

# **BNCT *in vivo***

**Lic. Marina Carpano**

División Bioquímica Nuclear  
Departamento de Radiobiología  
Centro Atómico Constituyentes  
CNEA

[carpano@cnea.gov.ar](mailto:carpano@cnea.gov.ar)

# Estudios de BNCT *in vivo*

## Fundamentos

- La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (**BNCT**) es una modalidad de **tratamiento binario** del cáncer que combina la irradiación con un **haz de neutrones térmicos o epitérmicos** con **compuestos de  $^{10}\text{B}$**  que se incorporan preferencialmente a las células tumorales. Las partículas  $\alpha$  de alta transferencia lineal de energía (LET) y los núcleos de  $^7\text{Li}$  emitidos durante la reacción de captura neutrónica de un átomo de  $^{10}\text{B}$  tienen un alcance de 5-9  $\mu\text{m}$  en el tejido (aproximadamente el diámetro de una célula) y se sabe que tienen una elevada efectividad biológica (Coderre y Morris, 1999).
- Los **ensayos clínicos de BNCT** realizados y/o en curso para el tratamiento de Glioblastoma Multiforme y Melanoma, y más recientemente, de cáncer de cabeza y cuello, metástasis hepáticas y tumores en pulmón, en EE.UU., Europa, Argentina, Taiwan y Japón empleando reactores nucleares como fuentes de neutrones han demostrado una ventaja terapéutica potencial para esta técnica (ej. Barth et al., 2012).
- Para **optimizar la eficacia terapéutica de BNCT** se emplean **modelos *in vivo*** para comprender los distintos aspectos de la radiobiología de BNCT, evaluar efectos radiotóxicos de la terapia, estudiar nuevos modelos tumorales en los cuales se pueda aplicar BNCT, se pueden evaluar nuevas estrategias, compuestos borados nuevos y distintas formas de administración.
- **Todos estos estudios tienen como fin incrementar el conocimiento sobre la terapia BNCT y aportar información para los tratamientos clínicos.**

# Estudios de BNCT *in vivo*

## Fundamentos

- La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (**BNCT**) es una modalidad de **tratamiento binario** del cáncer que combina la irradiación con un **haz de neutrones térmicos o epitérmicos** con **compuestos de  $^{10}\text{B}$**  que se incorporan preferencialmente a las células tumorales. Las partículas  $\alpha$  de alta transferencia lineal de energía (LET) y los núcleos de  $^7\text{Li}$  emitidos durante la reacción de captura neutrónica de un átomo de  $^{10}\text{B}$  tienen un alcance de 5-9  $\mu\text{m}$  en el tejido (aproximadamente el diámetro de una célula) y se sabe que tienen una elevada efectividad biológica (Coderre y Morris, 1999).
- Los **ensayos clínicos de BNCT** realizados y/o en curso para el tratamiento de Glioblastoma Multiforme y Melanoma, y más recientemente, de cáncer de cabeza y cuello, metástasis hepáticas y tumores en pulmón, en EE.UU., Europa, Argentina, Taiwan y Japón empleando reactores nucleares como fuentes de neutrones han demostrado una ventaja terapéutica potencial para esta técnica (ej. Barth et al., 2012).
- Para **optimizar la eficacia terapéutica de BNCT** se emplean **modelos *in vivo*** para comprender los distintos aspectos de la radiobiología de BNCT, evaluar efectos radiotóxicos de la terapia, estudiar nuevos modelos tumorales en los cuales se pueda aplicar BNCT, se pueden evaluar nuevas estrategias, compuestos borados nuevos y distintas formas de administración.
- **Todos estos estudios tienen como fin incrementar el conocimiento sobre la terapia BNCT y aportar información para los tratamientos clínicos.**

## Estudios de BNCT *in vivo*

- Desarrollar un **modelo animal** implantando células tumorales que produzcan un **crecimiento tumoral**
- Realizar un **diseño experimental** para evaluar la terapia BNCT, el cual debe ser aprobado por un CICUAL
- Administrar un **compuesto borado** y estudiar en estos modelos la **biodistribución del compuesto** en el tejido tumoral y en tejidos sanos
- Seleccionar **el tiempo** en el cual se debe realizar la **irradiación de neutrones** para obtener la mayor eficacia en el tratamiento
- Realizar la **irradiación de neutrones** en un **reactor nuclear de investigación**
- Contar con un **dispositivo** adecuado para la irradiación de los animales, que permita **blindar** adecuadamente el cuerpo del animal y que exponga solamente al tumor al haz de neutrones.
- Con los datos obtenidos en las biodistribuciones de captación de B y el tiempo empleado en la irradiación se realizan los **estudios de dosimetría** que permiten conocer la **dosis** recibida en cada tratamiento
- Realizar el **seguimiento de cada animal** luego de aplicar la terapia BNCT
- Estudiar la **respuesta tumoral** luego de la terapia BNCT, para esto se estudia: Curva de crecimiento tumoral, evaluación de efectos radiotóxicos, estudios de histología e inmunohistoquímica sobre el tejido tumoral, etc.

# Estudios de BNCT *in vivo*

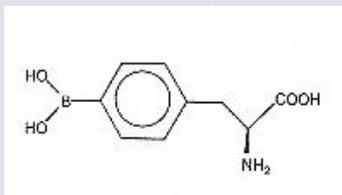


## Cultivo de células tumorales

Implantación subcutánea de las células tumorales en ratones nude



## Administración intraperitoneal de BPA



BPA



## Dispositivo para la irradiación



RA6  
Centro Atómico Bariloche,  
CNEA

# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo cáncer de tiroides

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

## Estudios *In Vivo*: Crecimiento del Tumor post BNCT

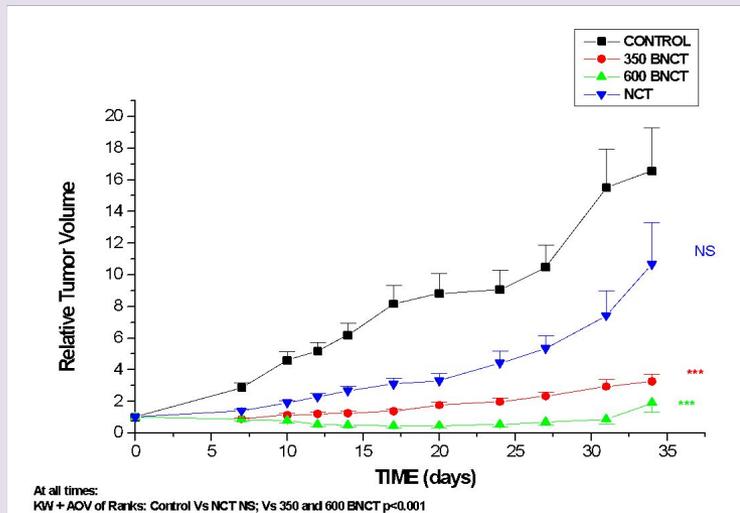


Figura 7 a: Crecimiento tumoral (tumores > and < 50mm<sup>3</sup>).

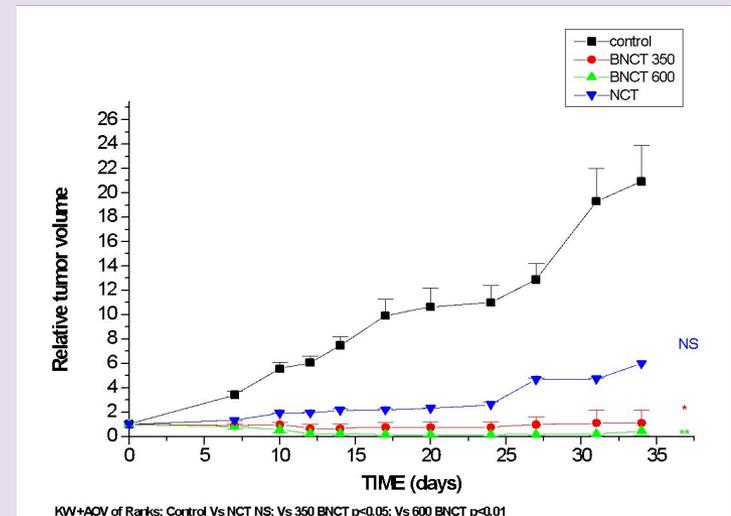


Figura 7 b: Crecimiento tumoral en animales con tumores menores a 50 mm<sup>3</sup>.

# Estudios BNCT *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

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

## Estudios Histológicos de Animales Irradiados

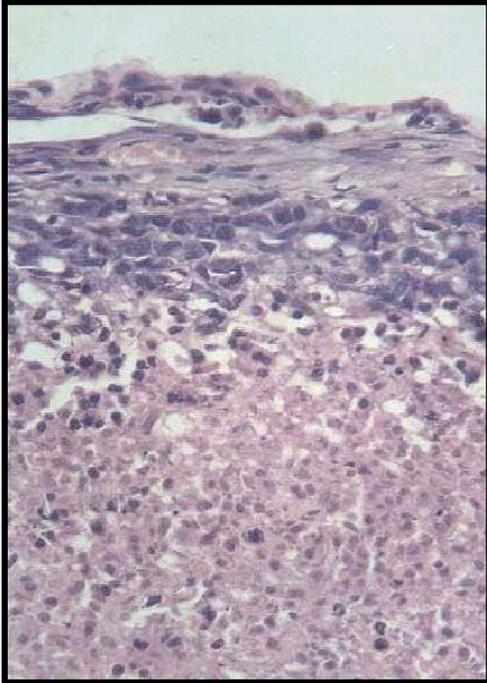


Figura 8 a: tejido tumoral viable 7 días después de la irradiación en ratones de grupos CONTROL, NCT, BNCT (350mg/kg de BPA).

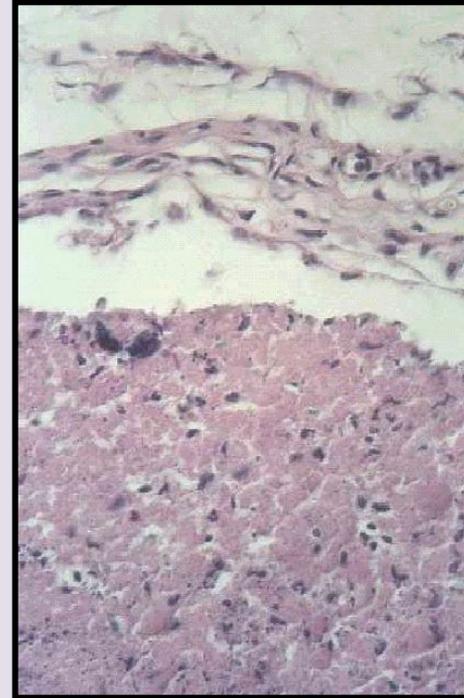


Figura 8 b: tumor necrótico 7 días después de la irradiación en animales del grupo BNCT (600mg/kg de BPA).

# Estudios BNCT *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

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

## Estudios *In Vivo*: Daño al ADN post BNCT

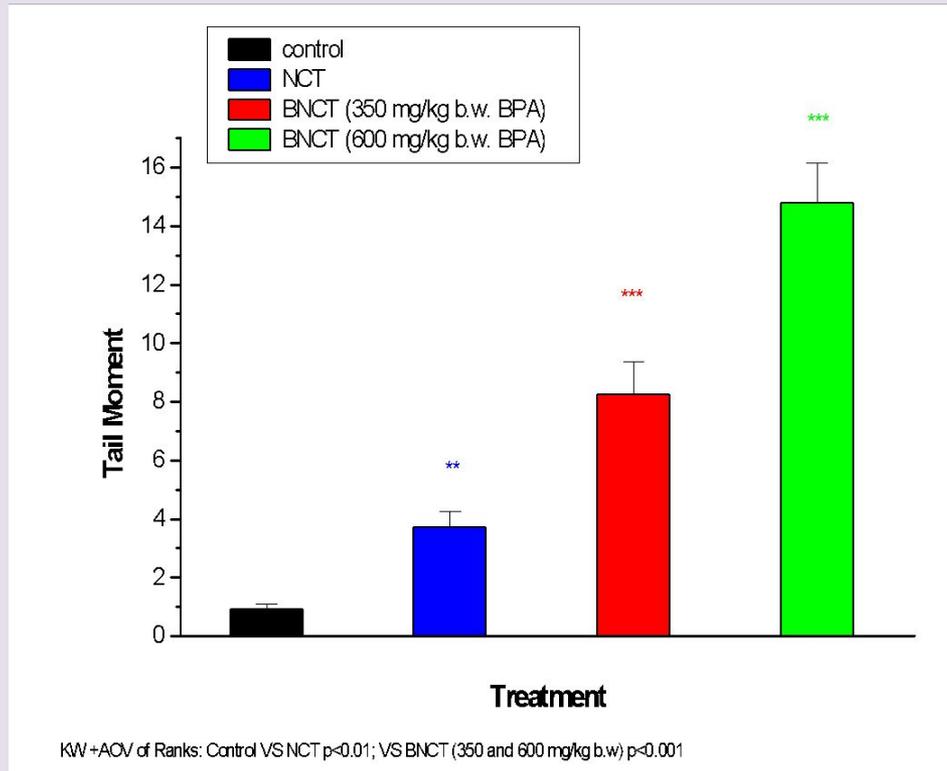


Figura 9: Ensayo del Cometa realizado en el ADN de tumores de animales post irradiación.

# Estudios BNCT *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

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

## Estudios *In Vivo*: Crecimiento Tumoral post BNCT (usando BOPP y BPA Combinados)

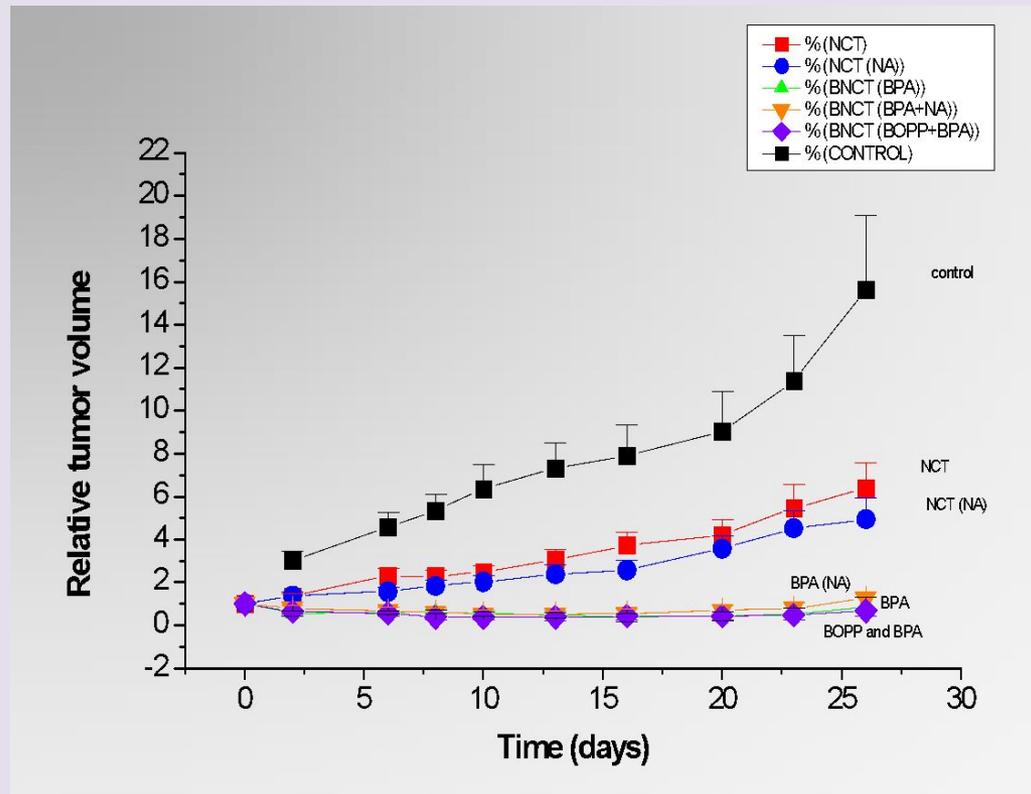


Figura 11a: Crecimiento del tumor en función del tiempo post BNCT.

Dagrosa MA, et al Int. J. of Radiat. Oncol. Biol. Phys 2007; 69 (4): 1059-1066.

# Estudios BNCT *in vivo*

Modelo cáncer de tiroides

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

## *In vivo*: Sobrevida libre de enfermedad

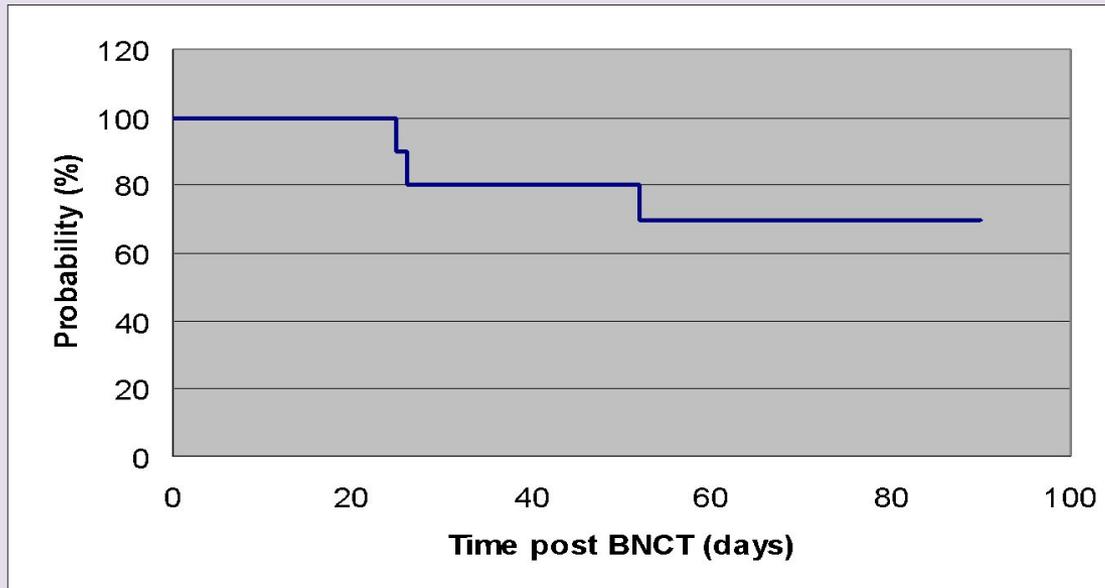


Figura 11b: Curva de Kaplan-Meier. Sobrevida libre de enfermedad. El número total de animales con **regresión tumoral completa** después de BNCT fue 10/13 (BNCTc/BPA:1/4; BNCT c/NA+BPA: 2/2 y BNCT c/BOPP +BPA:7/7).

# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo cáncer de tiroides

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

### Apoptosis

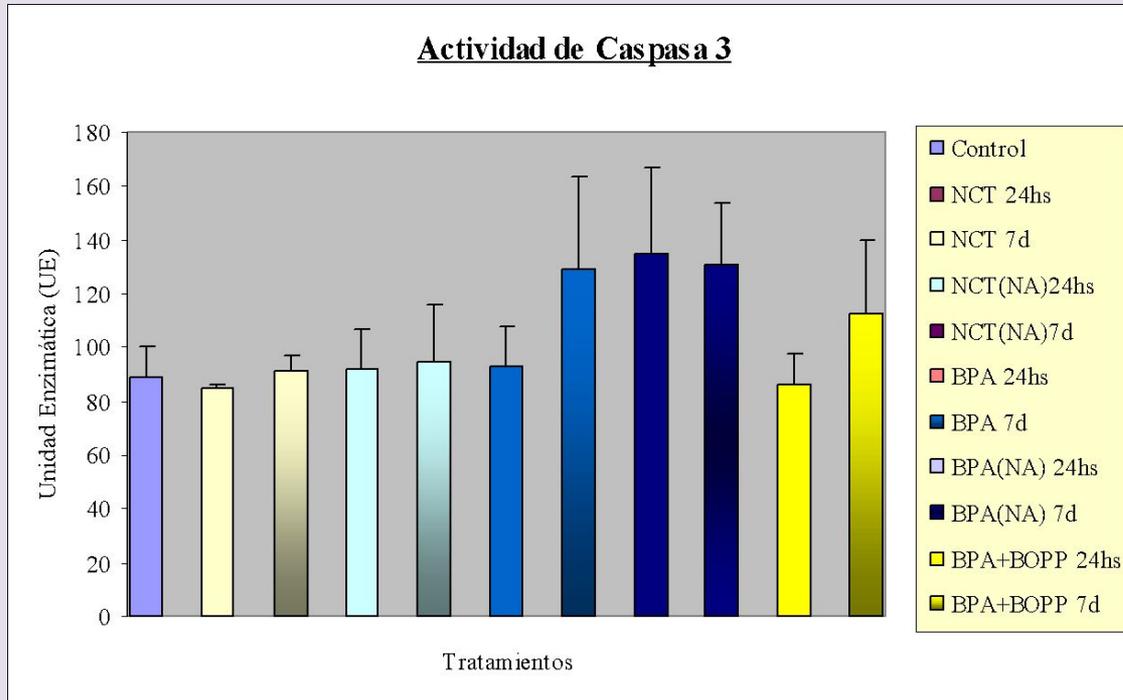


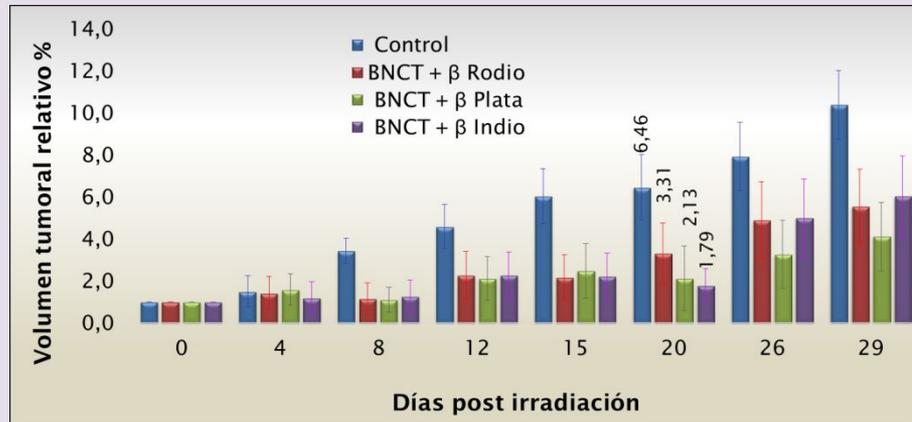
Figura 11d: La actividad de caspasa 3 como medida de apoptosis fue determinada en todos los grupos a las 24 hs y a los 7 días post irradiación. n=4. BPA (7 días); BPA (NA) (24 hs y 7 días); BPA+BOPP (7días) Vs Control  $p < 0.05$ .

# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo cáncer de colón

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

## BNCT + Dispositivo Beta Enhancers



| Órgano y $\mu\text{g/g}$ de B | Dosis total absorbida (Gy) |         |         |         |      |
|-------------------------------|----------------------------|---------|---------|---------|------|
|                               | BNCT                       | BNCT-Rh | BNCT-Ag | BNCT-In |      |
| Tumor                         | 21                         | 3,35    | 7,31    | 7,34    | 6,59 |
| Piel C                        | 12,5                       | 2,83    | 15,5    |         |      |

### Dosimetría BNCT más *Beta enhancers*

**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. (\*\*\*) =  $P < 0,001$** ).

- Estos resultados mostraron que ninguno de los tres dispositivos BE evaluados es radiotóxico para los animales.
- Los tres tipos de BE mostraron eficacia para controlar el crecimiento del tumor post irradiación.

# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo melanoma

### Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Diseño experimental

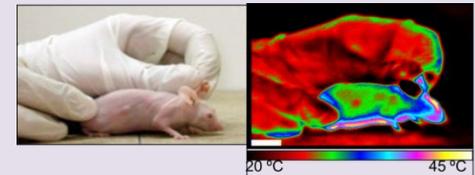
Se utilizaron ratones NIH *nude* (25g) que fueron implantados de con  $3 \cdot 10^6$  de células de la línea celular humana de melanoma MEL J.



**Estudios de BNCT**



Estudios de Termografía infrarroja una semana antes de la irradiación, para evaluar la temperatura tumoral.



Se trasladaron al Centro Atómico Bariloche para ser irradiados en el Reactor RA6.



Se trasladan los ratones al Centro Atómico Constituyentes para hacer el seguimiento de los animales y evaluar la respuesta tumoral a la terapia.

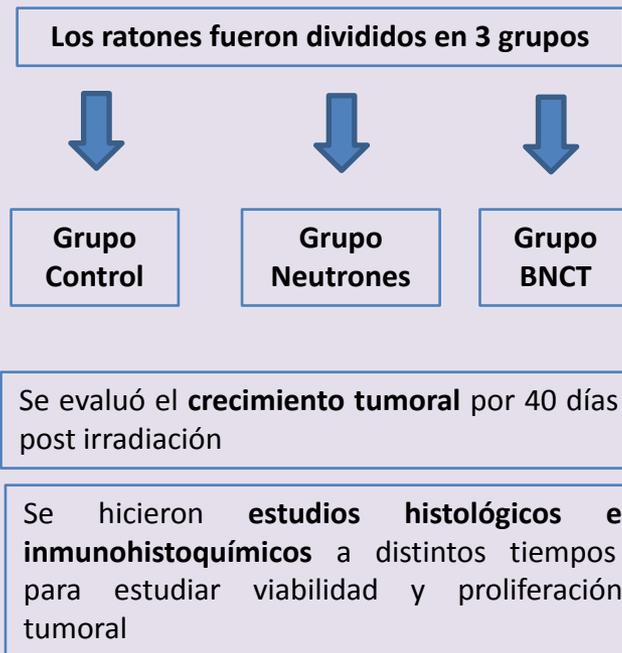


# Estudios BNCT *in vivo*

Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Diseño experimental

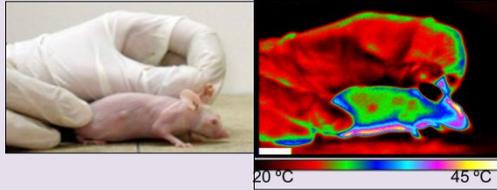


# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo melanoma

### Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

#### Estudios de termografía pre tratamiento



Se obtuvo la temperatura tumoral individualizada para cada ratón

#### Irradiación con el haz de neutrones térmico del RA6 Centro Atómico Bariloche



Ratones con tumor de melanoma fueron i.p. con BPA (350 mg/kg p.c.) y anestesiados s.c. Se colocaron en un dispositivo en grupos de 8 animales para ser irradiados en el RA6

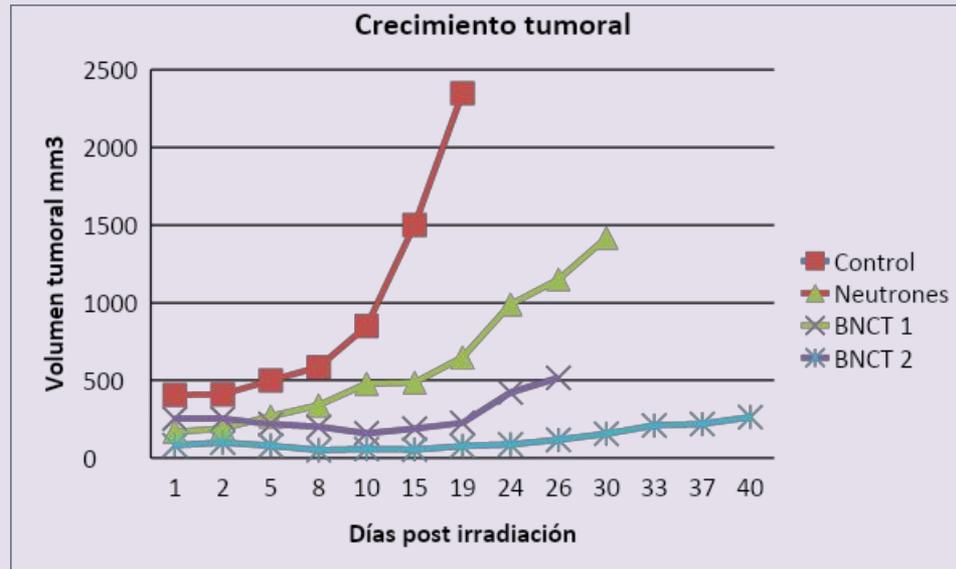
| Tiempo de irradiación | Dosis física |
|-----------------------|--------------|
| $37 \pm 0.5$ min      | 4.95 Gy      |
| $55 \pm 0.5$ min      | 6.88 Gy      |

# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Respuesta al tratamiento BNCT



Para evaluar los efectos radiotóxicos se midió el peso de cada animal y se tuvo en cuenta que no haya disminuido más del 20%, se evaluó el comportamiento y evaluación de la toxicidad en piel como eritema, ulceración o infección en la zona tumoral.

# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo melanoma

### Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Respuesta al tratamiento BNCT

| Tiempo de irradiación | Dosis física | RP     | RT    |
|-----------------------|--------------|--------|-------|
| 37 ± 0.5 min          | 4.95 Gy      | 8.70%  | 0%    |
| 55 ± 0.5 min          | 6.88 Gy      | 36.4 % | 27.3% |

Se analizó la respuesta individual a los 40 días post tratamiento del grupo **Grupo BNCT**, se calculó el volumen tumoral relativo: Volumen inicial/Volumen final (**Vf/Vi**) y se consideró Respuesta Parcial al tratamiento (**RP**) cuando  $Vf/Vi < 1$ . La respuesta total al tratamiento (RT) se consideró cuando  $Vf/Vi = 0$ .

# Estudios BNCT *in vivo*

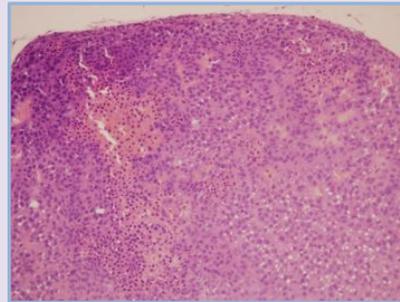
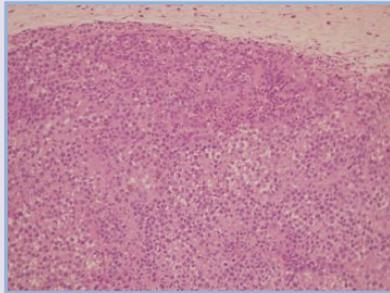
Modelo melanoma

Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Estudios histológicos

Control

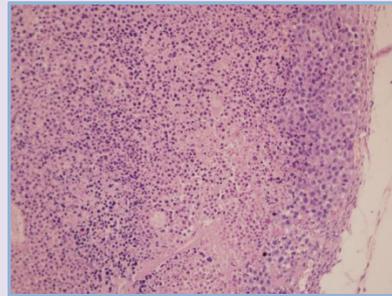
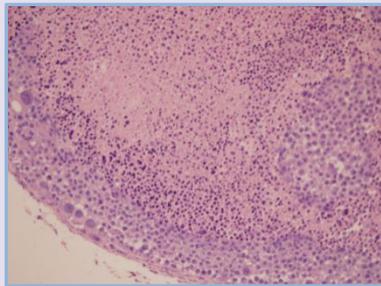
BNCT



24 hs post  
irradiación

A

B



40 días post  
irradiación

D

E

**Estudios histológicos** A las 24 horas post irradiación se encontró en el Grupo Control (A) una necrosis superficial y escasa, y un alto número de mitosis, mostrando un tumor en crecimiento. En el Grupo BNCT (B) se observan áreas grandes de destrucción de células por necrosis y zonas de picnóticas, evidenciando un daño tumoral importante. No se observan mitosis. A los 40 días post irradiación en el Grupo Control (D) y en el Grupo BNCT (E) presentan amplias zonas necróticas, sin embargo el Grupo Control presentó un volumen tumoral significativamente mayor. En el Grupo BNCT se ve una pequeña zona periférica viable, mostrando que estos tumores comienzan a crecer nuevamente.

# Estudios BNCT *in vivo*

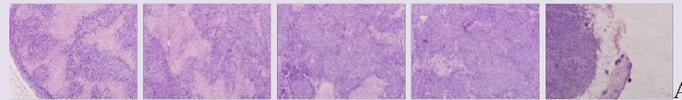
## Modelo melanoma

### Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

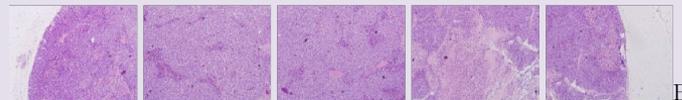
## Viabilidad tumoral y necrosis en tumores irradiados

- Se analizaron los preparados histológicos de los animales irradiados. Se analizaron 12 tumores del grupo BNCT, 12 tumores del grupo Neutrones y 8 tumores del grupo control.
- Grupo BNCT presentan zona central necrótica y una zona periférica al tumor viable con presencia de mitosis. Estos tumores habían presentado un control del crecimiento post irradiación, pero a los 30 días ya habían empezado a crecer nuevamente, coincidiendo con el estudio histológico. **(A)**
- Grupo Neutrones se observan tumores grandes, con zona central necrótica muy extensa, la zona periférica es viable y presenta gran cantidad de mitosis. Estos tumores habían presentado un crecimiento mayor al del grupo BNCT. **(B)**
- Grupo control presentaron un gran crecimiento, mostrando zonas de necrosis central y también la presencia de vascularización dentro de la zona necrótica, alrededor de estos vasos se observa viabilidad. En estos casos se observa que la vascularización no es solo en la periferia del tumor si no que se encuentran vasos en el interior del tumor. **(C)**

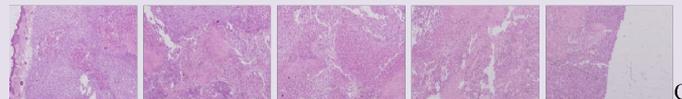
#### Grupo BNCT



#### Grupo Neutrones



#### Grupo control



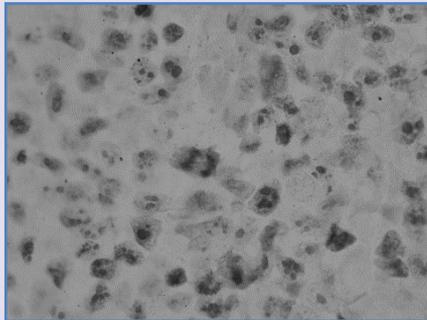
# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo melanoma

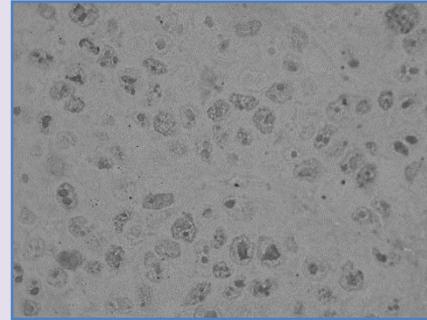
Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Estudios inmunohistoquímicos

Control 24 hs post irradiación



BNCT 24 hs post irradiación



Análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo Ki-67 de muestras **Control** (sin irradiar y muestra **BNCT 24 hs post irradiación**, aumento 1000X). Se observa que la muestra Control presenta una marcación más fuerte que la muestra BNCT 24 hs

Las muestras del grupo BNCT 24 hs mostraron una significativa disminución de la marcación del anticuerpo Ki-67, mostrando que la terapia BNCT actúa rápidamente disminuyendo el nivel de proliferación celular.

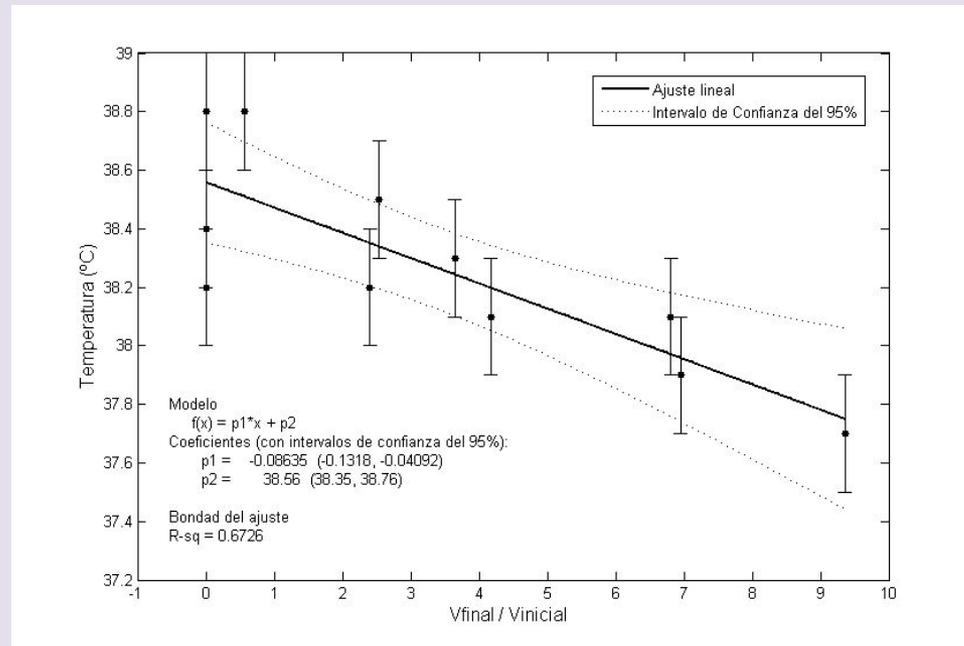
# Estudios BNCT *in vivo*

## Modelo melanoma

### Ratones nude implantados con células humanas de melanoma

## Estudios de termografía

### Marcador predictivo de la respuesta al tratamiento



**Temperatura tumoral pre tratamiento (° C) vs Volumen tumoral relativo 40 días post tratamiento ( $V_{\text{final}} / V_{\text{inicial}}$ ).** Los tumores con mayor temperatura pre tratamiento presentaron una mejor respuesta (menor volumen relativo) 40 post tratamiento. La termografía puede utilizarse como un marcador predictivo de la respuesta tumoral al tratamiento BNCT

**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**