

AUTORADIOGRAPHIC IMAGES IN THE HAMSTER CHEEK POUCH ORAL CANCER MODEL

^{1,2}Portu A., ^{1,2}Molinari A.J., ²Thorp S., ²Pozzi, E.C.C., ²Curotto, P., ^{1,2}Schwint A.,
²Saint Martin G.

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

² Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

e-mail: portu@cnea.gov.ar

Abstract

The aim of this work is to summarize the autoradiographic study performed to samples from different protocols of the hamster cheek pouch oral cancer model. The qualitative analysis of histological and autoradiographic images, together with the determination of the boron concentration in the different structures of tumor, premalignant tissue and normal tissue contributed to the knowledge of the microdistribution of boron compounds. Besides, the study led to the optimization of the autoradiography technique applied to BNCT (Boron Neutron Capture Therapy).

IMÁGENES AUTORRADIOGRÁFICAS EN EL MODELO DE CÁNCER BUCAL DE LA BOLSA DE LA MEJILLA DEL HÁMSTER

^{1,2}Portu A., ^{1,2}Molinari A.J., ²Thorp S., ²Pozzi, E.C.C., ²Curotto, P., ^{1,2}Schwint A.,
²Saint Martin G.

¹ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

² Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

e-mail: portu@cnea.gov.ar

Resumen

En este trabajo se resumen los resultados obtenidos a partir del análisis autorradiográfico de muestras provenientes de diferentes protocolos en el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster. El análisis cualitativo de imágenes histológicas y autorradiográficas, junto con la determinación de la concentración de boro en las estructuras tisulares de tumores, tejido premaligno y normal, contribuyó al conocimiento de la microdistribución de diferentes compuestos borados. Además, permitió optimizar la técnica de autorradiografía neutrónica para BNCT (Terapia por Captura Neutrónica de Boro).

Introducción

A través de las imágenes de trazas generadas en detectores de trazas nucleares de estado sólido (SSNTD), es posible estudiar la distribución espacial de elementos emisores de partículas pesadas. El isótopo ^{10}B tiene una alta sección eficaz de captura neutrónica (3838 barns). Así, al exponer a un flujo de neutrones térmicos un corte de tejido que contiene boro en contacto con un SSNTD, tiene lugar la reacción $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ y las partículas alfa y Li producen un daño latente en el detector, que puede amplificarse a nivel de microscopía óptica mediante un proceso de ataque químico o etching (Fleischer et al., 1975). Mediante el análisis de la localización y densidad de las trazas nucleares de estas partículas se puede determinar la distribución de boro en el tejido. Por lo tanto, esta metodología puede ser utilizada para generar una “imagen autorradiográfica” de la muestra que permite conocer la localización de compuestos borados dentro de las estructuras tisulares. En el marco del proyecto de Terapia por Captura Neutrónica de Boro (BNCT), se estudian tanto muestras de pacientes como provenientes de modelos animales. Dependiendo del flujo de neutrones, la concentración de boro y las condiciones de etching, las trazas pueden observarse lo suficientemente separadas como para permitir la medición de la densidad de trazas (por conteo de las mismas) y a la evaluación de la concentración de boro por medio de un sistema de calibración (autorradiografía cuantitativa, AQT) (Portu et al., 2011a). Variando estas condiciones, también es posible obtener imágenes autorradiográficas con una gran densidad de trazas, pudiéndose evaluar en forma cualitativa las diferencias en los niveles de grises, y así brindar información valiosa sobre la distribución espacial de boro (autorradiografía cualitativa, AQL) (Portu et al., 2013).

Por su parte, el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster ha sido desarrollado y aplicado ampliamente para estudiar la radiobiología de BNCT en cáncer bucal. Utilizando este modelo, se ha demostrado el éxito terapéutico de protocolos de BNCT

mediado por GB-10, ya sea como único compuesto o en combinación con GB-10 (Trivillin et al., 2006) y, más recientemente, en un protocolo de BNCT secuencial en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster (Molinari et al., 2011). Este protocolo implica una primera etapa de BPA-BNCT seguida por GB-10-BNCT luego de 24 ó 48 horas. A pesar de no haberse detectado cambios significativos en la concentración de ^{10}B medida en forma global por espectrometría de masas con fuente de plasma (ICP-MS), se consideró la posibilidad de que la primera aplicación de BPA-BNCT pueda alterar apreciablemente la forma en que el GB-10 se distribuye en la segunda aplicación. Por otra parte, el tratamiento con talidomida normaliza los vasos sanguíneos tumorales anormales e incrementa el éxito terapéutico del BPA-BNCT sin exceder los límites de radiotolerancia (Molinari et al., 2012a). Combinando el tratamiento de normalización de vasos con BNCT secuencial se observó respuesta en el 100% de los tumores, sin incrementar la toxicidad en el tejido premaligno limitante de dosis (Molinari, 2012b).

En este contexto se buscó explorar los cambios potenciales en la microdistribución de boro que no pueden ser detectadas por mediciones globales de boro. El objetivo de este trabajo es presentar todos los resultados obtenidos a partir del estudio de las imágenes autorradiográficas en este modelo, para los protocolos mencionados, dando cuenta de las modificaciones y mejoras introducidas en la técnica a partir del análisis de estas muestras.

Materiales y Métodos

El modelo de la bolsa de la mejilla del hámster es un protocolo de carcinogénesis química que consiste en la aplicación de dimetilbenzantraceno en aceite mineral, 2 veces por semana durante 12 semanas (ej: Kreimann et al., 2001). Esta topicación se realiza en la bolsa derecha de la mejilla del hámster. En ella se desarrollan los tumores, que están rodeados de tejido premaligno. La bolsa contralateral es considerada tejido normal.

Se realizó un análisis autorradiográfico exhaustivo, tanto cualitativo como cuantitativo, de muestras provenientes de diferentes protocolos: animales control (sin infusión de boro), animales inyectados sólo con borofenilalanina (BPA), sólo con decahidrodecaborato de sodio (GB-10), con BPA luego de un tratamiento de normalización de vasos con talidomida, con GB-10 luego de tratamientos previos de BNCT (en el marco de BNCT secuencial, con intervalos de 24 y 48 hs) y la combinación de normalización de la vasculatura con BNCT secuencial.

Los animales fueron sacrificados luego de 3 hs de infusión de los compuestos. Los tumores se resecaron y fijaron sin fraccionar en N_2 (líq), mientras que las bolsas tratadas y contralaterales se enrollaron antes de la fijación. Se obtuvieron cortes por congelación de $30\ \mu\text{m}$, que se montaron sobre folias de policarbonato (Lexan) y polialilidiglicol (CR-39).

Las muestras se cubrieron con otra folia de Lexan. Este detector protege el material biológico y sirve como *copia de resguardo* de la imagen autorradiográfica. Los arreglos detector-muestra-detector se irradiaron en el reactor RA-3 con dos fluencias diferentes: $10^{12}\ \text{n.cm}^{-2}$ para un análisis cuantitativo (AQT) y $10^{13}\ \text{n.cm}^{-2}$ para un análisis cualitativo (AQL).

Los cortes de tejido se colorearon con hematoxilina-eosina (H&E) y se marcaron, a fin de establecer un sistema de referencia para la exploración de las muestras. Se

delimitaron las siguientes regiones de interés: parénquima y estroma en muestras de tumor, y epitelio, tejido conectivo y músculo en muestras de tejido premaligno y normal. Esto se logró utilizando un microscopio con platina motorizada.

Las folias de Lexan se atacaron con una solución alcalina de hidróxido de potasio a 70 °C durante 2 y 6 minutos, para AQT y AQL respectivamente. Las folias de CR39 se revelaron con una solución de hidróxido de sodio 6.25N durante 1 hora y se destinaron al estudio cualitativo exclusivamente. A partir del análisis de la densidad de trazas en Lexan se obtuvieron valores de concentración de boro, utilizando el sistema de calibración para la cuantificación de ^{10}B desarrollado en nuestro laboratorio (Portu et al., 2011a). Se analizaron imágenes de microscopía óptica a diferentes aumentos.

Resultados y discusión

Como primer paso, debieron establecerse las temperaturas óptimas de corte, dependiendo del tipo de tejido. Los cortes de tejido se lograron a diferentes temperaturas de congelación de los bloques: -10 °C para tumor y -25 °C para tejido premaligno y normal.

En la Figura 1 se observan dos ejemplos del AQL (imagen histológica y autorradiográfica) para muestras de tumor de animales inyectados con (a) BPA y (b) GB-10. Se comprobó que el BPA se acumula preferencialmente en el parénquima tumoral, de acuerdo con su transporte activo. Por su parte, se demostró que el GB-10 tiene una distribución heterogénea, acumulándose preferencialmente en el estroma. De todas formas, su heterogeneidad es menos marcada que la del BPA.

Se realizó el mismo análisis para tejido premaligno y normal. Como se muestra en la Figura 2, el ^{10}B se acumuló preferencialmente en el epitelio cuando el compuesto administrado es BPA, mientras que las zonas de mayor concentración corresponden al tejido conectivo en el caso de GB-10. El patrón de distribución en tejido normal es el mismo que en tejido premaligno.

Dado que la normalización de la vasculatura mejora la entrega de compuestos, las imágenes pertenecientes a los protocolos con administración de talidomida son más homogéneas que las de sólo BPA. En la Figura 3(a) se presenta el análisis cualitativo para el protocolo talidomida-BPA y en la Figura 3(b), el correspondiente para Talidomina-BNCT secuencial. La mayor homogeneidad se logró en este último protocolo. Es importante mencionar que por primera vez se evidenció, además, una distribución más homogénea en el tejido premaligno, mientras que la distribución del GB-10 en el tejido normal no se vio afectada por el tratamiento con talidomida y posterior irradiación con BPA, como se observa en el ejemplo de la Figura 4.

Para llevar a cabo la AQT, fue necesario implementar un sistema de marcado, que consistió en realizar pequeñas perforaciones circulares (diámetro ~ 0.5 mm). El posicionamiento de las muestras en el microscopio se logró utilizando dos orificios por muestra, a fin de reproducir (luego del etching) la ubicación original tanto en el eje x como en el eje y . Al explorar las muestras coloreadas, se delimitaron las zonas de interés de forma tal de poder fotografiar campos completos de cada región. Para algunos tumores indiferenciados no fue posible delimitar zonas de parénquima y estroma y sólo se determinó la concentración global, promediando 50 campos. En los gráficos de la Figura 5 se observan los valores de concentración absoluta de boro. En la Tabla I se resumen los índices P/E, que es la relación de concentración de ^{10}B entre parénquima y estroma e indica el grado de homogeneidad de la distribución de boro en tumor. El

índice 1 corresponde al mayor grado de homogeneidad y corresponde al protocolo talidomida-BNCT secuencial, que alcanzó una respuesta del 100%.

Las imágenes cualitativas no permitieron evidenciar diferencias en la distribución de boro entre protocolos de BNCT secuencial, siendo similar a la correspondiente al caso en que se administra sólo GB-10. Sin embargo, el análisis cuantitativo permite concluir que la microdistribución de GB-10 se ve afectada por una aplicación de BPA-BNCT previa, cuando el intervalo es de 24 hs, logrando una mayor homogeneidad del compuesto. La relación de concentraciones entre parénquima y estroma es 0.9, mientras que para BNCT secuencial 48 hs y GB-10 solo es 0.7.

Cabe destacar que para la cuantificación del epitelio en tejido premaligno y normal, se procedió de manera diferente al resto de las estructuras. Como el epitelio es muy delgado (aprox. 10 μm), no se pudieron obtener fotografías donde todo el campo estuviera comprendido por epitelio. Como las bolsas (tanto la topicada como la contralateral) se enrollaron para armar los tacos, los cortes obtenidos tenían bordes formados por epitelio, en la mayor parte de las regiones. Estas zonas fueron las seleccionadas para cuantificar epitelio. Debido a la pérdida de localización espacial que se produce al eliminar el corte del detector, como paso previo al proceso de etching, las zonas de epitelio internas del corte no pudieron ser exploradas con el sistema de marcado y posicionamiento actuales. Esto se debe a que las imágenes cuantitativas tienen poca densidad de trazas, por lo que no es posible visualizar las diferencias entre estructuras observando cambios en el nivel de gris. Como se mencionó anteriormente, para estas condiciones las trazas se ven separadas unas de otras, que es lo que hace posible la cuantificación.

Por lo tanto, se delimitaron “franjas” del borde, de un ancho equivalente al espesor promedio del epitelio explorado. Se contó la cantidad de trazas y se midió el área de esa región, para obtener la densidad de trazas. Este método tiene mucha más incertidumbre que las mediciones realizadas en las otras zonas. El rescamamiento del tejido, la presencia de zonas de descamación, el error al delimitar el área, entre otros factores, afectan en gran medida el resultado final. De todas formas, los valores obtenidos son coherentes con las imágenes cualitativas y con los valores de las otras estructuras. Para aumentar la resolución espacial, podría sensibilizarse previamente el detector mediante irradiación UV-C, a fin de lograr una impronta del tejido que permita definir contornos en la muestra (Portu et al., 2011b). Se observa un ejemplo en la Figura 6.

Por su parte, las muestras correspondientes al protocolo talidomida-BPA estaban montadas sobre CR-39. Si bien la delimitación de las zonas de interés se realizó sobre esta folia, la cuantificación de la densidad de trazas se realizó sobre la folia de Lexan (copia de resguardo) que se irradió adherida al arreglo muestra-CR39. Para ello, se debió adaptar el sistema de referencia, dado que las imágenes autorradiográficas generadas en CR-39 y Lexan estaban invertidas en forma especular. Así, las particularidades de los cortes pertenecientes a este modelo permitieron optimizar la técnica de autorradiografía y establecer los límites de aplicación de la misma.

Conclusiones

Se comprobaron diferencias en la microdistribución de los compuestos borados y se determinó que la homogeneidad en la distribución de boro en tumor está correlacionada con el éxito terapéutico, descrito en trabajos previos. Además, el

estudio detallado de un gran número de muestras, ha permitido optimizar la técnica de autorradiografía para BNCT y ha evidenciado la necesidad de avanzar hacia aproximaciones de la metodología que alcancen una mayor resolución espacial.

Referencias bibliográficas

- Fleischer, R.L., Price, P., Walker, R.M., 1975. Basics of track etching. In: Nuclear Tracks in Solids. Berkeley, University of California Press.
- Kreimann, E., Itoiz, M., Longhino, J., Blaumann, H., Calzetta, O., Schwint, A., 2001b. Boron Neutron Capture Therapy for the Treatment of Oral Cancer in the Hamster Cheek Pouch Model. *Cancer Res.* 61:8638–8642.
- Molinari, A.J., Pozzi, E.C., Monti Hughes, A., Heber, E.M., Garabalino, M.A., Thorp, S.I., Miller, M., Itoiz, M.E., Aromando, R.F., Nigg, D.W., Quintana, J., Santa Cruz, G.A., Trivillin, V.A., Schwint, A.E., 2011. "Sequential" boron neutron capture therapy (BNCT): a novel approach to BNCT for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Radiat Res.* 175(4):463-72.
- Molinari, A.J., Pozzi, E.C.C., Monti Hughes, A., Heber, E.M., Garabalino, M.A., Thorp, S.I., Miller, M., Itoiz, M.E., Aromando, R.F., Nigg, Trivillin, V.A., Schwint, A.E., 2012a. Tumor blood vessel “Normalization” improves the therapeutic efficacy of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in experimental oral cancer. *Radiat. Res.* 177:59-68.
- Molinari, A., 2012b. Captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer bucal: desarrollo de nuevas modalidades de BNCT, evaluación de su radiobiología, eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad en un modelo de hámster. Tesis de Doctorado. Fac. de Cs. Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Portu, A., Bernaola, O.A., Nievas, S., Liberman, S., Saint Martin, G., 2011a. Measurement of ^{10}B concentration through autoradiography images in polycarbonate nuclear track detectors. *Rad. Meas.* 46:1154-1159.
- Portu, A., Rossini, A., Gadan, M.A., Bernaola, O.A., Saint Martin, G., 2011b. Autorradiografía en detectores de trazas nucleares: visualización simultánea de células y trazas originadas en ^{10}B . Reunión Anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear. Buenos Aires, Argentina.
- Portu, A., Carpano, M., Dagrosa, A., Cabrini, R.L., Saint Martin, G., 2013. Qualitative autoradiography with polycarbonate foils enables histological and track analyses on the same section. *Biotech Histochem* 88(5):217-221.
- Trivillin, V., Heber, E., Nigg, D., Itoiz, M., Calzetta, O., Blaumann, H., Longhino, J., Schwint, A., 2006. Therapeutic success of boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by a chemically non-selective boron agent in an experimental model of oral cancer: a new paradigm in BNCT radiobiology. *Radiat. Res.* 166(2):387-96.

Figuras

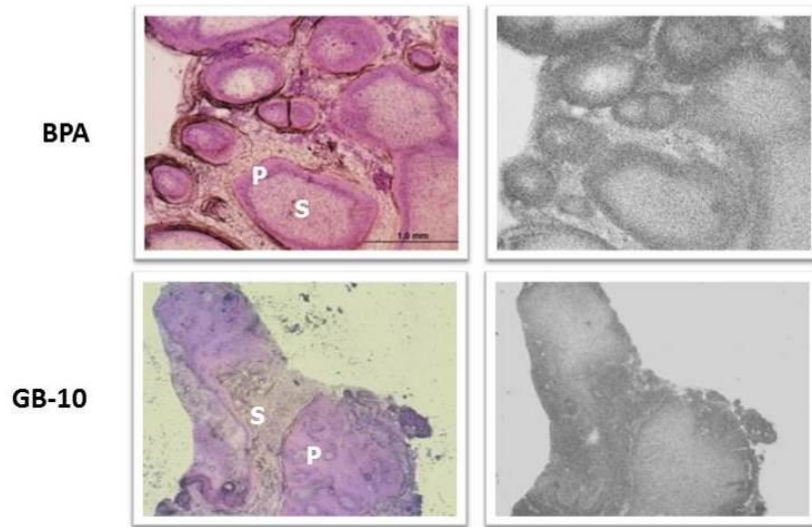


Figura 1. Cortes de tumor coloreados con hematoxilina-eosina y sus imágenes autorradiográficas correspondientes, para los protocolos BPA y GB-10.

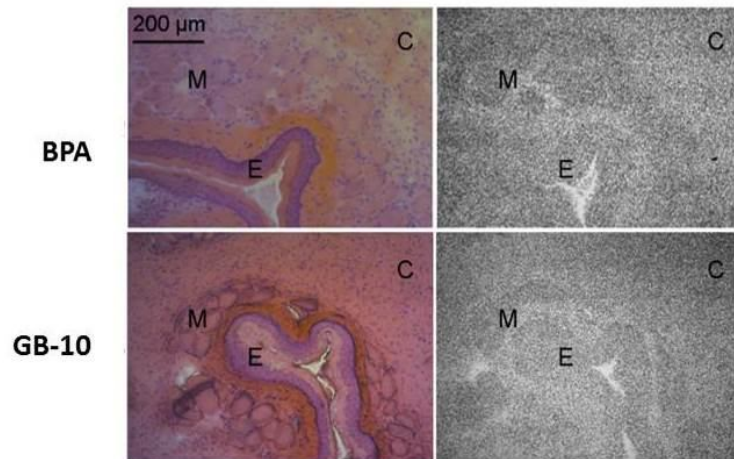


Figura 2. Cortes de tejido premaligno coloreados con hematoxilina-eosina y sus imágenes autorradiográficas correspondientes, para los protocolos BPA y GB-10.

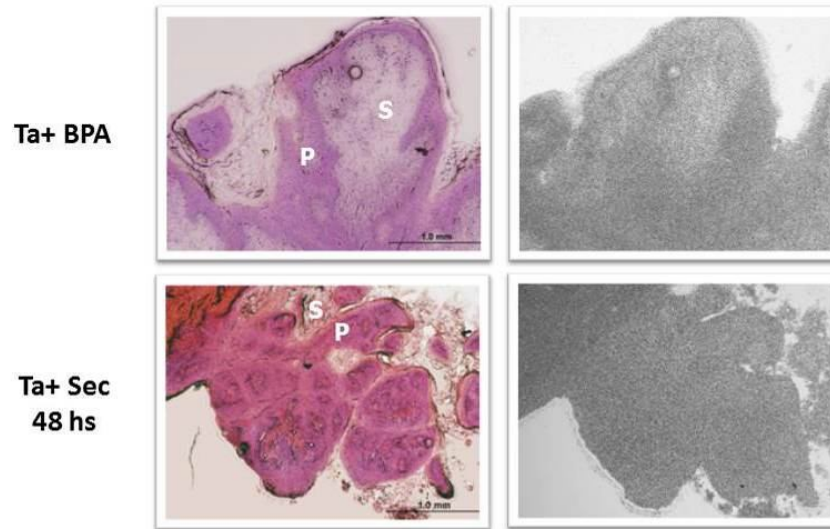


Figura 3. Cortes de tumor coloreados con hematoxilina-eosina y sus imágenes autorradiográficas correspondientes, para los protocolos talidomida-BPA (Ta+BPA) y talidomida-BNCT secuencial (Ta+sec 48 hs).

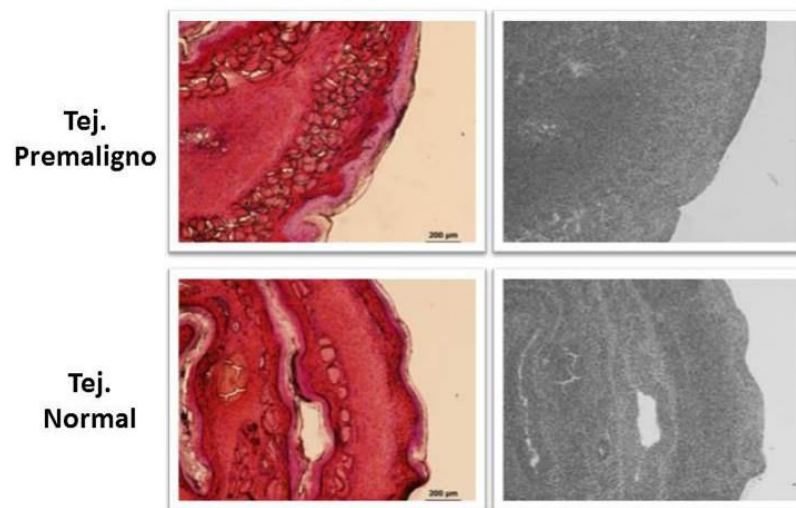


Figura 4. Cortes de tejido premaligno y normal coloreados con hematoxilina-eosina y sus imágenes autorradiográficas correspondientes, para el protocolo talidomida-BNCT secuencial.

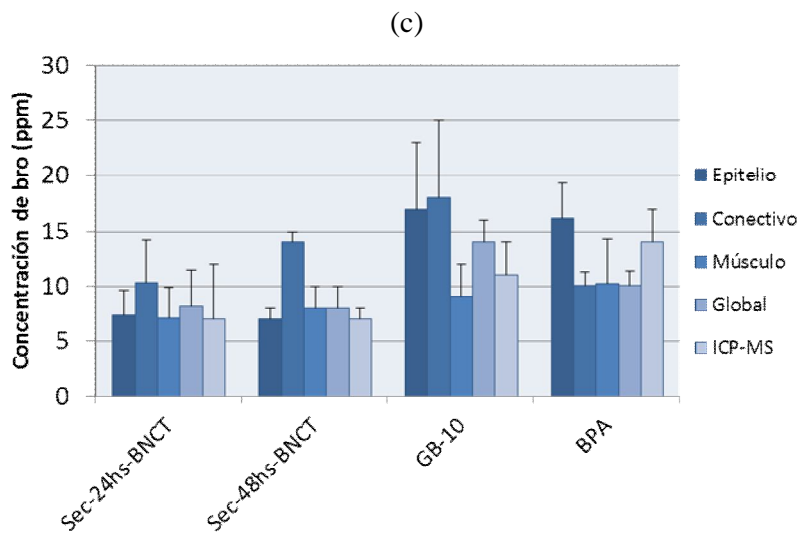
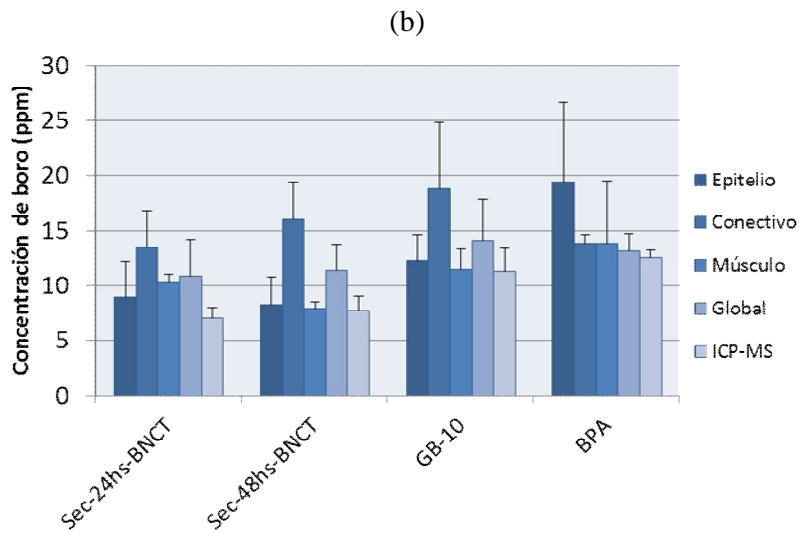
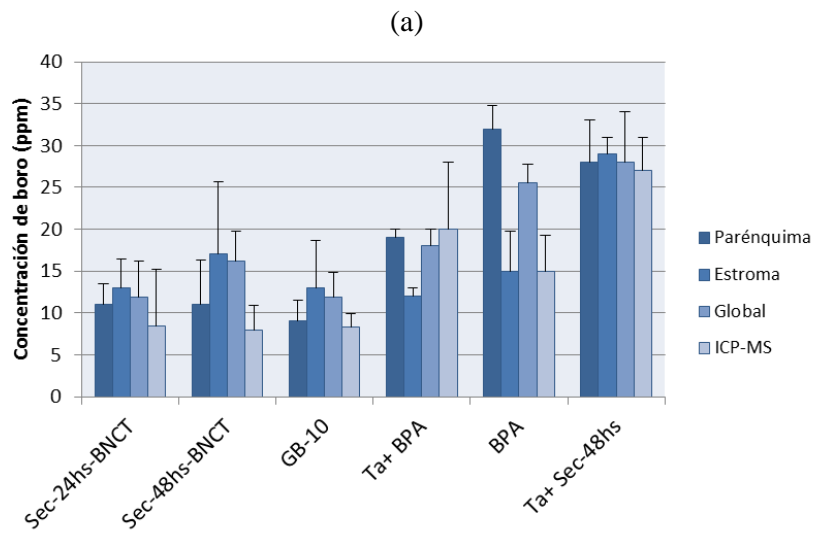


Figura 5. Análisis cuantitativo para (a) tumor, (b) tejido premaligno y (c) tejido normal.

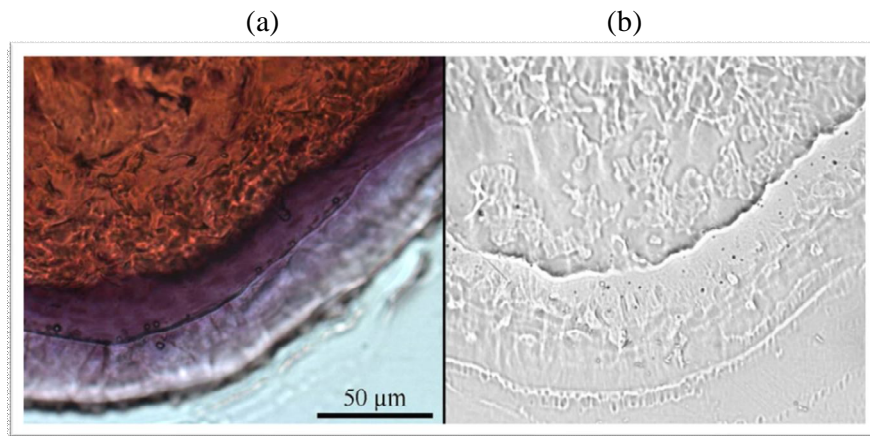


Figura 6. (a) Corte de tejido premaligno coloreado con hematoxilina-eosina, donde pueden evidenciarse el tejido conectivo y el epitelio en el borde. (b) impronta de tejido y trazas sobre Lexan, luego de su sensibilización con UV-C (254 nm, 1 h) y su revelado con PEW 70°C, 6 min.

Protocolo	P/E
Sec-24	0,9
Sec-48	0,7
GB-10	0,7
BPA	2,2
Ta+ BPA	1,6
Tali Sec	1,0

Tabla I. Relación de concentración de ^{10}B entre parénquima y estroma (P/E). Indica el grado de homogeneidad de la distribución de boro en tumor, para todos los protocolos analizados.