

Biodistribución de Boro *in vivo*

Lic. Marina Carpano

División Bioquímica Nuclear
Departamento de Radiobiología
Centro Atómico Constituyentes
CNEA

carpano@cnea.gov.ar

Estudios de biodistribución in vivo

- Se realizan para conocer la **cinética del compuesto borado** administrado en un modelo animal
- Permite conocer el **tiempo** al cual se produce la **máxima concentración de boro** en el **tejido tumoral** y su relación con la concentración de boro en sangre y tejidos normales
- Esta información es importante para poder **planificar el tiempo de irradiación**
- En los estudios de biodistribución *in vivo* podemos **estudiar distintos compuestos borados, distintas dosis de compuestos borados, distintas vías de administración** del compuesto o **administración combinada** de compuestos borados que permitan **aumentar la cantidad de boro** en el tejido tumoral
- Los estudios de biodistribución *in vivo* permiten **relacionar la captación de boro con otros factores biológicos**

Ejemplos de estudios de biodistribución in vivo

Modelo animal

Ratones nude implantados con células humanas de cáncer de tiroides o melanoma



Perros portadores de cáncer de tiroides espontáneo



Administración de compuestos borados

BPA
BOPP
BPA + BOPP

Análisis del contenido de boro en cada tejido

ICP
Autorradiografía

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Ratones *nude* implantados con células humanas de tiroides

- Compuesto BPA a distintas dosis (350 y 600 mg/kg p.c.)
- Compuesto BOPP a distintas dosis (10 y 100 mg/kg p.c.)
- Combinación de compuestos borados BOPP (60 mg/kg p.c.) + BPA (350 mg/kg P.C.)



Se cultivan líneas celulares



Se implantan subcutáneamente 1.500.000 células en el flanco posterior derecho de los ratones



A los 15 días del crecimiento tumoral se realiza el estudio de biodistribución con el compuesto BPA

Biodistribución in vivo

Modelo cáncer de tiroides

Ratones *nude* implantados con células humanas de cáncer de tiroides.

- Se administración BPA de forma intraperitoneal (IP).

Grupo 1: (350mg/Kg p.c.) Dosis utilizada en tratamientos clínicos.

Grupo 2: (600 mg/Kg p.c) Dosis alta.

- A distintos tiempos post administration del BPA se van sacrificando los animales y se guardan los diferentes tejidos de interes para luego analizar el contenido de boro en cada uno de ellos.
- Los tejidos que se utilizan son: Tumor, piel distal al tumor, piel circundante, hígado, bazo, riñón, pulmón, tiroide y sangre.
- Se pesa cada tejido y se realiza la digestión del tejido en una solución de ácido nítrico y sulfúrico.
- La medición de boro se realiza en el ICP.

Biodistribución in vivo

Modelo cáncer de tiroides.

Ratones nude implantados con células humanas de cáncer de tiroides.

Biodistribución de BPA (350 mg/Kg p.c)

	30 MIN	60 MIN	90 MIN	120MIN	150MIN
Tumor	12.45±0.76	17.27± 1.91	15.54 ± 2.07	11.4 ± 1.17	9.94 ± 0.82
Sangre	9.63 ±1.19	3.74 ± 0.60	3.64 ± 0.57	2.61 ± 0.39	2.03 ± 0.2
Piel circundante	12.32 ± 3.99	11.22 ± 2.8	10.12 ± 0.38	7.33 ± 1.63	9.48 ± 1.2
Piel distal	4.81 ± 1.28	5.98 ± 0.59	6.19 ± 0.42	3.91 ± 0.98	4.23 ± 0.66
Hígado	4.56 ± 0.78	6.39 ± 0.94	5.24 ± 0.56	4.24 ± 0.38	3.60 ± 0.5
Bazo	9.74 ± 1.18	7.88 ± 0.36	7.92 ± 1.22	6.49 ± 0.78	5.21 ± 0.88
Riñón	18.99 ± 1.57	15.66 ± 1.87	12.49 ± 0.85	5.76 ± 0.69	6.57 ± 0.68
Pulmón	7.7 ± 0.48	5.87 ± 0.54	5.19 ± 0.76	4.85 ± 0.28	3.62 ± 0.74
Tiroide	7.16 ± 0.65	5.57 ± 0.9	6.35 ± 1.96	4.67 ± 0.79	5.57 ± 0.97

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Ratones *nude* implantados con células humanas de cáncer de tiroides.

Biodistribución de BPA (600 mg/Kg p.c)

	30 MIN	60 MIN	90 MIN	120MIN	150MIN
Tumor	17.89 $\pm$ 1.9	21.25 $\pm$ 1.49	23.89 $\pm$ 4.71	19.49 $\pm$ 1.1	19.50 $\pm$ 2.9
Blood	13.97 $\pm$ 1.61	10.85 $\pm$ 1.25	7.62 $\pm$ 1.43	8.20 $\pm$ 1.29	7.49 $\pm$ 1.4
S Skin	11.83 $\pm$ 1.89	13.71 $\pm$ 0.88	11.99 $\pm$ 0.83	10.6 $\pm$ 1.79	7.62 $\pm$ 0.64
D Skin	9.11 $\pm$ 1.14	10.17 $\pm$ 0.92	8.98 $\pm$ 1.67	9.15 $\pm$ 0.56	6.13 $\pm$ 0.77
Liver	9.09 $\pm$ 0.77	7.72 $\pm$ 0.59	5.41 $\pm$ 0.51	5.68 $\pm$ 0.79	4.47 $\pm$ 0.77
Spleen	11.98 $\pm$ 0.70	10.57 $\pm$ 0.63	8.35 $\pm$ 1.12	8.48 $\pm$ 1.44	5.11 $\pm$ 0.57
Kidney	27.28 $\pm$ 1.78	20.59 $\pm$ 0.63	16.88 $\pm$ 1.2	14.71 $\pm$ 1.6	10.39 $\pm$ 1.8
Lung	8.0 $\pm$ 0..59	8.23 $\pm$ 0.69	5.62 $\pm$ 0.81	5.84 $\pm$ 0.84	4.57 $\pm$ 0.66
Thyroid	8.52 $\pm$ 1.55	9.32 $\pm$ 1.09	8.54 $\pm$ 0.35	8.32 $\pm$ 2.84	2.2 $\pm$ 0.26

**Dagrosa MA, et al. Thyroid 12(1): 7-12;
2002**

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Ratones *nude* implantados con células humanas de cáncer de tiroides.

Biodistribución de BPA

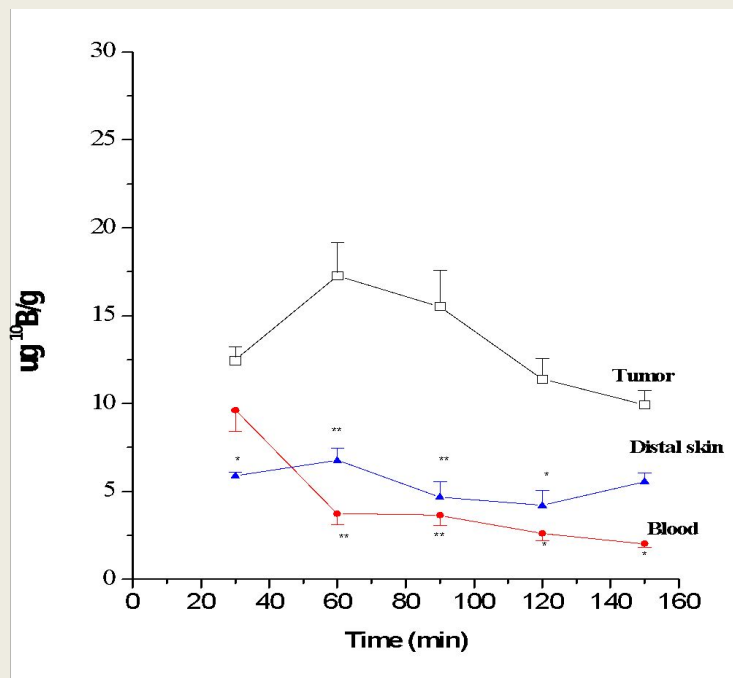


Figura 5: Biodistribución de BPA (350mg/Kg b.w) en tumor, piel distal y sangre.

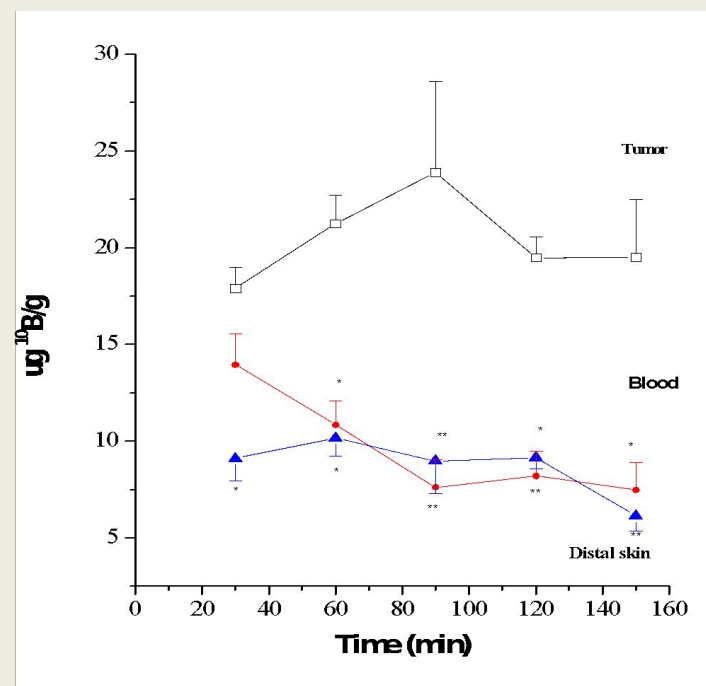


Figura 6: Biodistribución de BPA (600 mg/Kg b.w) en tumor, piel distal y sangre.

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Ratones *nude* implantados con células humanas de cáncer de tiroides

Biodistribución de BOPP

Dosis: 10 mg/Kg

p.c.

Via	Tumor	S Skin	D Skin	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Thyroid	Blood
i.p	2.15 ±0.4	2.8±0.24	1.27±0.34	1.72±0.24	5.08±0.62	2.55±0.15	1.58±0.37	1.56±0.56	1.39±0.11
i.v	1.78±0.24	1.73±0.44	2.45±0.17	0.92±0.21	5.23±0.65	1.82±0.33	1.65±0.34	1.57±0.62	1.78±0.19

Dosis: 100 mg/Kg

p.c.

Via	Tumor	S Skin	D Skin	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Thyroid	Blood
i.p	16.59±2.6	18.76±2.7	6.47±0.2	27.9±4.56	73.71±5.2	52.35±4.6	22.61±2.1	15.6±2.15	21.4±2.15
i.v	8.01±8.1	9.35±2.44	56.9±15	9.8±1.65	20.61±2.2	10.28±1.9	7.28±2.28	5.94±2.34	6.9±0.19

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Ratones *nude* implantados con células humanas de cáncer de tiroides

Biodistribución de BOPP y BPA Combinados

	Day 1	Day 3	Day 4	Day 5	Day 7
Tumor	22.92 $\pm$ 1.38	25.98 $\pm$ 3.3	26.59 $\pm$ 3.4	45.19 $\pm$ 5.77	37.76 $\pm$ 2.84
Blood	23.74 $\pm$ 1.38	18.25 $\pm$ 2.57	14.62 $\pm$ 1.54	12.02 $\pm$ 1.02	10.88 $\pm$ 0.88
S Skin	26.95 $\pm$ 237	24.16 $\pm$ 7.97	40.58 $\pm$ 16.22	31.74 $\pm$ 3.34	33.79 $\pm$ 1.22
D Skin	42.23 $\pm$ 6.08	20.06 $\pm$ 6.37	26.61 $\pm$ 6.8	25.59 $\pm$ 1.76	23.25 $\pm$ 0.70
Liver	34.8 $\pm$ 1.76	33.50 $\pm$ 7.25	34.55 $\pm$ 2.19	21.7 $\pm$ 1.01	19.00 $\pm$ 0.79
Spleen	29.14 $\pm$ 6.69	25.66 $\pm$ 5.36	21.23 $\pm$ 1.14	20.12 $\pm$ 1.21	19.14 $\pm$ 0.88
Kidney	41.2 $\pm$ 0.09	43.68 $\pm$ 5.27	37.82 $\pm$ 3.93	28.05 $\pm$ 1.57	28.24 $\pm$ 2.71
Lung	27.21 $\pm$ 3.25	38.86 $\pm$ 4.14	19.12 $\pm$ 3.96	15.82 $\pm$ 1.23	26.35 $\pm$ 1.75
Thyroid	9.55 $\pm$ 2.83	10.02 $\pm$ 1.72	10.22 $\pm$ 2.79	6.79 $\pm$ 1.2	5.30 $\pm$ 0.83

Dagrosa M.A, et al. Molecular Pharmaceutics 2(2) : 151-156;
2005

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Perros con cáncer de tiroides espontáneo

- Se estudiaron **6 perros portadores de cáncer espontáneo de tiroides** de diferentes razas entre Noviembre de 2002 y Abril de 2004.
- Se realizó el estudio de **biodistribución** con consentimiento informado firmados por sus dueños.
- Este estudio se realizó en el **Hospital Escuela de la Facultad de Veterinaria de la UBA** con el Dr. Veterinario Victor Castillo
- Los animales anesteciados fueron inyectados (i.v) durante **60 minutos** con **BPA** en una dosis de **50mg/Kg p.c.**
- Inmediatamente después de la infusión se realizó la **tiroidectomía**.
- Se obtuvieron **muestras de sangre** durante todo el procedimiento.
- Se tomaron muestras de **distintas áreas tumorales**.
- Cada muestra de tumor fue dividida en dos partes, en una se estudió el **contenido de B** y en la otra se analizó la **histología** con el Dr. Cabrini.

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Perros con cáncer de tiroides espontáneo

Dog(# and Name)	Breed	Body Weight(Kg)	Age	Sex	T/B	T/Th
# 1 Tania	Rott-Weiler	45	8	Female	2.02 (5.54-0.49)	6.78
# 2 Sheila	Beagle	12	5	Female	2.60 (8.36-0.91)	
# 3 Zenga	Mongrel	9	13	Female	2.22 (3.57-0.33)	
# 4 Brett	Pointer	31	8	Male	3.76 (4.64-2.31)	
# 5 Pipo	Boxer	30	8	Male	3.92 (2.45-6.33)	
# 6 Nico	Mongrel	14	14	Male	6.27 (2.32-10.48)	

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

Perros con cáncer de tiroides espontáneo

Resultados Histológicos: Cáncer de tiroides Espontáneo en perros

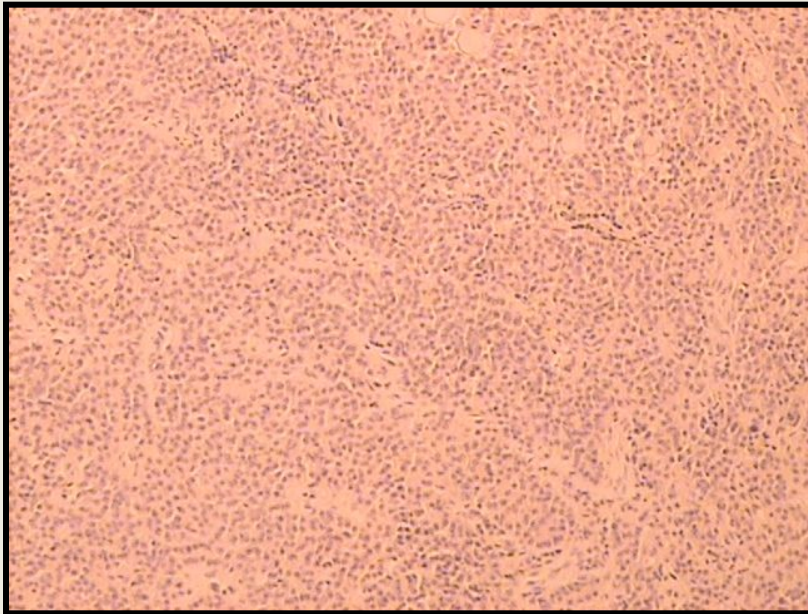


Figura 12A: Tumor homogéneo, 10X
(Perros #2, 4, 5 y 6).

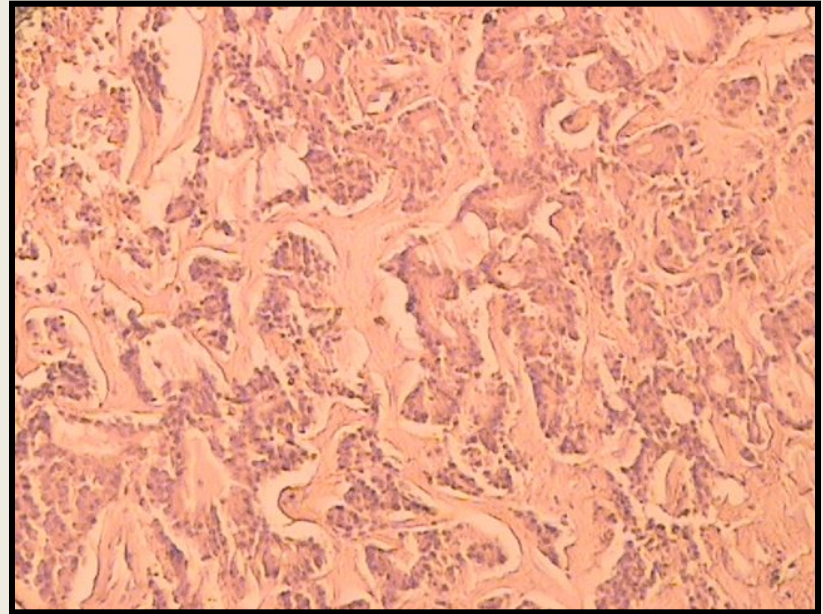


Figura 12 B: Tumor heterogéneo, 10X
(Perros #1 y 3).

Biodistribución *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

- Resumen estudios de biodistribución en ratones con cáncer de tiroides

Compuesto	BPA	BPA	BOPP	BOPP	BOPP + BPA
Dosis	350 mg/kg p.c	600 mg/kg p.c	100 mg/kg p.c.	100 mg/kg p.c.	60 y 350 mg/kg p.c.
Tiempo	60 min	90 min	1 Día	2 Días	5 Días
ppm B en Tumor	17,27	23,89	2,15	16,59	45,19

- Resumen estudios de biodistribución en perros con cáncer de tiroides espontáneo

Compuesto	BPA
Dosis	50 mg/kg p.c.
Tiempo	60 min
Tumor/sangre	2,02
Tumor/tejido normal	6,78

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones *nude* implantados con células humanas de melanoma

- Compuesto BPA a una dosis de 350 /kg p.c.



Se cultivan líneas celulares de melanoma.



Se implantan subcutáneamente 3.000.000 células en el flanco posterior derecho de los ratones.



A los 30 días del crecimiento tumoral se realiza el estudio de biodistribución con el compuesto BPA.

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

- La administración del BPA es intraperitoneal (IP).
- A distintos tiempos post administration del BPA se van sacrificando los animales y se guardan los diferentes tejidos de interes para luego analizar el contenido de boro en cada uno de ellos)
- Los tejidos que se utilizan son: Tumor, piel distal al tumor, sangre, hígado, bazo, riñón y pulmón.
- Se pesa cada tejido, se realiza la digestión del tejido en una solución de ácido nítrico y sulfúrico.
- La medición del contenido de B se realiza en el ICP
- Se realizan estudios de autorradiografía para ver la distribución espacial del B
- Se realizan estudios de la temperatura tumoral por termografía para relacionar con la captación de B

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

Estudios de biodistribución del compuesto BPA

Tejido	0.5 h	1 h	2 h	3 h
Tumor	15.8 ± 2.3	22.3 ± 1.9**	25.9 ± 2.6***	19.8 ± 2.9
Sangre	7.2 ± 1.2	8.8 ± 1.9	6.0 ± 1.7	3.5 ± 1.0
Piel distal	10.9 ± 1.6	12.2 ± 2.2	10.4 ± 2.3	8.6 ± 2.3
Piel circundante	11.2 ± 2.0	15.3 ± 2.4	13.0 ± 2.3	10.9 ± 2.8
Hígado	10.4 ± 2.4	8.6 ± 1.4	6.8 ± 1.6	4.5 ± 1.3
Bazo	14.1 ± 2.5	13.7 ± 2.0	13.4 ± 2.8	7.1 ± 2.0
Riñón	27.3 ± 3.1	33.5 ± 2.7	17.3 ± 2.6	14.9 ± 3.3
Pulmón	12.1 ± 19	11.3 ± 1.7	8.7 ± 2.3	6.0 ± 1.8

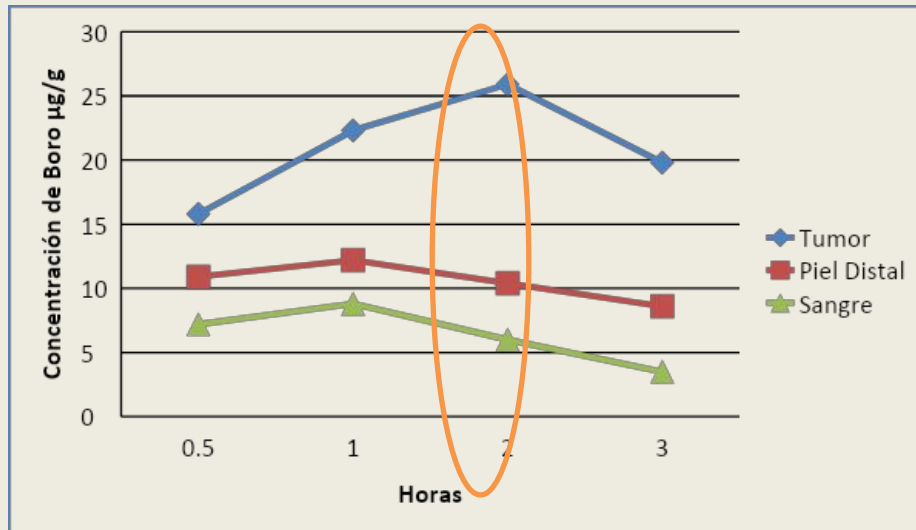
Concentración de boro en diferentes tejidos de ratones NIH nude implantados con células de melanoma humano (MEL J). La concentración de ^{10}B se midió por ICP-OES. Las mediciones se realizaron a diferentes tiempos después de la inyección i.p. de BPA a una dosis de 350 mg/Kg p.c. Los valores son el promedio $\pm$ SEM con n = 10 ratones por cada grupo experimental. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

Estudios de biodistribución del compuesto BPA



A las 2 hs post administración de BPA: Tumor/Sangre (**T/S**) = **4,3** y Tumor/ Piel (**T/P**) = **2,5**

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

Resumen estudios de biodistribución en ratones con melanoma

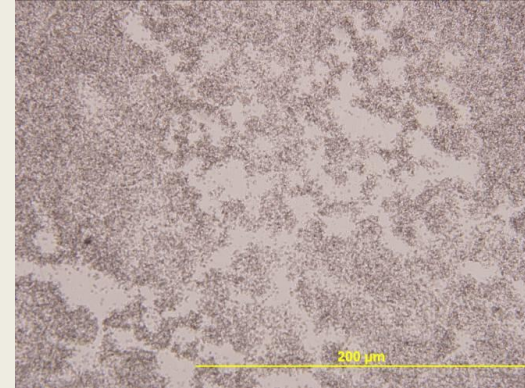
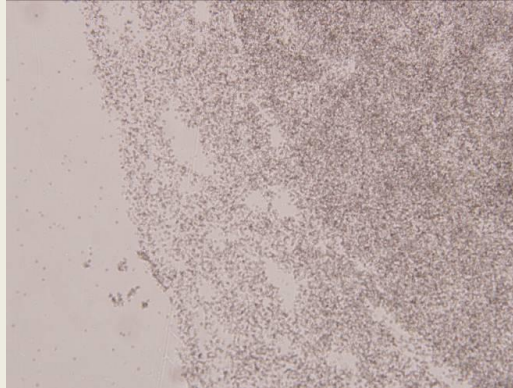
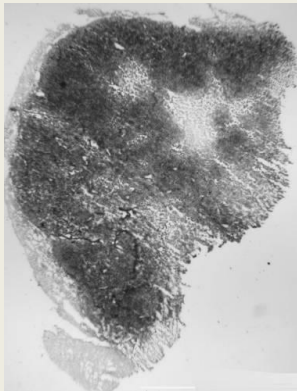
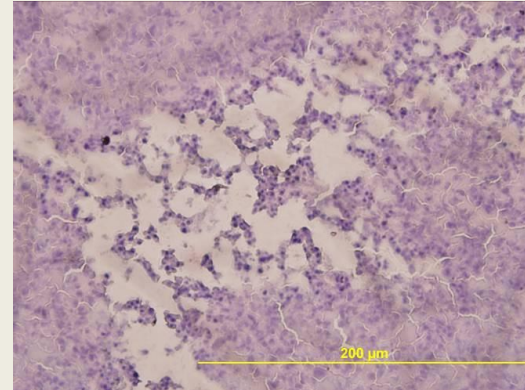
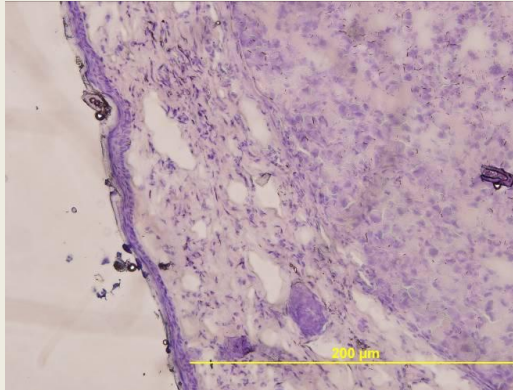
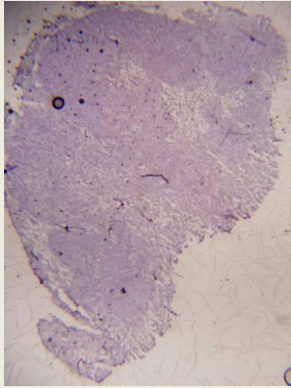
Tiempo	ppm B Tumor	Tumor/sangre	Tumor/Piel
0,5 h	15,8	2,2	1,4
1 h	22,3	2,5	1,8
2 h	25,9	4,3	2,5
3 h	19,8	5,7	2,3

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

Estudios de autorradiografía



Muestra tumoral de melanoma, tinción con hematoxilina y su correspondiente imagen autorradiográfica (1,25X y 20X). La captación del tumor es 3 veces mayor a la captación de la piel (A.Portu *et al*, 2010)

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

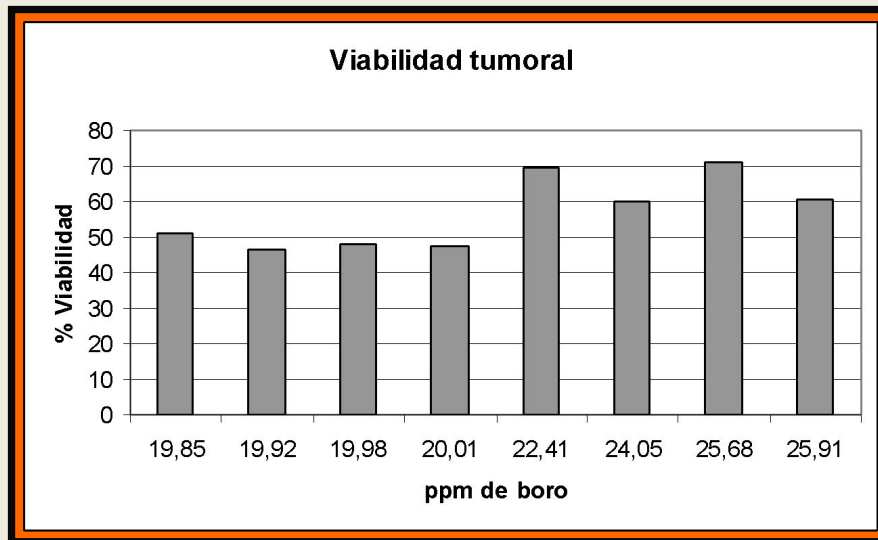
Ratones *nude* implantados con células humanas de melanoma

Análisis histológico individualizado de los tumores



Para los **estudios de histológicos e inmunohistoquímicos** se exploró en cortes histológicos tumorales de 10 μm de espesor una banda rectangular, tomando imágenes consecutivas, que abarca la zona central de cada corte histológico de 300 x 6400 μm aproximadamente. Esta zona comprende todo el crecimiento del tumor.

Esto permite valorar con regularidad en diferentes animales todo tipo de respuesta observable a nivel celular.



Tumores con menos de 20 ppm de B presentan menos del 50% de viabilidad tumoral

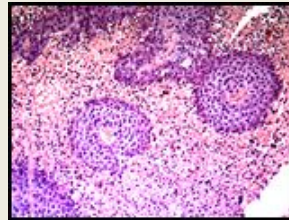
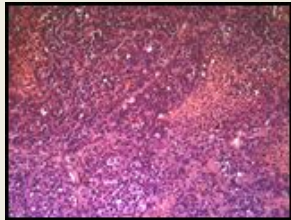
Tumores con más de 20 ppm B presentan más del 50% de viabilidad tumoral

Biodistribución *in vivo*

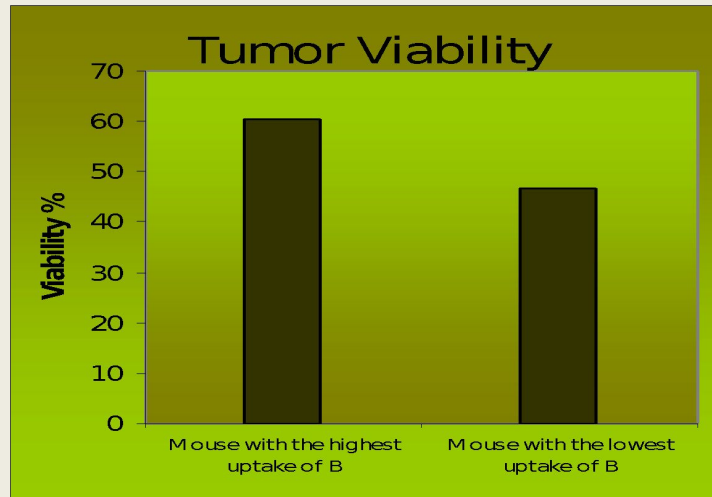
Modelo melanoma

Ratones *nude* implantados con células humanas de melanoma

Análisis histológico individualizado de los tumores



Tumor	25.91 ppm	19.92 ppm
Sangre	4.24	2.95
Piel distal	8.41	6.85
T/S	6.11	6.75
T/PD	3.08	2.91



Los tumores con grandes áreas de viabilidad tumoral presentaron valores de captación de B más elevados.

% de Viabilidad Tumoral y su relación con la captación de B
Cortes histológicos, aumento 10X, tinción HE

Biodistribución *in vivo*

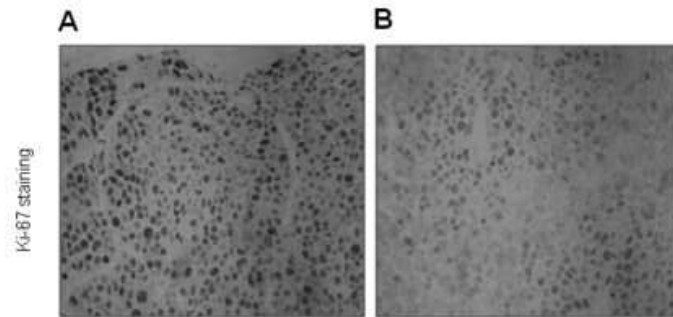
Modelo melanoma

Ratones *nude* implantados con células humanas de melanoma

Estudios inmunohistoquímicos en muestras tumorales

Proliferación celular

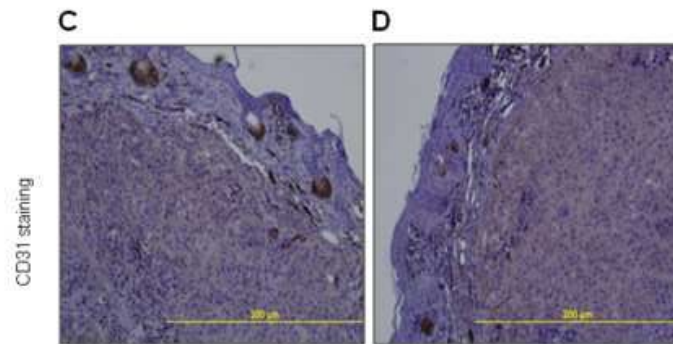
Proliferación celular (ki-67)



A: Tumor con máxima captación de boro presenta mayor proliferación celular. **B:** Tumor con mínima captación de boro presenta menor proliferación celular.

Inmunohistoquímica con anti KI-67 (20X)

Vascularización (CD31)



C: Tumor con máxima captación de boro presenta vasos peritumoral grandes. **D:** Tumor con mínima captación de boro presenta vasos peritumorales pequeños.

Tinción con H-E e inmunohistoquímica con anti-CD31 (20x)

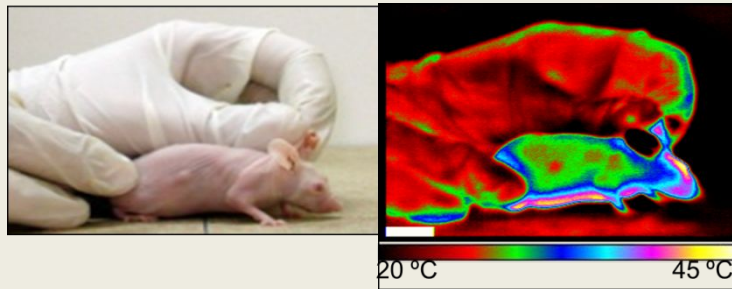
Vascularización tumoral

Biodistribución *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

Estudios de temperatura tumoral por Termografía infrarroja



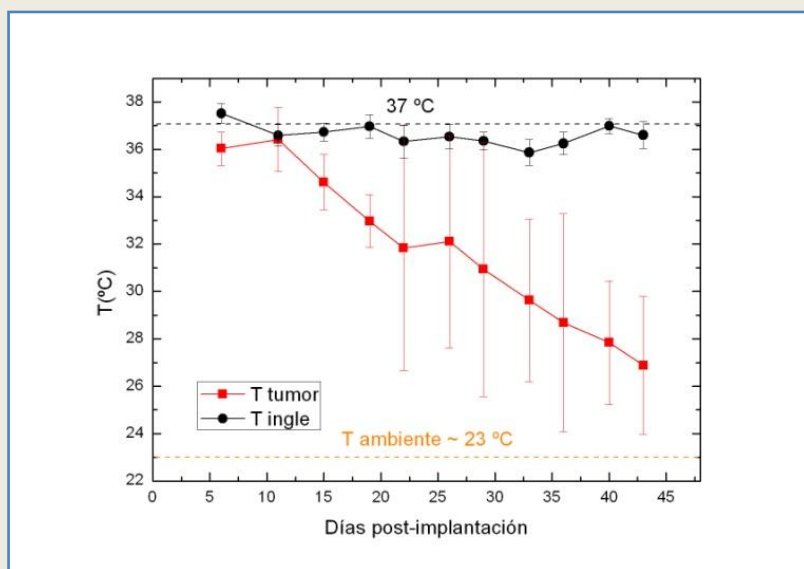
- Se utiliza una cámara Raytheon Palmir 250 (L3 Comm. Systems), sensible a la radiación infrarroja en la banda de longitud de onda de 7-14 micrómetros. Alcanza una resolución espacial de 0,39 mm / pixel.
- Los animales son sujetados con la mano por 5 segundos mientras se toma la imagen infrarroja. Las observaciones se realizaron para cada ratón en el flanco posterior derecho) y se midió la temperatura corporal en la ingle con una termocupla. Este procedimiento no requiere anestesia ya que no provoca dolor y no es invasivo.
- Se relaciona la temperatura de cada tumor con la captación de B de cada obtenida en el estudio de biodistribución del compuesto BPA (350 mg/kg de p.c.)

Biodistribución *in vivo*

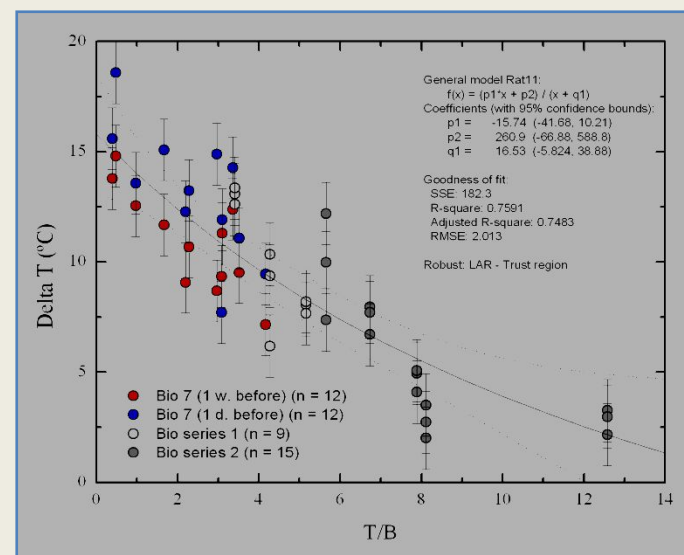
Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

Estudios de temperatura corporal por Termografía infrarroja



La temperatura del tumor siempre disminuye a medida que el tumor crece, con valores entre 37 y 23 °C. La temperatura corporal se mantiene en los 37°C. Temperatura corporal medida con una termocupla en la ingle del ratón.



Delta de temperatura (Temperatura corporal – Temperatura tumoral) vs relación en la concentración de ^{10}B entre el tumor y la sangre (T/B). A mayor temperatura tumoral mayor T/B

Muchas gracias!

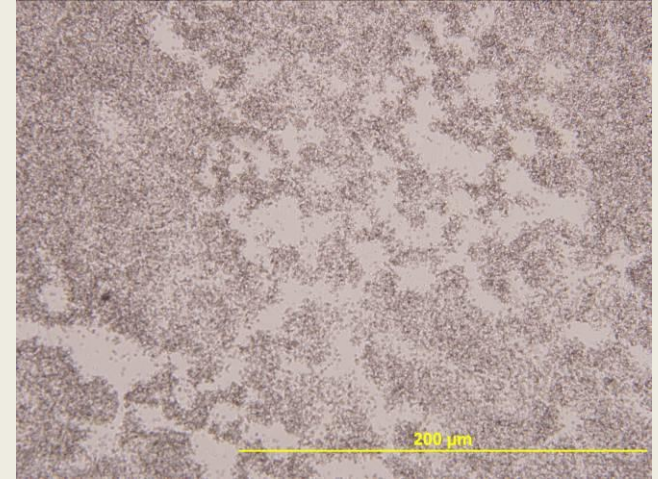
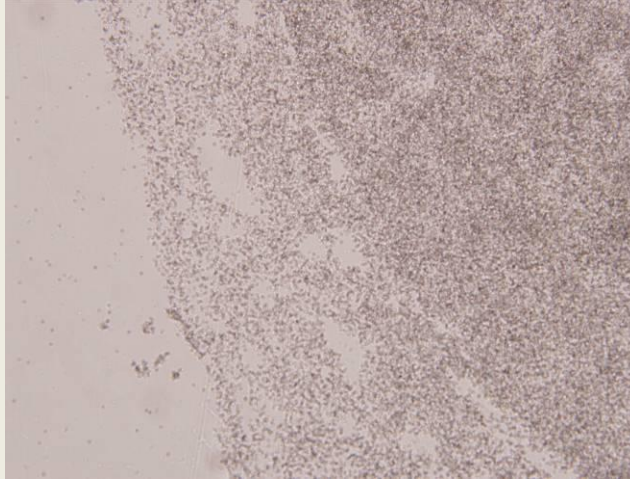
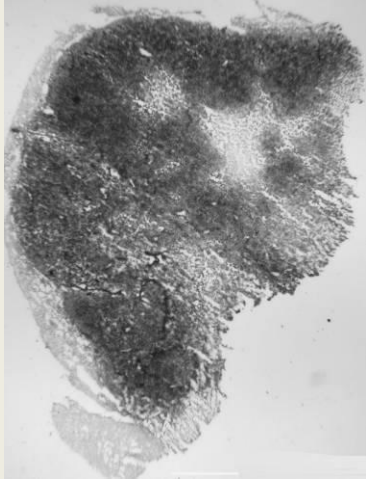
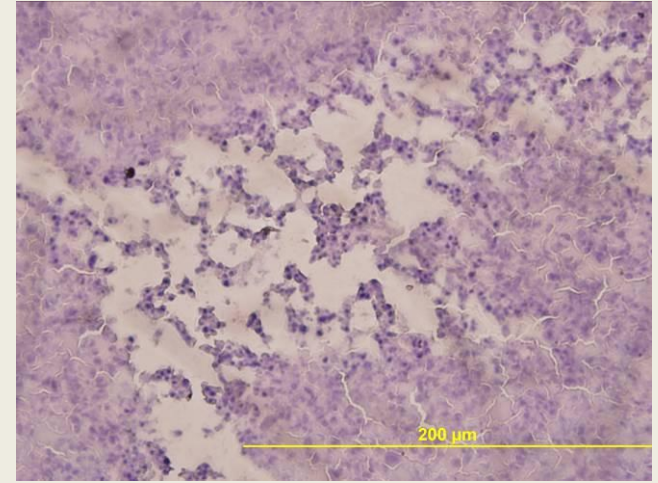
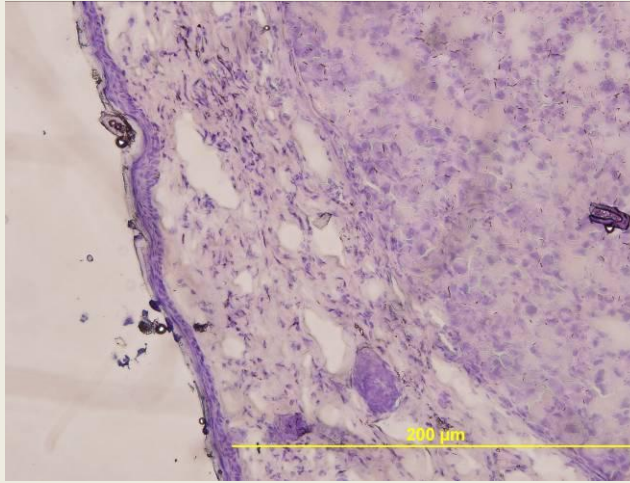
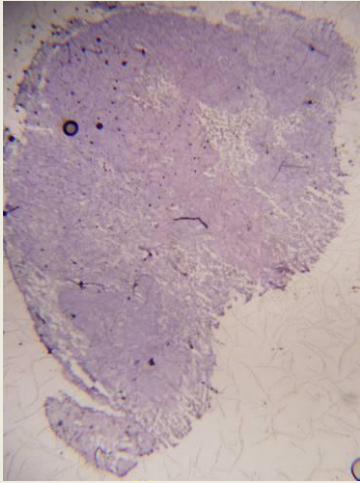
**Grupo BNCT Cáncer de Tiroides y Melanoma
División Bioquímica Nuclear
Departamento de Radiobiología
Centro Atómico Constituyentes
CNEA**

**Dr. María Alejandra Dagrosa
Lic. Marina Carpano
Lic. Carla Rodríguez**

Estudios de autorradiografía

- La medición de la densidad de trazas en la imagen autorradiográfica en un detector de trazas nucleares, producida por una muestra de tejido que contenga ^{10}B , permite la determinación de la concentración de boro en la muestra.
- Al colocar un corte de tejido con ^{10}B en contacto con un detector de trazas nucleares (SSNTD) y exponerlo a un flujo de neutrones térmicos, las partículas resultantes de la reacción de captura provocan un daño permanente en el detector.
- Procesando el SSNTD adecuadamente, las trazas son amplificadas a nivel de microscopía óptica y forman una imagen autorradiográfica, que puede proveer un mapeo de la biodistribución de ^{10}B en el tejido de interés.

Estudios de autorradiografía



Muestra tumoral de melanoma, tinción con hematoxilina y su correspondiente imagen autorradiográfica (1,25X y 20X). La captación del tumor es 3 veces mayor a la captación de la piel (A.Portu *et al*, 2010)