

APLICACIÓN DE LA TERAPIA BNCT EN UN MODELO DE MELANOMA

¹Carpano M, ²Nievas S, ²Olivera MS, ²Santa Cruz G, ¹Rodriguez C, ⁴ Longhino J, ^{1,3}Juvenal
^{1,3}G Pisarev M, ^{1,3}Dagrosa A

¹Departamento de radiobiología (CAC), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Argentina

²Departamento Coordinación BNCT (CAC), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Argentina

³CONICET, Argentina

⁴RA6 (CAB), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Argentina

RESUMEN

La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) es una modalidad de tratamiento que permite destruir selectivamente células tumorales sin dañar significativamente al tejido normal circundante. La misma se basa en las reacciones de captura nuclear y posterior fisión que ocurre cuando el ^{10}B , isótopo natural no radiactivo del elemento boro, es irradiado con neutrones térmicos de baja energía (<0.4 eV) para producir su activación a ^{11}B , que decae liberando una partícula α (^4He) y un núcleo de litio-7 (^7Li). Debido a que estas partículas de alto LET (Linear Energy Transfer) tienen un alcance limitado en el tejido (5-9 μm), sus efectos destructivos son limitados a las células que contienen boro.

En nuestro laboratorio hemos realizado estudios con la finalidad de optimizar la terapia BNCT para la aplicación de la misma al melanoma cutáneo. Previamente hemos demostrado in vitro diferentes patrones de captación del compuesto borado borofenilalanina (BPA). Por otro lado, en estudios in vivo encontramos una correlación positiva entre la captación de BPA, viabilidad celular y la temperatura tumoral. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la correlación observada entre contenido intratumoral de boro y temperatura tumoral se traduce en una mejor respuesta a la irradiación con neutrones.

1. INTRODUCCIÓN

La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) es una modalidad de tratamiento que permite destruir selectivamente células tumorales sin dañar significativamente al tejido normal circundante. La misma se basa en las reacciones de captura nuclear y posterior fisión que ocurre cuando el ^{10}B , isótopo natural no radiactivo del elemento boro, es irradiado con neutrones térmicos de baja energía (<0.4 eV) para producir su activación a ^{11}B , que decae liberando una partícula α (^4He) y un núcleo de litio-7 (^7Li). Debido a que estas partículas de alto LET (Linear Energy Transfer) tienen un alcance limitado en el tejido (5-9 μm), sus efectos destructivos son limitados a las células que contienen boro¹. El éxito de esta terapia para el control local del tumor dependería en primera instancia de la habilidad de los compuestos de boro utilizados para concentrarse selectivamente en el tumor. Aunque numerosos compuestos de boro han sido sintetizados, hasta el momento sólo dos de ellos han sido utilizados en ensayos clínicos, el de-sodio-undecahidro-mercpto-closododecarborato (BSH) y la p-hidroxiboro-fenilalanina (BPA)². Se han realizados ensayos clínicos en diferentes centros nucleares de Japón, Europa, EE.UU. y la Argentina para el tratamiento de gliomas de alto grado y melanomas cutáneos primario o metástasis de los mismos en el cerebro.³ Recientemente esta modalidad de tratamiento ha sido extendido al tratamiento de

cáncer metastásico de hígado y a tumores de cabeza y cuello. Solamente los tumores que no responden a los tratamientos convencionales son incluidos en ensayos clínicos.

El melanoma es un cáncer de piel que se origina a partir de los melanocitos, que son las células especializadas en la producción de pigmento y se encuentran en la capa basal de la epidermis. En una primera instancia el melanoma crece lateralmente y está confinado en la epidermis. Este estadio se conoce como melanoma de fase de crecimiento radial, el cual puede ser tratado eficientemente por disección quirúrgica. Sin embargo, el melanoma puede progresar a la fase de crecimiento vertical, la cual está asociada con invasión de la dermis por células de melanoma y la adquisición de potencial metastásico⁴. El melanoma es uno de los cánceres más agresivos en humanos y es el responsable de casi el 60% de todos los tumores de piel letales. La incidencia de melanoma ha aumentado en la población blanca en las últimas dos décadas. Existe una interacción compleja entre los factores de riesgo ambientales (exógenos) y los factores de riesgo endógenos, incluyendo la genética, en el desarrollo del melanoma. Este tumor es muy agresivo pero si es diagnosticado de manera precoz es bien controlado con los tratamientos convencionales; sin embargo en su forma avanzada no responde a ninguna de las terapias usualmente utilizadas. Debido a la naturaleza compleja de esta enfermedad, BNCT podría ser una terapia alternativa para el tratamiento de este tipo de cáncer.

Si bien en muchos casos se ha logrado la remisión completa del tumor y en otros se ha controlado la enfermedad prolongando la sobrevivencia de los pacientes, se observan resultados muy diversos. Esta variación individual en la respuesta del tumor observada para un mismo diagnóstico histopatológico y para la misma aplicación de BNCT, ha sido descrita anteriormente para la radioterapia convencional⁴

En nuestro laboratorio hemos realizado estudios con la finalidad de optimizar BNCT para la aplicación individual de la misma al melanoma cutáneo. Previamente hemos demostrado *in vitro* diferentes patrones de captación de borofenilalanina (BPA) en tres líneas de células de melanoma⁵. En estudios *in vivo* encontramos una correlación positiva entre la captación de BPA, viabilidad celular y la temperatura tumoral en ratones NHI nude implantados con células de melanoma a los cuales se les administro BPA y se hicieron estudios de biodistribución del compuesto borado y estudios de termografía infrarroja⁶. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la correlación observada entre contenido intratumoral de boro y temperatura tumoral se traduce en una mejor respuesta a la irradiación con neutrones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular de melanoma humano MEL J, gentilmente provista por el Dr. Mordoh, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Leloir, las cuales fueron cultivadas en el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), estreptomycin (100 mg/ml) y penicilina (100 IU/ml). Las células fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% CO₂

2.2. Modelo animal

60 ratones NIH nude machos, de 6 a 8 semanas de edad y de 20 a 25 g fueron implantados subcutáneamente (SC) en el flanco posterior derecho con 3×10^6 células de melanoma MEL J. Los animales fueron criados y mantenidos en condiciones asépticas.

2.3. Diseño del experimental

Los animales fueron divididos en 3 grupos: 1) Control: sin irradiación y sin BPA; 2) Neutrones: irradiados con el haz de neutrones solamente; 3) BNCT: irradiados con el haz de neutrones más BPA (350 mg/kg p.c.). Cada ratón fue individualizado y transportado en avión al Centro Atómico Bariloche (CAB) para ser irradiado en el haz de neutrones térmicos del Reactor RA6 (Flujo: 4.96×10^8 n/cm²s). Para disminuir la toxicidad hematológica por el tratamiento se administró a los ratones G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor, Neutromax, Filgrastim, BioSidus) en una dosis de 20 µg/Kg de p.c. administrado durante una semana comenzando 3 días previos a la irradiación. Los animales fueron anestesiados s.c. con diazepam y ketamina (200 mg/kg p.c.) e irradiados en grupos de 8 ratones por 37.0 ± 0.5 min. El crecimiento tumoral fue evaluado durante 30 días post tratamiento. La temperatura tumoral y corporal de cada ratón fue medida por termografía infrarroja pre tratamiento, como un indicador no invasivo de captación de boro.

2.4. Preparación del complejo BPA-Fructosa

La solución de L-p borofenilalanina (BPA) (Gliconix Corp; Durham, US) fue preparada a una concentración de 30 mg 10BPA por mililitros (0.14 M). El 10BPA (99% 10B-enriquecido) L-isomero, fue combinado en agua con un exceso molar de 10% de fructosa. El pH fue ajustado a 9.5-10 con NaOH, la mezcla se agitó hasta que se disolvieron todos los sólidos y luego se reajustó el pH a 7.4 con HCL.

2.5. Dispositivo de posicionamiento e irradiación

Se utilizó un dispositivo para posicionar adecuadamente en el haz de BNCT hasta 8 ratones durante una misma irradiación. Este dispositivo permite el montaje fuera de la sala de tratamiento, para luego ser posicionado con facilidad y precisión sobre el haz. Consiste en 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 los volúmenes a irradiar, se adosó a la placa mencionada una segunda placa, de menor espesor con un calado circular de menor diámetro, ubicadas ambas en forma concéntrica. Esta placa tiene dibujada líneas circulares que representan niveles de flujo neutrónico en esa posición. Los tumores se posicionaron dentro del radio efectivo del haz. Se buscó un posicionamiento donde el cuerpo del animal estuviera lo menos expuesto al haz, sin dejar de maximizar el flujo en el tumor. Los ratones fueron anestesiados para el posicionamiento y la posterior irradiación. El tumor

fue ubicado sobre el radio de 6 cm del haz y sujeto mediante hilo al tornillo de la placa. Los ratones fueron sostenidos con paños y cinta adhesiva. Los tiempos de irradiación efectiva estimados fueron de 37.0 ± 0.05 min, con una potencia de operación de 1.004 ± 0.004 MW.

2.6. Medición del crecimiento tumoral

El tamaño de los tumores fue medido con un calibre dos veces por semana. El volumen fue calculado acorde con la siguiente fórmula:

$$\frac{A^2 \times B}{2}$$

donde A es el ancho y B es el largo. El crecimiento tumoral fue evaluado por 30 días post tratamiento.

2.7. Imágenes infrarrojas estáticas

El mapeo de la temperatura corporal de animales vivos requiere seguir procedimientos estándares encaminados a minimizar la influencia de los factores ambientales y fisiológicos que podrían interferir con las observaciones que se deseen realizar. El logro de las condiciones normo estáticas se lleva a cabo mediante el control de la temperatura ambiente, fuentes infrarrojas y el estrés no deseado del sujeto de estudio. La resolución espacial de la cámara es de 0.39 mm/pixel. La cámara proporciona también una señal de vídeo NTSC que puede ser empleado para el estudio de la evolución de la temperatura. La cámara infrarroja es rutinariamente calibrada en la temperatura por referencia a los campos negros. La habitación se mantiene a una temperatura estable de 22 y 23 ° C para reducir los cambios en la homeostasis de los ratones. El grupo de animales BNCT fue examinado por termografía infrarroja pre tratamiento. Para los estudios, los ratones fueron tomados con la mano sin anestesia y se adquirieron los vídeos infrarrojos por unos pocos segundos, con el fin de evitar la influencia del procedimiento de inmovilización en la temperatura corporal del animal. Se tomaron vídeos cortos de cada animal en el flanco derecho (lado inoculado) y en el flanco izquierdo (lado normal), y la temperatura de la ingle fue medida con una termocupla como representativa de la temperatura corporal. Todos los estudios de termografía fueron realizados una semana antes de la irradiación, como un indicador no invasivo de la cantidad de boro.

3. RESULTADOS

3.1. Estudios de Termografía pre tratamientos

La temperatura corporal y la temperatura tumoral fue medida para cada ratón usando termografía infrarroja estática previa a la irradiación. (Figura N° 1)



Figura N° 1 Imagen infrarroja pre tratamiento BNCT para los estudios de termografía realizada en cada ratón.

3.2. Irradiación con el haz de neutrones térmicos del reactor RA6

La Figura n° 2 muestra el posicionamiento de los ratones en el dispositivo de irradiación y colocación sobre el haz de neutrones. Los ratones se encuentran anestesiados y sujetos con paños y cinta adhesiva al dispositivo. Los tumores se encuentran en el radio de 6 cm que corresponde al 98 % del flujo máximo de neutrones térmicos del centro del haz.



Figura N°2 Dispositivo de irradiación

3.3. Tasas de dosis en ratones irradiados

La Tabla N° 1 muestra las tasas de dosis en tumor, sangre y piel de los ratones irradiados con el haz de neutrones del RA6. La tasa de dosis térmica fue de 0.62 ± 0.5 % CGy/min, la tasa de dosis no térmica fue de 1.57 ± 4.3 % CGy/min, la tasa de dosis gama fue de 5.4 ± 3.3 % CGy/min, la tasa de dosis en 10B tumor fue de $5.3 \pm 11\%$ CGy/min, la tasa de dosis en 10B sangre fue de 1.4 ± 23 % CGy/min y la tasa de dosis en 10B piel fue de $2.5 \pm 24\%$ CGy/min. La dosis física total absorbida fue de 4.96 Gy para el grupo BNCT.

Tabla N°1 Tasas de dosis en tumor, sangre y piel en ratones irradiados con el haz de neutrones del RA6

TUMOR	THERMAL FLUX (N/Cm ² .seg)	TH Dose Rate (CGy/min)	NO TH Dose Rate (CGy/min)	GAMMA Dose Rate (CGy/min)	¹⁰ B TUMOR Dose Rate (CGy/min)	¹⁰ B BLOOD Dose Rate (CGy/min)	¹⁰ B SKIN Dose Rate (CGy/min)	TOTAL PHYSICAL Absorbed Dose (Gy)
4 mm	4.9 x 10 ⁸ ± 0.5%	0.62 ± 0.5 %	1.57 ± 4.3%	5.4 ± 3.3%	5.9 ± 11%	1.4m ± 23%	2.5 ± 24%	4.95 ± 5.1%

3.4 Crecimiento tumoral

En la figura N° 3 se observa Volumen relativo vs. Días post tratamiento en ratones NIH nude implantados con células tumorales de melanoma. Grupo BNCT (irradiados más BPA), Grupo Neutrones (irradiados sin el compuesto de boro) y Grupo Control (sin irradiar y sin BPA). A los 30 días post tratamiento el grupo Control alcanzó un volumen tumoral medio relativo de 16.2; para el grupo Neutrones fue de 9.77 mientras que para el grupo BNCT fue de 2.4 (p<0.001) El grupo BNCT mostro una inhibición del crecimiento durante los primeros 20 días post irradiación, posteriormente los tumores comenzaron a crecer

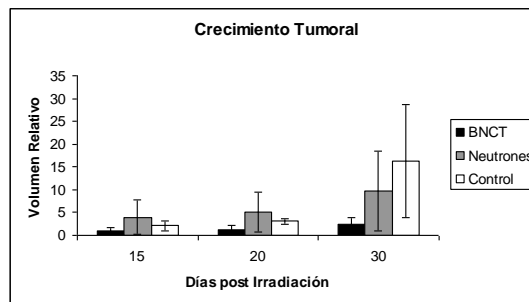


Figura: N° 3 Crecimiento tumoral

3.5. Análisis individual post tratamiento

Realizamos un estudio individualizado de los animales del grupo BNCT. Nosotros ya habíamos mostrado que la temperatura tumoral correlacionaba con la captación de B (estudios de biodistribución y termografía previos). Ahora queríamos saber si podíamos encontrar una relación entre la temperatura tumoral y la respuesta al tratamiento. Para esto graficamos el volumen final tumoral post tratamiento vs la diferencia de temperatura corporal

– temperatura tumoral ($T_c - T_t$) pre tratamiento (Figura N° 4). Encontramos una buena relación entre estos parámetros (R 0.73). Los animales con temperatura tumoral más elevada (29°C) pre tratamiento presentaron un volumen tumoral menor (263 mm^3) pos tratamiento.

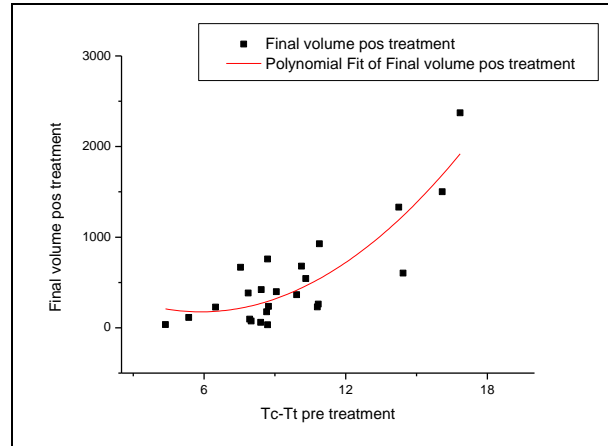


Figura N° 4 Volumen final post tratamiento (mm^3) en función de la diferencia de temperatura corporal – temperatura tumoral ($T_c - T_t$) pre tratamiento. Cada punto representa un animal. Fiteo Polinomial (Adj. R-Square 0,73)

3.6. Respuesta parcial al tratamiento

En la Tabla N° 2 mostramos la respuesta parcial al tratamiento (RP) a distintos días post irradiación. La RP al tratamiento se consideró cuando el $V_f/V_i < 1$ y se le asignó un valor de 1. La no respuesta al tratamiento se consideró cuando $V_f/V_i > 1$ y se le asignó un valor de 0. Se obtuvo que: RP17D (respuesta al tratamiento 17 días post tratamiento) fue de 69.5 %, RP20D (respuesta al tratamiento 20 días post tratamiento) fue de 47.83% y la RP27D (respuesta al tratamiento 27 días post tratamiento) fue de 8.7%

Tabla N° 2 Respuesta al tratamiento

RP 17 Días	RP 20 Días	RP 27 Días
1	1	1
1	1	1
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	1	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
1	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0
0	0	0

3.7 Respuesta parcial vs dosis recibida

En la Figura N° 5 estudiamos la respuesta parcial vs la dosis recibida y se estimó retrospectivamente la dosis recibida para cada tumor considerando los estudios de termografía pre tratamiento. Se graficó la respuesta observada basada sobre el diámetro tumoral y los factores RBE y CBE usados en la clínica BNCT para melanoma.

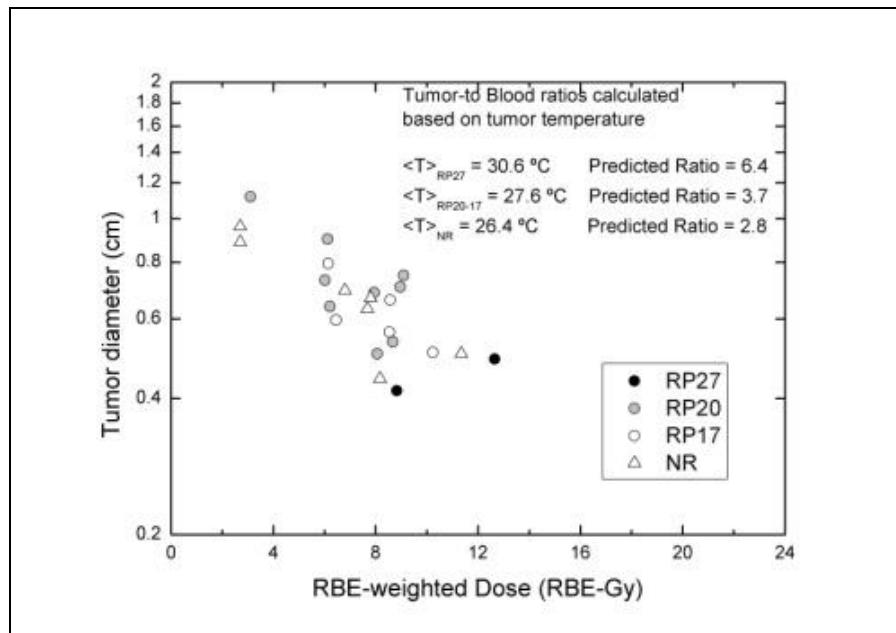


Figura N° 5 Respuesta parcial vs dosis recibida

4. Conclusión

La medición de la temperatura tumoral por termografía en cada ratón podría ser usada como un marcador predictivo del éxito terapéutico para la optimización individual de la terapia BNCT. También se podría evaluar una dosis ajustada a cada individuo para mejorar los resultados de la terapia.

5. REFERENCIAS

- 1) Coderre JA, Morris G. The radiation biology of boron neutron capture. *Radiat Res*; **151**: 1-18(1999)
- 2) Barth RF, Soloway AH, Pisarev MA. Terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en tumores de cerebro: estado actual y potencial futuro. *Oncología*; **21**: 387-99 111(1998)
- 3) Menéndez, P.R., et al. BNCT for skin melanoma in extremities: Updated Argentine clinical results, *Applied Radiation and Isotopes* **67**, S50–S53. (2009)
- 4) Pawlik T and Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. Radiation Oncology Biol Phys* 59 84: 928-942. (2004)

5) Carpano M, Dagrosa MA, Nievas S, Rossini A, Juvenal G, Pisarev M. 14 Comparative studies of boronophenylalanine (BPA) uptake in three human cell lines of malignant melanoma.. 14 International Congress of Neutron capture Therapy. *Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy* (Buenos Aires). Pag 123 (2010)

6) Carpano M, Dagrosa MA, Nievas S, Santa Cruz G, Cabrini R, Juvenal GJ, Pisarev MA. In-vivo studies towards optimizing the application of BNCT to the individual treatment of malignant melanoma. 14 International Congress of Neutron capture Therapy. *Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy* (Buenos Aires). Pag 111 (2010)