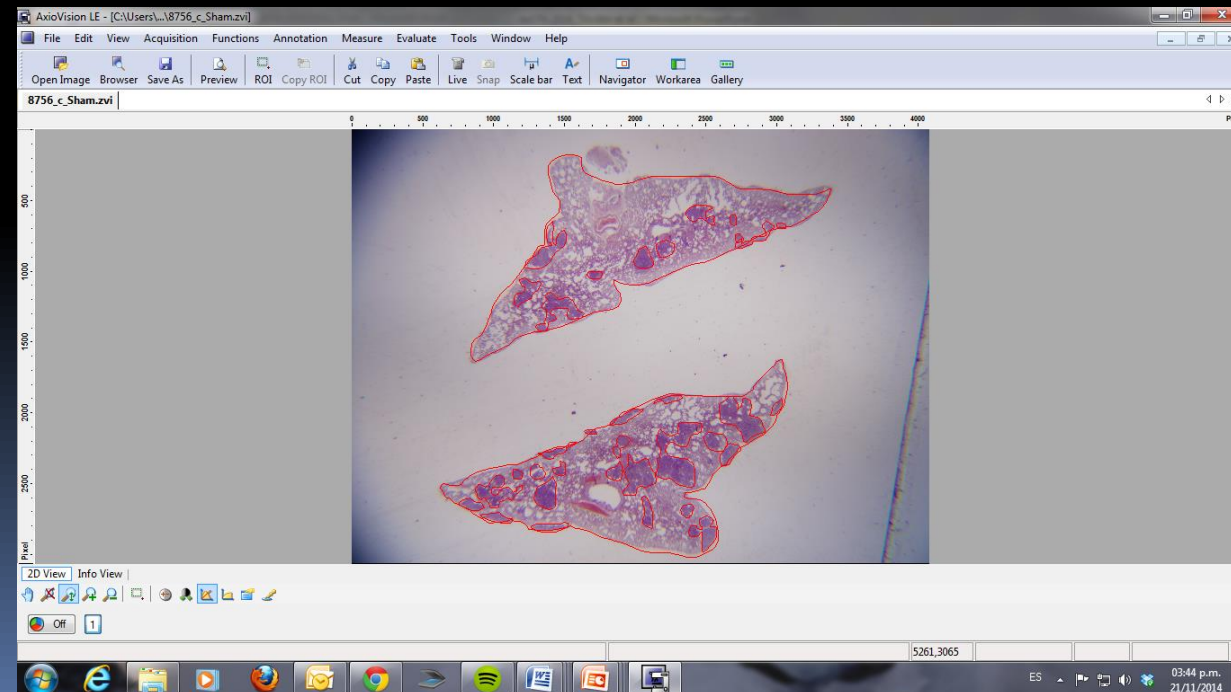
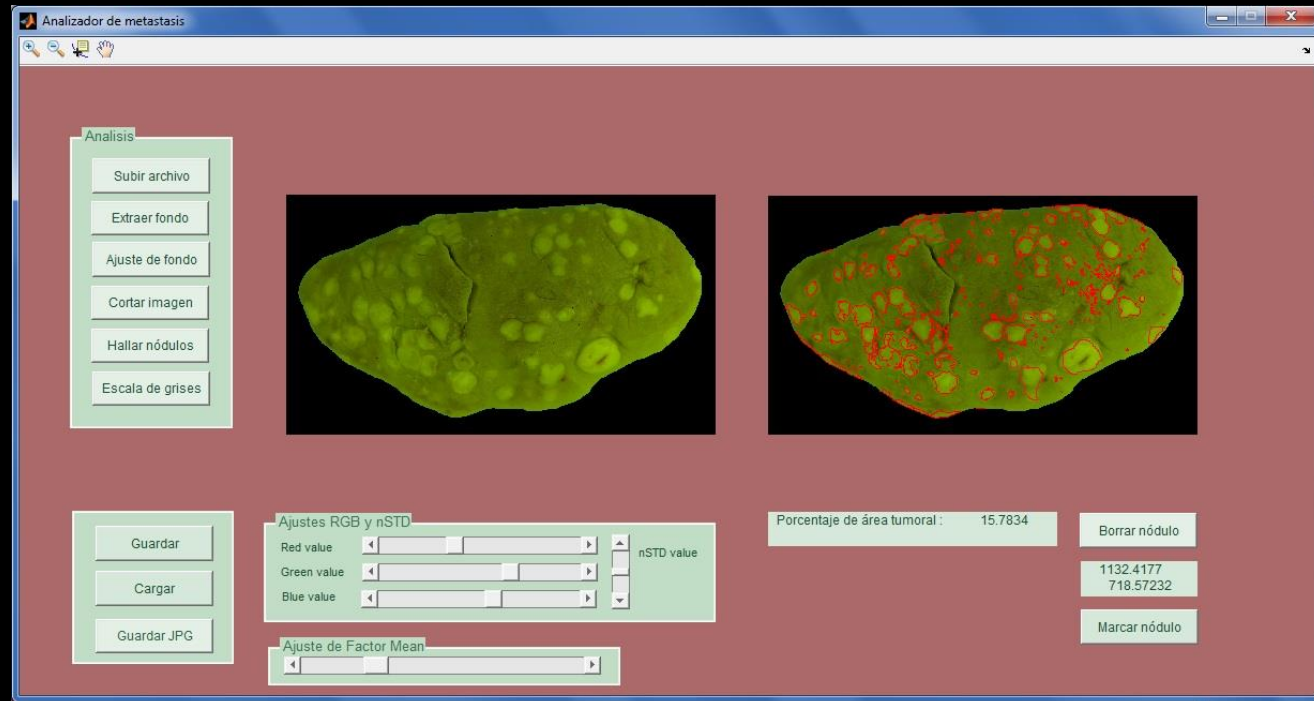


% Masa Pulmonar / Masa corporal



% Superficie pulmonar ocupada por metástasis en lóbulos fijados en solución de Bouin

Se tomaron imágenes digitales de los lóbulos y mediante un software procesador de imágenes desarrollado *ad hoc* con base en la plataforma Matlab®, se analizó la superficie ocupada por metástasis.



Se tomaron imágenes de los cortes donde se midió la superficie de los cortes y las áreas ocupadas por metástasis mediante el procesador de imágenes Axio Vision Rel. 4.8.

Grupos experimentales

1-Grupos controles

- Sacrificadas 3 semanas post inoculación (pre-tratamiento).

T0

Solo Haz

- Sin administración de compuesto borado
- Irradiación en Reactor Nuclear RA-3
- Sacrificadas 5 semanas post inoculación y 2 post terapia.

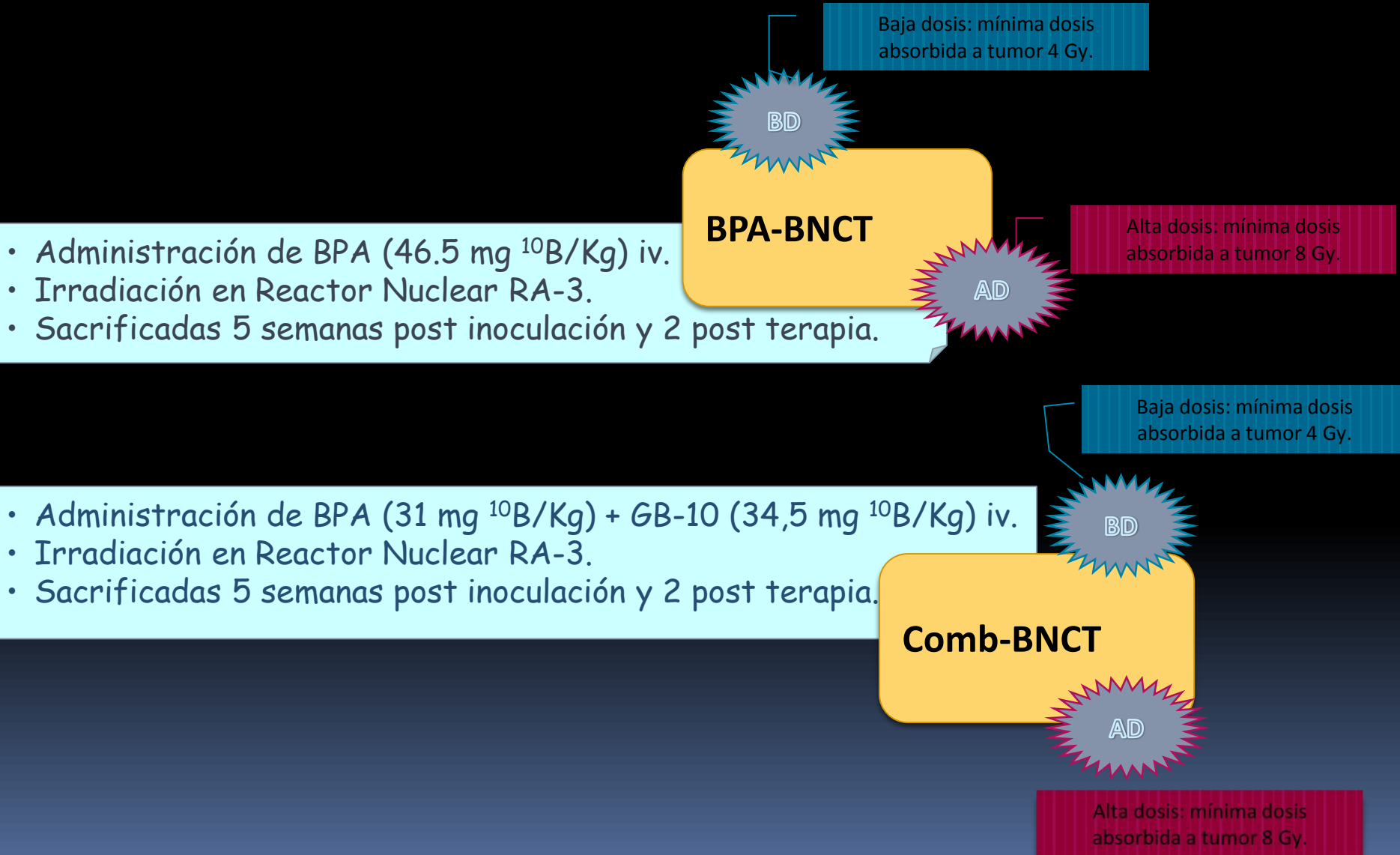
Sham

- Sin administración de compuesto borado
- Misma manipulación sin irradiación
- Sacrificadas 5 semanas post inoculación.

En todos los grupos las ratas BDIX estaban inoculadas con 3×10^6 células (DH/DK12/TRb).

Grupos experimentales

2-Grupos BNCT

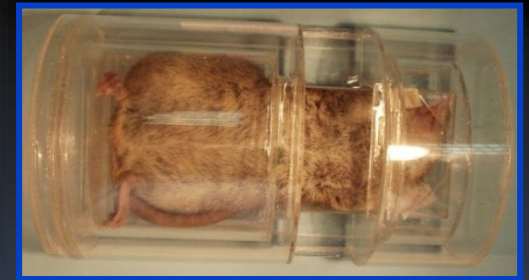
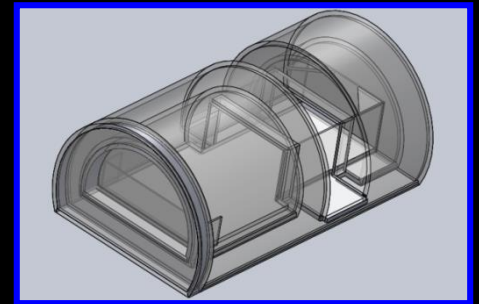
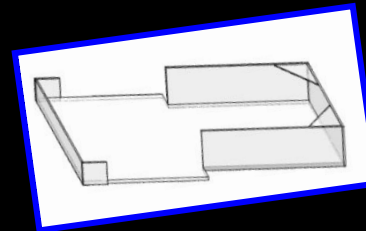
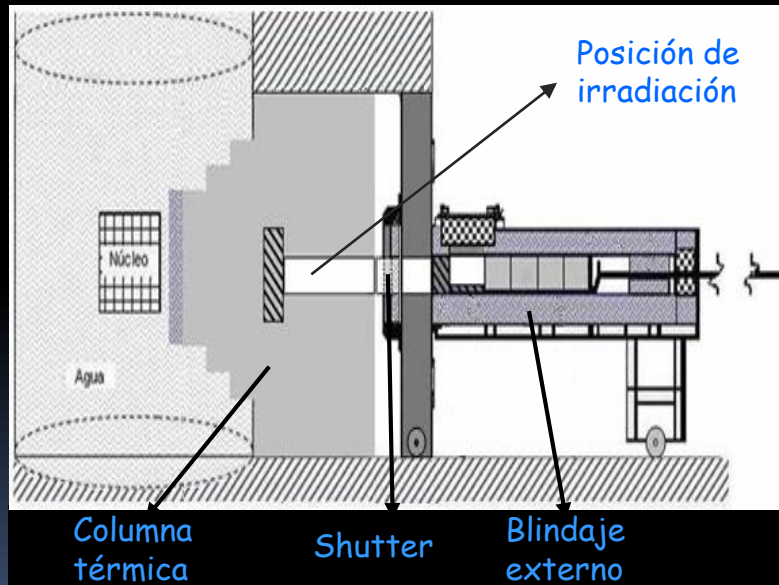


Factibilidad de BNCT para metástasis pulmonares experimentales en el Reactor Nuclear RA-3

En base a los protocolos de administración potencialmente útiles, se realizaron los cálculos dosimétricos para evaluar la factibilidad de tratamientos en el mismo modelo experimental, utilizando el Reactor Nuclear RA-3. Para la irradiación fue necesario diseñar y adecuar un blindaje para proteger el cuerpo del animal mientras se expone el pulmón a través de una apertura. Razetti y colaboradores diseñaron, caracterizaron y construyeron un apropiado blindaje de neutrones térmicos de carbonato de litio 6.

Blindaje de Carbonato de Litio

Esquema de la columna térmica del RA-3



CONSIDERACIONES DOSIMÉTRICAS

Restricciones en Radioterapia clínica con fotones				
Organo	Condición	Vol. Crit (cc)	1 fracción	
			Umbral Gy	Max. Gy
Corazón	pericarditis	< 15	16	22
Médula espinal	Myelitis	<0,35	10	14
Piel	ulceration	<10	23	26
Pulmón (R&L)	basic function	1500	7	
Pulmón (R&L)	Pneumonitis	1000	7,4	
Pulmón (R&L)		<10%	20	

	Tumor	Piel	Otros
CBE	3,8	2,5	1,4
RBE	3,2	3,2	3,2

Tejidos	BPA (46.5 mg ¹⁰ B /Kg) ip	BPA (31 mg ¹⁰ B/Kg) ip + GB-10 (34.5 mg ¹⁰ B/Kg) i.v
Sangre	13.7 ± 2.3 (n=5)	31.9 ± 5.9 (n=4)
Metástasis	22.9 ± 7.2 (n=48)	32.8 ± 8.7 (n=32)
Pulmón	12.2 ± 7.2 (n=9)	28.3 ± 5.6 (n=6)
Médula espinal	5.5 ± 2.4 (n=8)	4.7 ± 2.0 (n=5)
Corazón	14.9 ± 3.7 (n=4)	18.9 ± 3.0 (n=3)
Metástasis / Pulmón	1.9	1.2
Metástasis / Sangre	1.7	1.0

Prescripción de dosis absorbida para los diferentes protocolos.

Dosis absorbida (Gy) para el protocolo de BNCT mediado por BPA (46,5 mg $^{10}\text{B/Kg}$), iv (baja dosis)

	Mínima	Media	Máxima
Corazón	4,4	5,8	6,9
Médula	1,0	1,9	3,3
Pulmón	3,0	4,6	6,2
Tumor	4,0	6,3	9,0

Dosis absorbida (Gy) para el protocolo de BNCT mediado por BPA (46,5 mg $^{10}\text{B/Kg}$), iv (alta dosis)

	Mínima	Media	Máxima
Corazón	8,8	11,6	13,8
Médula	2,0	3,9	6,6
Pulmón	6,1	9,1	12,4
Tumor	8,0	12,7	17,9

Dosis absorbida (Gy) para el protocolo de BNCT mediado por BPA (31 mg $^{10}\text{B/Kg}$) + GB-10 (34,5 mg $^{10}\text{B/Kg}$), iv (baja dosis)

	Mínima	Media	Máxima
Corazón	4,0	5,3	6,3
Médula	0,8	1,6	2,6
Pulmón	3,7	5,9	8,3
Tumor	4,0	6,4	9,3

Dosis absorbida (Gy) para el protocolo de BNCT mediado por BPA (31 mg $^{10}\text{B/Kg}$) + GB-10 (34,5 mg $^{10}\text{B/Kg}$), iv (alta dosis)

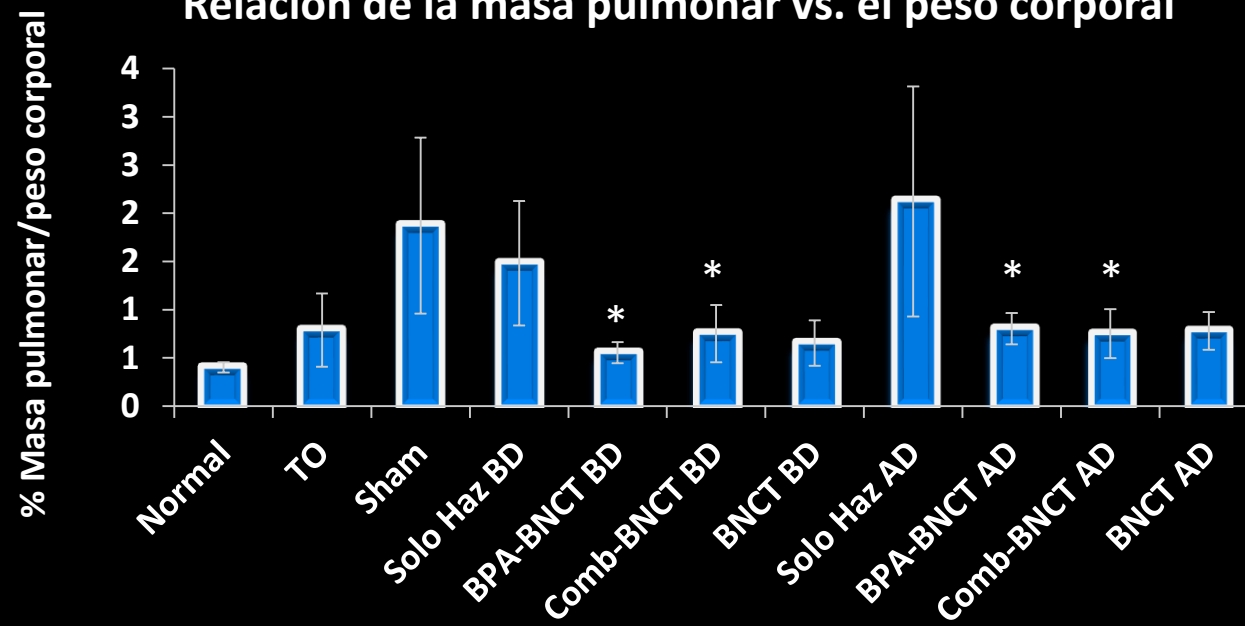
	Mínima	Media	Máxima
Corazón	8,0	10,7	12,7
Médula	1,6	3,1	5,1
Pulmón	7,3	11,8	16,7
Tumor	8,0	12,9	18,7

Parámetros evaluados como indicador de respuesta tumoral

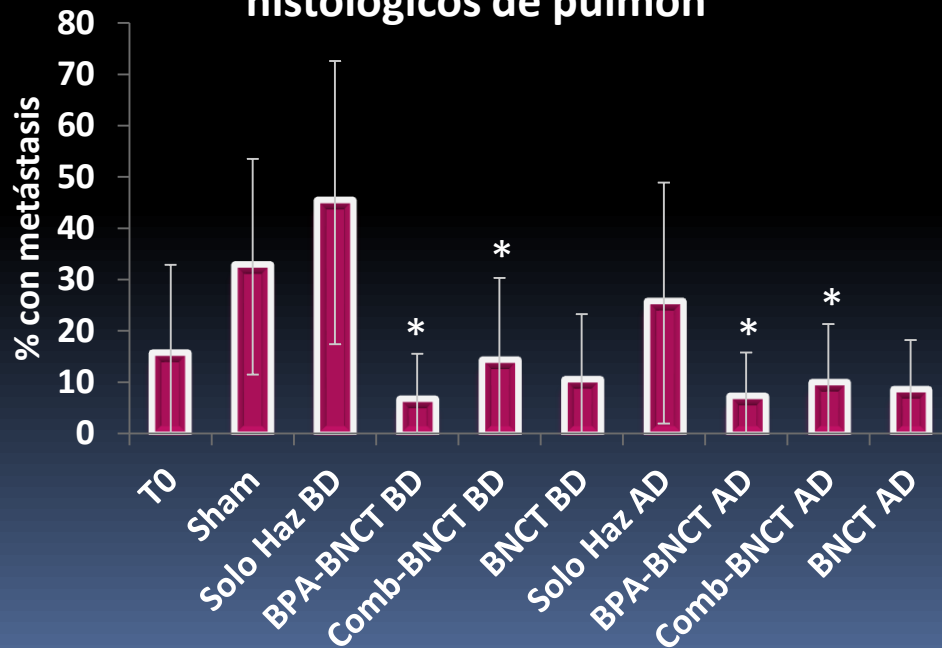
	% Masa Pulmón/masa corporal (media $\pm$ DS; N)	% Superficie pulmonar con metástasis (media $\pm$ DS; N)	% Áreas metastásica en corte histológico de pulmón (media $\pm$ DS; N)
Normal	0,40 $\pm$ 0,05 N=12	NA	NA
T0	0,79 $\pm$ 0,38 N=10	35,3 $\pm$ 30,7 N=18	15,5 $\pm$ 17,5 N=15
Sham	1,87 $\pm$ 0,91 N=13	49,6 $\pm$ 31,3 N=19	32,5 $\pm$ 21,0 N=18
Solo Haz BD	1,48 $\pm$ 0,64 N=5	54,7 $\pm$ 30,8 N=3	45,0 $\pm$ 27,6 N=4
BPA-BNCT BD	0,56 $\pm$ 0,11 N=5	21,3 $\pm$ 31,2 N=5	6,4 $\pm$ 9,1 N=5
Comb-BNCT BD	0,75 $\pm$ 0,30 N=5	40,5 $\pm$ 36,9 N=5	13,9 $\pm$ 16,3 N=5
BNCT BD	0,65 $\pm$ 0,24 N=10	30,9 $\pm$ 35,1 N=10	10,2 $\pm$ 13,1 N=10
Solo Haz AD	2,12 $\pm$ 1,19 N=6	45,1 $\pm$ 31,3 N=9	25,4 $\pm$ 23,5 N=9
BPA-BNCT AD	0,80 $\pm$ 0,16 N=5	35,8 $\pm$ 28,8 N=8	6,9 $\pm$ 8,9 N=8
Comb-BNCT AD	0,75 $\pm$ 0,25 N=4	29,5 $\pm$ 27,6 N=7	9,6 $\pm$ 11,7 N=7
BNCT AD	0,78 $\pm$ 0,19 N=9	32,9 $\pm$ 28,2 N=15	8,2 $\pm$ 10,0 N=15

BD: baja dosis; AD: alta dosis; NA: no aplica

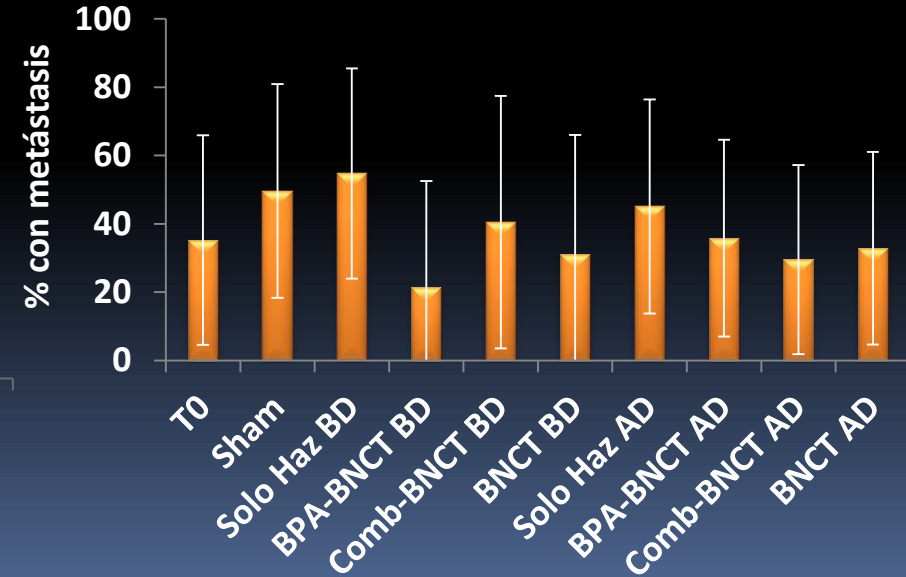
Relación de la masa pulmonar vs. el peso corporal



Área con metástasis en cortes histológicos de pulmón



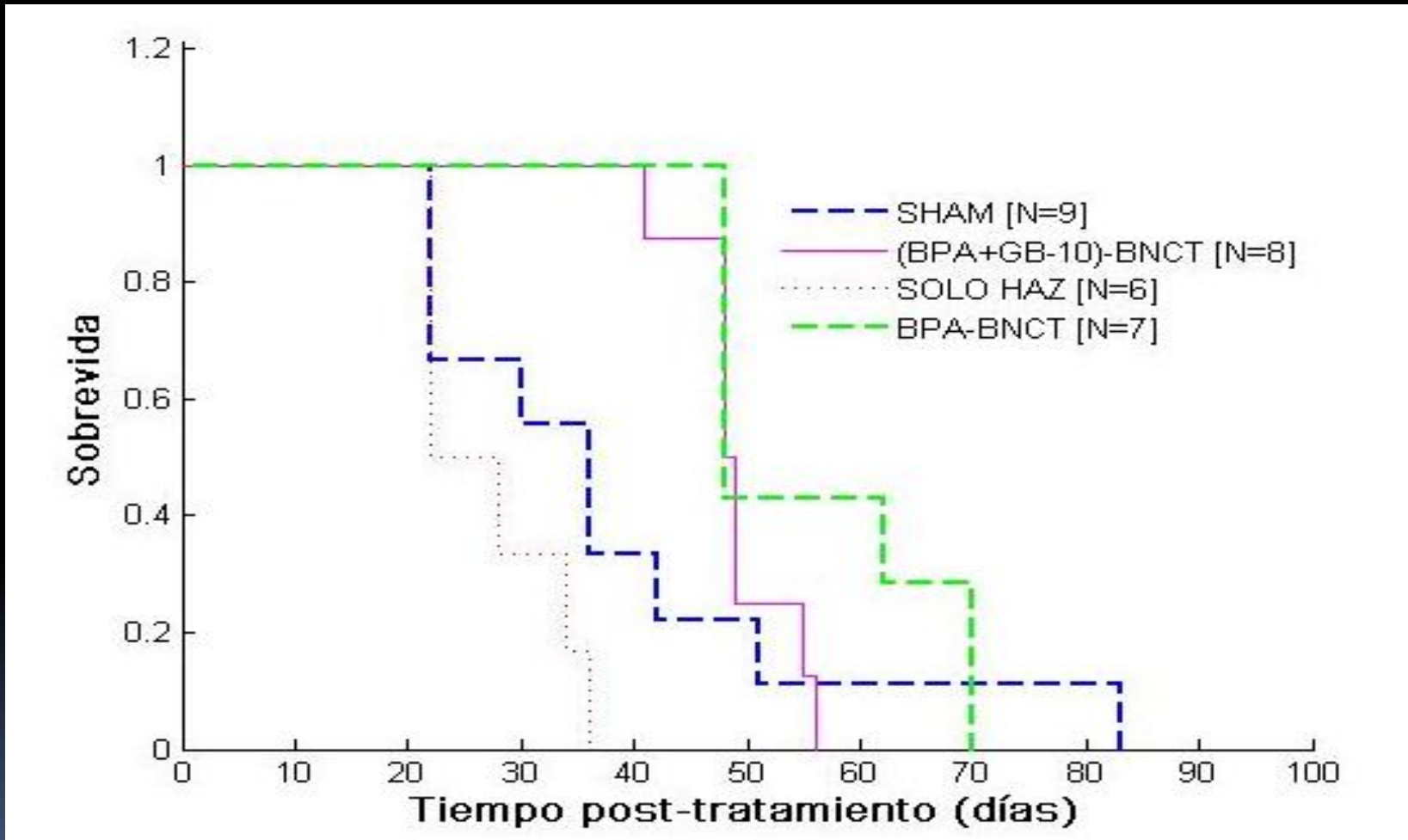
Superficie pulmonar ocupada por metástasis



Evaluación de la supervivencia

Animales tratados con alta dosis (dosis mínima a tumor 8 Gy)

Se sacrificaron los animales cuando la saturación de oxígeno en sangre era $<70\%$



Estudios preliminares de supervivencia se observa que 5/6 animales Sham habían muerto a los 37 días, mientras que 8/9 animales BNCT sobrevivieron 50 días

Conclusión

- ❖ BNCT induce control parcial de las metástasis pulmonares experimentales, sin toxicidad asociada.
- ❖ Este efecto puede ser evaluado mediante parámetros complementarios y consistentes con diferente grado de sensibilidad.
- ❖ El uso de varios parámetros complementarios contribuye a robustecer la evaluación del efecto y a estudiarlo de forma más integral.
- ❖ Los estudios de sobrevida mostraron una duplicación del tiempo de sobrevida sin muertes en el grupo para BNCT (6-7 semanas) vs. Sham (3 semanas).

Efecto Abscopal con la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT).

- Se ha demostrado que la radioterapia localizada estándar induce efectos abscopal en varios tipos de cáncer.
- El efecto Abscopal inhibiría el crecimiento del tumor en un sitio distante al volumen de tratamiento.
- Los mecanismos biológicos involucrados en este efecto no se entienden completamente, pero podrían estar mediados por mecanismos inmunológicos.
- El hecho que los efectos beneficiosos de la radiación puedan extenderse más allá de citotoxicidad directa para las células tumorales podría ser utilizado ventajosamente en la terapia oncológica.

El objetivo del presente estudio fue evaluar, por primera vez, el potencial efecto Abscopal de BNCT.

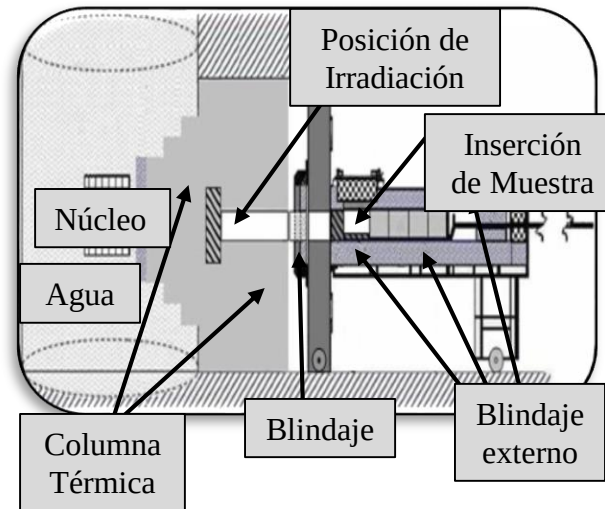
Representación esquemática del protocolo experimental

inoculación subcutánea en el
flanco posterior **derecho**



3 Semanas post-
inoculación

Irradiación en el Reactor Nuclear RA-3 BPA-BNCT (T0)



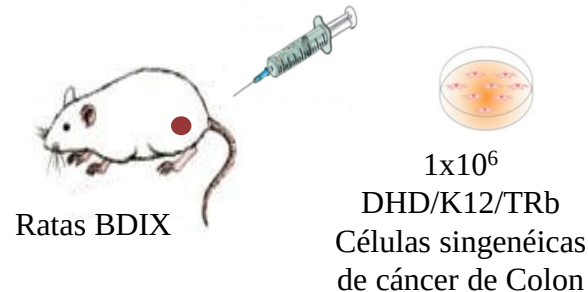
Blindaje para
Neutrones de
carbonato de Litio

Evaluación del volumen
tumoral



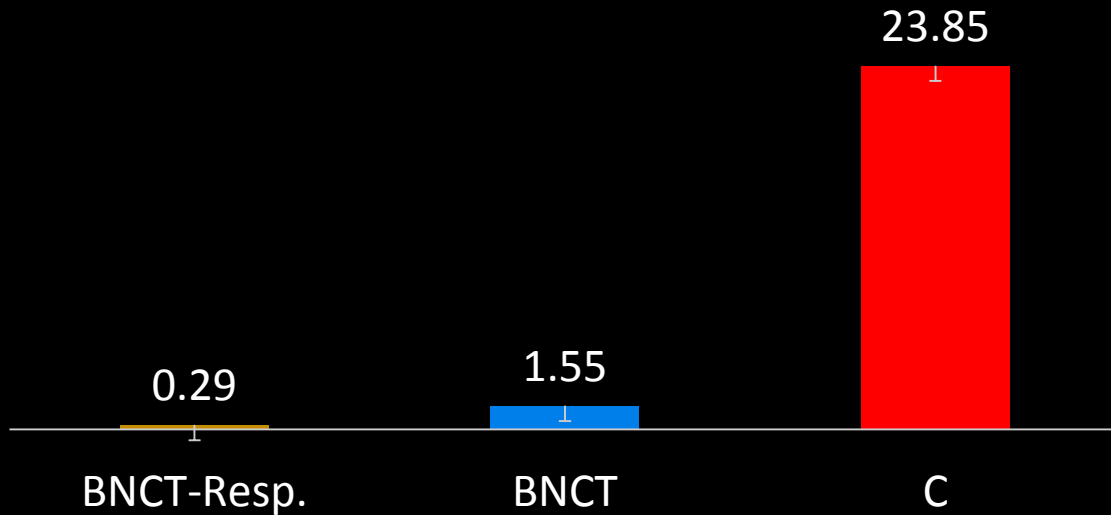
Seguimiento
por 5 semanas

inoculación subcutánea en el flanco
posterior **izquierdo**

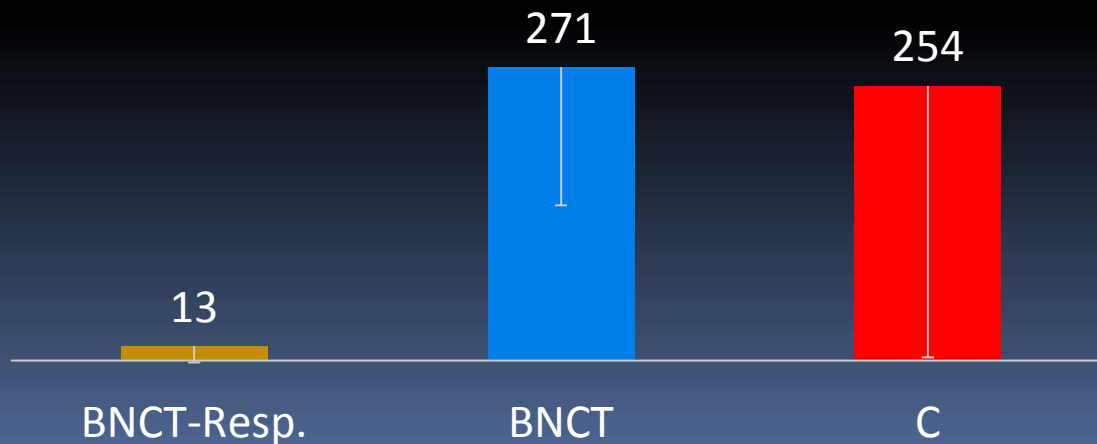


2 semanas
post-BNCT

Respuesta tumoral de pata derecha (Post/Pre)

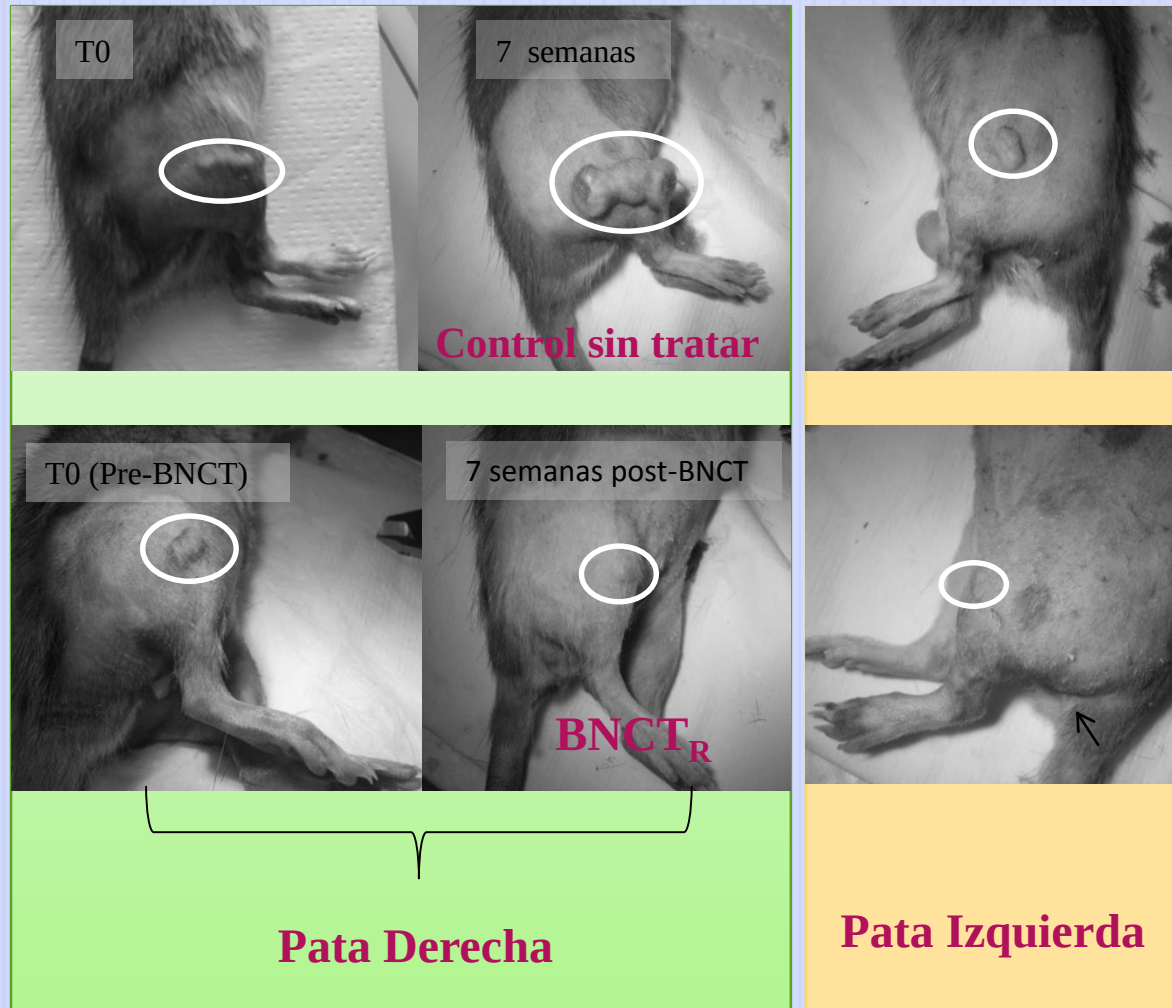


Volumen tumoral de pata izquierda (mm³)



Una respuesta positiva a BNCT (volumen tumoral post/pre <1) en la pata derecha tratada indujo un efecto abscopal en el tumor de la pata izquierda.

Ejemplo Representativo



CONCLUSIÓN

- El presente estudio, aunque preliminar y realizado en un modelo animal simple, proporciona evidencia que la respuesta de un tumor a BNCT es capaz de inducir un efecto abscopal por sí solo.
- Los efectos abscopal se observaron exclusivamente entre ratas que también mostraron una respuesta local a BNCT.

Se postula que tras la muerte de células tumorales se activa el sistema inmune que a través de los ganglios linfáticos conduciría al rechazo de los tumores primarios o metastásicos.

En general para aumentar éste efecto se combina con terapias inmunológicas



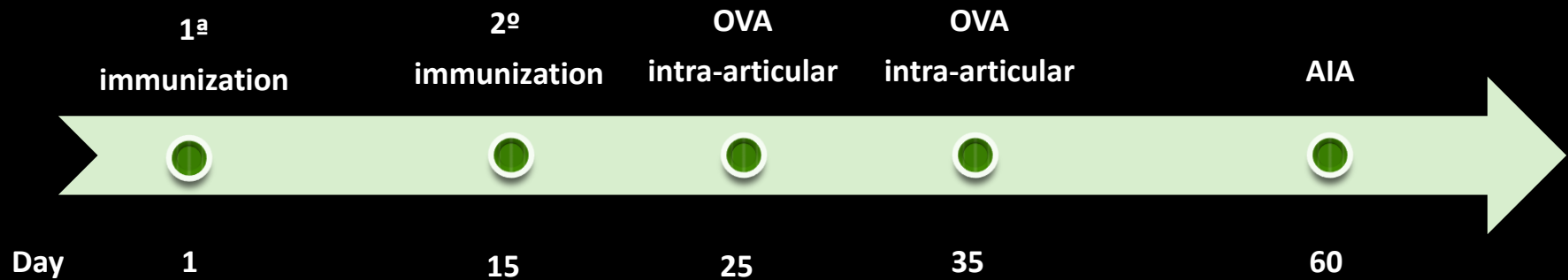
**Estudiar BNCT + BCG como terapia
inmunológica**

CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO COMO TERAPIA PARA ARTRITIS REUMATOIDEA (BNCS)

- ❖ Se exploran nuevas aplicaciones de BNCT como el tratamiento de artritis reumatoidea (AR), buscando dañar selectivamente la membrana sinovial patológica.
- ❖ La aplicación de BNCT al tratamiento de la artritis (BNCS: Boron Neutron Capture Synovectomy)) se ha explorado previamente con otros compuestos borados
- ❖ En estudios previos de biodistribución de los compuestos borados BPA y GB-10 administrados por vía intra-articular (ia) en un modelo de artritis inducida por antígeno en conejos hembras *New Zealand* (AIA) demostramos la incorporación de [B] terapéuticas a la membrana sinovial patológica.

Nuestro objetivo fue realizar estudios de BNCS en el Reactor Nuclear RA-1 a baja dosis (2.4 a 3.9 Gy a sinovial) empleando BPA (0.26 mg ^{10}B) y GB-10 (5 mg ^{10}B) administrados ia en 3 conejos AIA (6 articulaciones) por grupo.

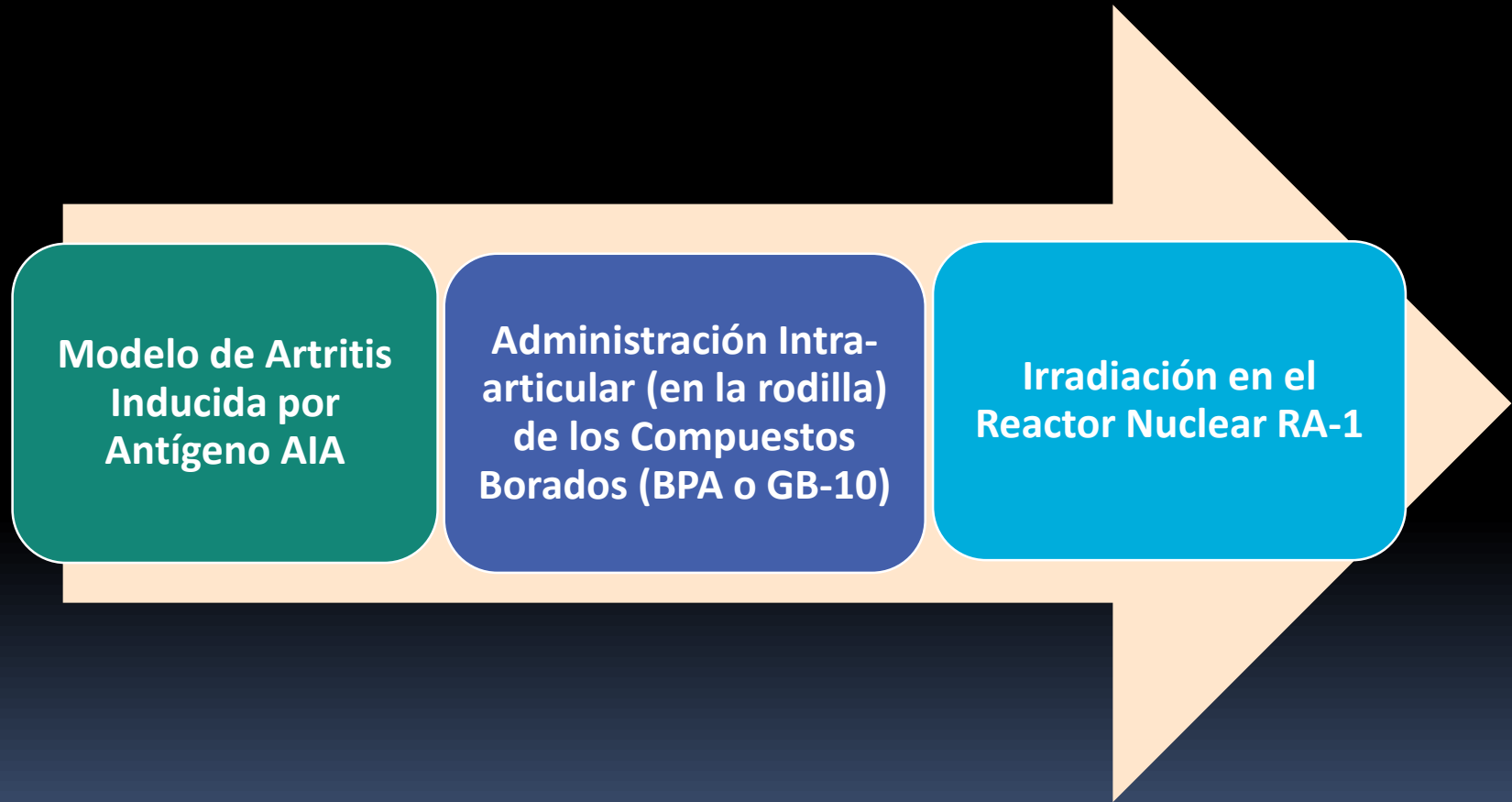
Modelo de Artritis Inducida por Antígeno (AIA) en conejos



Immunization: ovoalbumin (OVA) (1 mg/ml; 1:1 complete Freund's adjuvant (AFC)) intra-dermal .

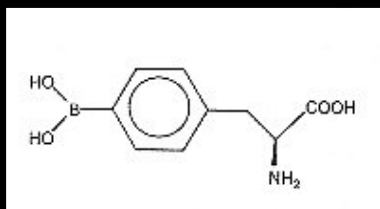
OVA Intra-articular: OVA (1 mg/ml) intra-articular.

Esquema de Tratamiento

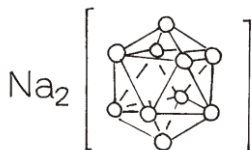


In vivo BNCS (Boron Neutron Capture Synovectomy)

BPA
p-Borono-phenylalanine



GB-10 Sodium
decahydrodecaborate



Intra-articular (ia)
administration

15 min. post-
administration



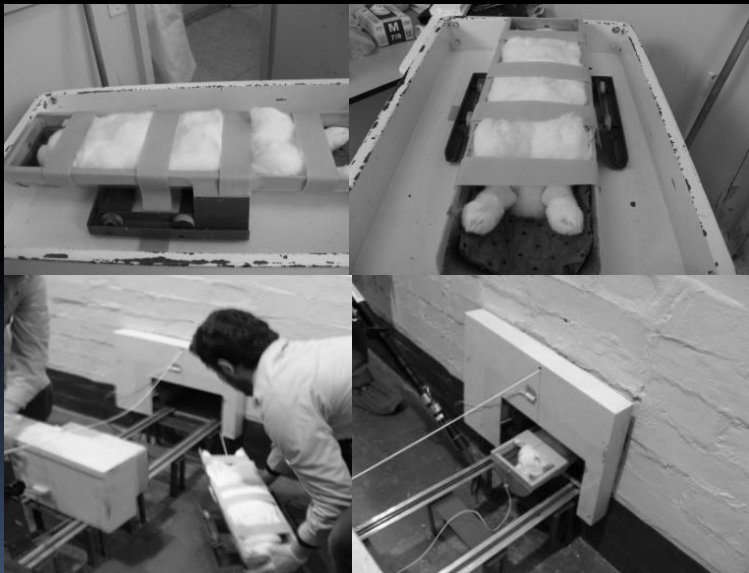
Irradiations at the
thermal column of
RA-1 Nuclear
Reactor

The administration protocols and boron concentration values were taken from our previous biodistribution study

Tissue	GB-10 10mg ¹⁰ B/ml (5mg ¹⁰ B) ia; 30 min. post	BPA 0.14M (0.7mg ¹⁰ B) ia; 13-17 min. post
Blood	63.2 ± 5.5 N=2	0.5 ± 0.03 N=2
Synovium	928.4 ± 1180.7 N=4	159.0 ± 65.0 N=4
Cartilage	669.5 ± 204.7 N=4	127.8 N=1
Tendon	771.8 ± 1317.6 N=4	15.7 ± 15.1 N=3
Muscle	8.1 ± 2.8 N=4	1.7 ± 0.9 N=3
Skin	151.9 ± 158.2 N=4	2.5 ± 1.2 N=3

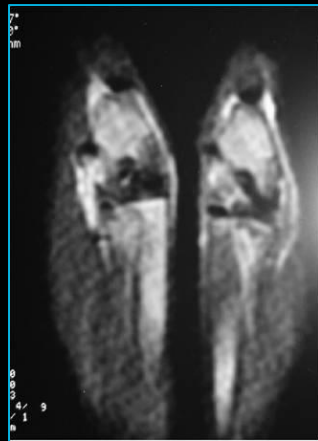
*Taken from Trivillin et al. 2014

Reactor Nuclear RA-1

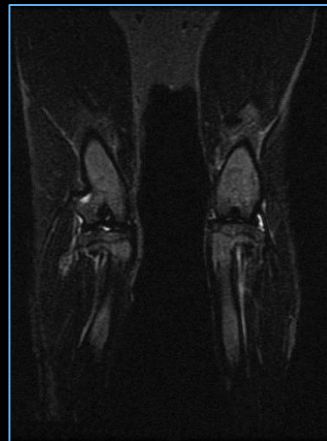


- ✓ Dispositivo diseñado ad hoc para transportar el conejo a la posición de irradiación con poleas.
- ✓ Los animales fueron colocados boca arriba, con sus patas traseras hacia el núcleo del Reactor.
- ✓ La configuración geométrica no implica blindaje del cuerpo. Por eso usamos dosis bajas.

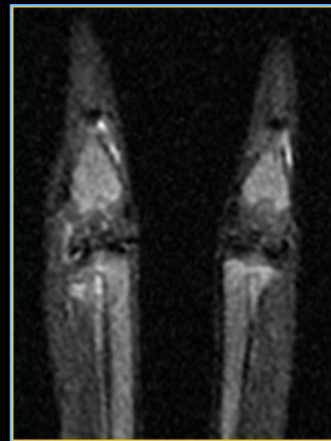
Estudios de RMN de articulaciones femorotibiorotuliana de AIA-BNCT, reveló en el 100% de los casos imágenes similares a las de grupo control sin AIA (C), sin necrosis y sin derrame peri-articular.



Untreated AIA joint



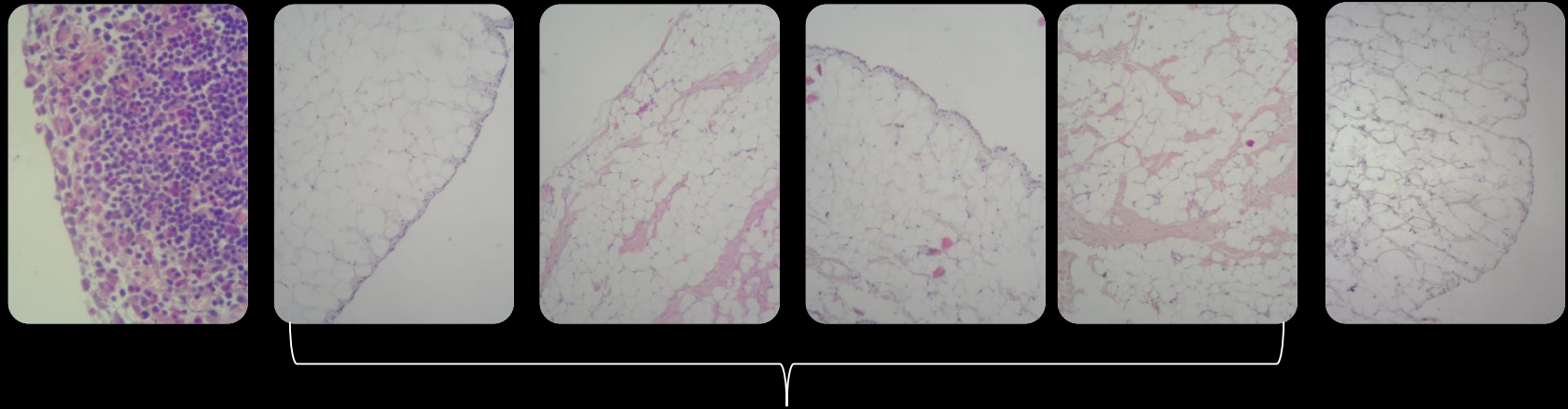
AIA joints treated with BNCS



Normal joint



MRI score based on the following end-points: degree of hydroarthrosis in the joint space (0: none, 1: slight, 2: moderate, 3: severe); alterations in the subchondral bone (hyperintensity scored from 0 to 3), and alterations in the peri-articular soft tissue scored from 0 to 3. The final score (0 to 9) was computed for each group by adding the scores corresponding to the 3 end-points.



Untreated AIA joint

AIA joints treated with BNCS

Normal joint

El estudio histológico de membranas sinoviales obtenidas post-mortem (3 observadores independientes, 50 campos/muestra) mostró en 70 a 100% de los campos de AIA-BNCT características histológicas similares a las de C (sin hiperplasia de sinoviotelio, escaso o nulo infiltrado linfoplasmocitario, angiogénesis conservada). En 3/6 conejos se observaron algunas zonas con fibrosis.

CONCLUSIÓN

Dos meses post-tratamiento se evaluaron clínica, bioquímica e imagenológicamente. Los animales tratados (AIA-BNCS) no presentaron tumefacción, ni dolor frente a la palpación en las articulaciones.

GB-10-BNCS y BPA-BNC S, aún a bajas dosis, podrían considerarse terapéuticamente útiles para el tratamiento local de artritis.



Gracias !!!

verotrivillin@gmail.com