

MODELOS BIOLÓGICOS IN VITRO PARA ESTUDIOS DE CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO COMO TERAPIA PARA TUMORES

Dagrosa A*, Kreimann E*, Schwint A E*, Farias S**, Garavaglia R**, Batistoni D**, Juvenal G*, Pisarev M*.

* Unidad de Actividad de Radiobiología Centro Atómico Constituyentes

** Unidad de Actividad Química

La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) es una terapia binaria basada en la reacción nuclear que ocurre cuando el isótopo estable B^{10} es irradiado con neutrones termalizados para generar partículas alfa (4He) de alta transmisión lineal de energía (Linear Energy Transfer, LET) y un núcleo de litio (7Li). Es crítico para el éxito del BNCT que los compuestos de boro utilizados se concentren selectivamente en las células tumorales y no en las células normales, alcanzando una concentración celular mínima de 10^9 átomos por célula. Por otro lado para poder alcanzar las concentraciones adecuadas en la célula tumoral el compuesto no debe ser tóxico. Uno de los compuestos de boro actualmente utilizado en la clínica es el aminoácido p-hidroxiborofenilalanina (BPA).

Esta modalidad terapéutica ha sido utilizada en el tratamiento de tumores cerebrales de alto grado y melanomas cutáneos en pacientes. En los últimos tiempos ha habido un creciente interés en extender esta terapia a otro tipo de tumores. El carcinoma anaplásico tiroideo que generalmente se desarrolla en pacientes con bocio de larga data, se caracteriza por ser un tumor de crecimiento muy rápido, de invasión local extensa, y metástasis precoz, llevando a una sobrevida del paciente de aproximadamente seis meses. Los tratamientos habituales como la cirugía, la radioterapia con I-131 y la quimioterapia no son efectivos. El BNCT podría ser una terapia alternativa.

El objetivo de este trabajo es estudiar la captación del BPA en cultivos de células tumorales y normales de glía, así como también en células de tiroides. Por otro lado se evaluó la citotoxicidad del compuesto borado.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó la línea celular de glioblastoma de rata *Fisher F98*, cultivo primario de glía normal realizado con cerebro de ratas *Wistar* de 3 a 5 días de vida, células de cáncer anaplásico tiroideo humano ARO, cultivo primario de tiroides bovina y cultivo primario proveniente de biopsias humanas de bocio nodular frío.

Las células fueron crecidas en placas de 24 pozos (con un inóculo de 3×10^4 células) con 0.5 mL del medio correspondiente para cada línea, suplementado con 10% de SFB.

Los estudios de captación de BPA fueron realizados con las distintas líneas de células en fase de proliferación y quiescencia. Las concentraciones del compuesto de boro evaluadas fueron 10, 25, 50, 75 $\mu g B^{10}/mL$. El tiempo de incubación con la droga fue de 24 horas. El contenido total de proteínas fue determinado mediante la técnica de Lowry. La medición de boro intracelular fue realizada por el método de espectroscopía de emisión atómica por plasma inductivo, con un nivel mínimo detectable de 4 ppb. La toxicidad del BPA fue estudiada en células F98 por evaluación morfológica con microscopio invertido y mediante un colorante vital, el MTT, midiéndose la absorbancia a 540 nm como indicadora de la fracción de sobrevida. Esta evaluación se llevó a cabo

con las siguientes dosis del compuesto: 100, 200, 400, 600 y 1000 $\mu\text{g B}^{10}/\text{mL}$ con diferentes tiempos de incubación (6, 12 y 24 h).

Los resultados del ensayo con MTT se observan en la siguiente tabla:

BPA B¹⁰/mL	mg	Tiempo de incubación (h)	% Sobrevida
100		6	100
		12	85
		24	85
200		6	100
		12	81
		24	71
400		6	100
		12	77
		24	66
600		6	79
		12	67
		24	38
1000		6	71
		12	21
		24	17

Puede observarse que con 6 h de incubación la sobrevida es del 100% hasta 400 $\mu\text{g B}^{10}/\text{mL}$, luego a dosis más altas del compuesto la sobrevida disminuye de forma similar. Para los tiempos de 12 y 24 h a medida que se va aumentando la dosis del BPA el % de sobrevida va disminuyendo progresivamente de forma diferente para los dos tiempos de incubación, llegando a ser muy bajo a la dosis más alta del compuesto. Se muestra que para las concentraciones de 200, 400 y 600 $\mu\text{g B}^{10}/\text{mL}$ el % de sobrevida es mayor a las 12 h de incubación.

Los resultados de la captación de BPA indican que la concentración intracelular de boro incrementa en relación directa con el aumento de dosis ofrecida del compuesto en todas las líneas tumorales y cultivos primarios normales utilizados. En células F98 se observó una captación máxima de 3,015 \pm 0,464 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$ para las células en quiescencia y de 3,043 \pm 0,429 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$ para las mismas células en fase de proliferación. Por otro lado el cultivo primario de glía normal en quiescencia mostró un resultado inferior al de glioblastoma, el valor normal fue de 1,191 \pm 0,130 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$. Las células de glía normal en proliferación evidenciaron una captación máxima de boro de 1,53 \pm 0,145 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$ similar a la de las células de glía en quiescencia. En las células ARO se vio una captación de boro máxima de 2,8127 \pm 0,092 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$ para las células en quiescencia y de 2,8367 \pm 0,2352 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$ para las células en proliferación. Por otro lado el cultivo primario de tiroides bovina mostró un pico en la captación de boro de 0,6896 \pm 0,014 ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$. La concentración intracelular máxima de boro en el bocio nodular humano fue de 0,5548 \pm 0,0235ng B¹⁰/ $\mu\text{g Prot}$.

El trabajo realizado no evidenció diferencia significativa en la captación de boro, en las distintas fases de crecimiento de las líneas tumorales y células normales utilizadas. Se mostró además que las células tumorales de glioblastoma concentraron más boro que las células normales de glía para las mismas dosis ofrecidas del compuesto. Los resultados obtenidos con células tiroideas mostraron que las células

tumorales captaron 4 y 5 veces más boro que las células bovinas normales y que el bocio nodular tiroideo respectivamente, demostrando de esta manera que el BNCT podría ser una posible terapia alternativa para el tratamiento del cáncer anaplásico tiroideo. Por otro lado los estudios de citotoxicidad revelaron que algunas concentraciones de BPA altas no serían tóxicas para las células a tiempos más cortos, permitiendo su utilización con la finalidad de aumentar la concentración intracelular de boro.

El valor actual del flujo de neutrones térmicos del RA1 es de 10^7 n/cm²seg. Hasta el momento los experimentos realizados irradiando células en cultivo permitieron poner a punto las técnicas que se utilizarán de aquí en adelante y resultados preliminares mostraron un efecto sobre la capacidad proliferativa de las células tumorales.