

ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA RESPUESTA CELULAR A LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN CARCINOMA DE TIROIDES.

Rodríguez C¹; Carpano M¹; Perona M¹; Thorp S², Curotto P³, Pozzi E³, Casal M⁴, Juvenal G^{1,5}, Pisarev M^{1,5}, Dagrosa A^{1,5}.

¹Departamento de Radiobiología (CAC), ²Departamento de Instrumentación y Control, ³RA-3, Reactores de Investigación y Producción, (CAE), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Av. Libertador 8250 (1429), Buenos Aires, Argentina. ⁴Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", (UBA), Avenida San Martín 5481, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Rivadavia 1917, (1033) Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT

Background: Previously, we have started to study the mechanisms of DNA damage and repair induced by BNCT in thyroid carcinoma some years ago. We have shown different genotoxic patterns for tumor cells irradiated with gamma rays, neutrons alone or neutrons plus different compounds, boronophenylalanine (BPA) or α,β -dihydroxyethyl)-deutero-porphyrin IX (BOPP). In the present study we analyzed the expression of Ku70, Rad51 and Rad54 components of non homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination repair (HRR) pathways, respectively, induced by BNCT in human cells of thyroid carcinoma. **Methods:** A human cell line of follicular thyroid carcinoma (WRO) in exponential growth phase was distributed into the following groups: 1) Gamma Radiation, 2) Radiation with neutrons beam (NCT), 3) Radiation with n_{th} in presence of BPA (BNCT). A control group for each treatment was added. The cells were irradiated in the thermal column facility of the RA-3 reactor (flux= 1.10^{10} n/cm² sec) or with a source of ⁶⁰Co. The irradiations were performed during different lapses in order to obtain a total physical dose of 3 Gy ($\pm 10\%$). The mRNA expressions of Ku70, Rad 51 and Rad 54 were analysed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at different times post irradiation (2, 4, 6, 24 and 48 h). DNA damage was evaluated by immunofluorescence using an antibody against the phosphorylation of histone H2AX, which indicates double strand breaks in the DNA. **Results:** The expression of Rad51 increased at 2 h post-irradiation and it lasted until 6 h only in the neutron and neutron + BPA groups (p<0.05). Rad54 showed an up-regulation from 2 to 24 h in both groups irradiated with the neutron beam (with and without BPA) (p<0.05). On the other hand, Ku70 mRNA did not show a modification of its expression in the irradiated groups respect to the control group. **Conclusion:** these results would indicate an activation of the HRR pathway in the thyroid carcinoma cells treated by BNCT. Ku70 genetic expression was not modified suggesting an effect either at the translation or by inhibiting protein degradation. The knowledge of repair mechanisms will allow to manipulate the tumor response to the irradiation.

Introducción:

La terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) es una modalidad radioterapéutica para el tratamiento del cáncer que se basa en la reacción nuclear $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$. El éxito de esta terapia dependería en primera instancia de la habilidad de los compuestos de boro para concentrarse selectivamente en el tumor (1). Diferentes centros de medicina nuclear con acceso a un reactor nuclear, han desarrollado ensayos clínicos para el tratamiento de tumores cerebrales de alto grado o melanomas cutáneos en pacientes (2,3). En general en estos protocolos se utiliza el aminoácido borofenilalanina (^{10}BPA) con escasos efectos tóxicos, sin embargo otros compuestos de boro están siendo evaluados constantemente (1). En nuestro laboratorio demostramos que BNCT podía ser una alternativa al tratamiento del cáncer de tiroides (CT), tanto del carcinoma anaplásico como del carcinoma diferenciado recurrente (4-7).

Los tumores malignos de tiroides en general pierden la capacidad de concentrar yodo radioactivo y por lo tanto no pueden ser tratados por la iodoterapia o por cualquiera de las terapias convencionales (8). Los estudios de BNCT usando ^{10}BPA o la porfirina borada tetrakis-carborane carboxylate ester of 2,4-bis (α,β -dihydroxyethyl)-deuteroporphyrin IX ($^{10}\text{BOPP}$), realizados *in vitro* y en ratones *nude* implantados con líneas humanas de CT, mostraron un 100% de inhibición del crecimiento tumoral y un 100% de remisión completa en animales con tumores menores a 50 mm^3 durante 90 días post irradiación, observándose luego de este tiempo recurrencia en algunos de ellos (6).

Muy poco se sabe respecto a los mecanismos que juegan un rol en el daño tumoral producido por BNCT. Los procesos de reparación (recombinación homóloga y de extremos no homólogos) y la regulación del ciclo celular son las dos respuestas más importantes al daño en la doble cadena al DNA en células de mamífero. El daño en el ADN inducido por radiación ionizante (tanto de alto como bajo LET) inicia señales que pueden activar temporalmente *checkpoints* en el ciclo celular. Estos puntos de chequeo forman parte de una respuesta celular integrada que involucra proteínas efectoras (CDK, p21, p53, p27, etc) que permiten la reparación genética y la progresión en el ciclo celular o que conducen a la inhibición irreversible de crecimiento y a la muerte celular (9). Por otro lado, las proteínas que participan en el mecanismo de recombinación de extremos no homólogos incluyen componentes de DNA-PK que comprenden Ku70, Ku86, XRCC4 y DNA Lig 4 (10) y dentro de las que participan en el mecanismo de recombinación homóloga se encuentran las pertenecientes a las familia de genes Rad52 Epistasis Group, entre ellos, Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad58 (11). Distintos trabajos mostraron una relación entre la *down regulation* de las proteínas de reparación y una respuesta potenciada a la radiación (12).

El conocimiento de todos los mecanismos desencadenados en el CT por la aplicación de BNCT permitiría manipular la respuesta de la célula a la irradiación lo que contribuirá a la mejora terapéutica.

Una de las respuestas más tempranas ante una lesión doble cadena en el ADN, es la fosforilación principalmente por la proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) de la histona H2AX, una variante de la histona H2A, en los sitios del daño, en la serina 139 dentro de la conservada región COOH terminal, inmediatamente después del quiebre, resultando en un foco discreto de γH2AX en el sitio del daño. La fosforilación de esta histona provoca que la cromatina se descondense para que las proteínas de reparación tengan acceso al sitio del daño. De manera que la fosforilación de H2AX es crucial para una correcta reparación del ADN ya que recluta a distintos factores de señalización y reparación de la misma (15).

En la última década, la fosforilación de la histona H2AX ha sido usada como una forma de medición de la formación y reunión de DSB (double strand breaks) inducidas por diferentes compuestos químicos o por radiación. Se ha demostrado que el número de focos es directamente proporcional a la cantidad de DSBs y que la defosforilación de la misma se correlaciona con la reparación. La detección local y microscópica de los focos de γ H2AX en el interior del núcleo es el método más sensible y que mejor se correlaciona con el daño doble cadena individualmente (16).

El objetivo del trabajo fue estudiar los mecanismos de daño y reparación al ADN, inducidos por BNCT en células de carcinoma de tiroides en cultivo utilizando el aminoácido borofenilalanina (^{10}BPA).

Materiales y métodos

1. a Línea celular.

Para estos estudios se utilizaron células de la línea humana de cáncer folicular de tiroides WRO, cedida amablemente por el Dr. G. Juillard (UCLA, USA). Las células WRO fueron cultivadas en estufa a 37°C en una atmósfera al 5% de dióxido de carbono (CO_2) y humedad a saturación

1. b Solución de BPA

El BPA [Boron Biologicals Inc., Raleigh, USA] se preparó a una concentración de 30mg/ml (0,14 M). Este compuesto de boro (L-fenilalanina enriquecido con 95% de átomos de ^{10}B) fue combinado en agua con fructosa en una relación 1:1. A continuación se ajustó el pH a 9,5-10 con una solución de hidróxido de sodio 10N y luego fue reajustado a 7,4 con ácido clorhídrico 6N.

1. c Diseño Experimental:

Las células fueron irradiadas en fase exponencial de crecimiento (50-70% de confluencia) con la adición de BPA (10 μg 10B/ml) 16 hs antes de la irradiación.

Las células fueron irradiadas con dos fuentes distintas: para la irradiación con rayos γ se utilizó una fuente de cobalto-60 (^{60}Co) del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", mientras que la irradiación con el haz de neutrones (n_{th}) se realizó en la facilidad del reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza (CAE) de la CNEA, colocándose las muestras en la cavidad porta-muestras.

Los grupos experimentales fueron los siguientes: 1)Irradiación gamma, 2) Irradiación con el haz de neutrones (NCT), 3) Irradiación con n_{th} en presencia de BPA (BNCT). Por cada uno de estos grupos se realizó un control no irradiado. Las irradiaciones se realizaron durante los tiempos necesarios para alcanzar una dosis absorbida total de 3 Gy. Las células a ser tratadas con BPA fueron cultivadas con dicho compuesto borado en una concentración de 10 ppm. de ^{10}B durante 16 hs previo a la irradiación. El tiempo de incubación fue seleccionado basándose en estudios previos de

captación celular en función del tiempo. A este tiempo se observó un pico de boro en el tumor para el BPA (17). Al término de cada irradiación se reemplazó el medio de cultivo por medio nuevo y se incubaron las células durante distintos tiempos (2, 4, 6, 24 y 48 horas) a 37°C. Luego de la incubación se realizaron extracciones de ARN total seguido de la síntesis de cDNA y PCR (RT-PCR) de genes específicos, indicadores de la activación del mecanismo de recombinación de extremos no homólogos y del de recombinación homóloga respectivamente (Ku70, Rad51, Rad54).

Los estudios de daño al ADN inducido por la radiación proveniente de BNCT, NCT y gamma se hicieron en las condiciones previamente descriptas. La evaluación del daño se realizó por la técnica de inmunofluorescencia de la histona H2Ax fosforilada a diferentes tiempos: 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas.

1. d Dosimetría

Todas las irradiaciones en este reactor fueron realizadas a una potencia de 8 MW. El flujo neutrónico térmico se determinó usando un detector autoenergizado en base a rodio, el cual fue calibrado usando hojuelas de cobalto. Las determinaciones del flujo neutrónico epitérmico y rápido se realizaron con hojuelas de activación bajo cadmio y una hojuela de indio bajo cadmio y esfera de boro respectivamente. Los resultados de estas mediciones mostraron ser varios órdenes de magnitud menores a las obtenidas para el flujo térmico, motivo por cual no fueron tenidas en cuenta para el cálculo de la dosis. Finalmente, para la medición de la dosis presente en el haz neutrónico se utilizó una cámara de ionización de grafito, blindada con un capuchón de litio. La tasa de dosis de la irradiación realizada con la fuente de ^{60}Co fue de 1Gy/min con una incerteza del 5%.

2) RT-PCR

La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de ARN total utilizando como primer Oligos dT. El producto de la retrotranscripción se utilizó para PCR a tiempo final utilizando primers específicos para las secuencias de los transcritos de Ku70, Rad51 y Rad54. Se amplificó paralelamente el gen GADPH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga.

5) Inmunofluorescencia y cuantificación de la histona H2Ax fosforilada en células WRO irradiadas y controles.

5.a Inmunofluorescencia:

Luego de las irradiaciones las células fueron mantenidas a 37°C y 5% de CO_2 . Cada placa p60 fue fijada en 3 ml de paraformaldehído 4% en PBS 1X durante 15 minutos a distintos tiempos postirradiación: 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas, permeabilizadas con Tritón X-100 0,5% en PBS durante 15 minutos a 4°C y bloqueadas con suero fetal bovino 5% durante 30 minutos. Se incubaron las células overnight con el anticuerpo monoclonal anti- γH2AX (Upstate, LakePlacid, NY), 1:500 en agua miliQ. Al otro día fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (Upstate,

LakePlacid, NY), 1:200 in PBS por una hora en oscuridad. Pasado ese tiempo cada placa teñida y montada con antifade Vectashield con DAPI en la oscuridad.

Resultados:

1) Expresión ARNm de proteínas de reparación

1.a) Efecto de BNCT en la expresión de los ARNm de la proteína Rad51 a diferentes tiempos luego de la irradiación.

En la **Figura 1** se compara la expresión relativa del Rad51 en función del tiempo post irradiación entre los distintos tratamientos. A las 2 h se observa un aumento en la expresión de Rad51 para todos los grupos irradiados con respecto al grupo Control de células sin irradiar. Este aumento en el ARNm de Rad51 se mantiene hasta las 6 h para los dos grupos irradiados con el haz de neutrones (NCT y BNCT) únicamente; para el grupo irradiado con gamma la expresión de esta proteína desciende.

Rad51 es la enzima principal que lleva a cabo la reparación de las lesiones doble cadena del ADN mediante la vía de recombinación homóloga ante una injuria tal como la radiación. De manera que el aumento de sus niveles de expresión luego de que las células son irradiadas es consistente con la activación de este sistema, y además es apreciable la diferencia entre los distintos tipos de radiación, siendo esta mayor en los grupos neutrones con o sin incubación con BPA.

1.b) Efecto de BNCT en la expresión de los ARNm de la proteína Rad54 a diferentes tiempos luego de la irradiación.

La **Figura 2**, muestra como varían los niveles de ARNm de Rad54 a lo largo del tiempo. Puede observarse que estos aumentan respecto al control en aquellas células irradiadas con neutrones en ausencia o en presencia de BPA entre las 4 y las 24 horas post irradiación. Esto confirmaría una activación de la vía de reparación homóloga luego de la irradiación con el haz de neutrones.

Rad54 es una de las enzimas pertenecientes al grupo de epistasis de Rad52 y junto a Rad51 son indicadores validados de la activación de la vía de reparación por medio de recombinación homóloga.

1.c) Efecto de BNCT en la expresión de los ARNm de la proteína Ku70 a diferentes tiempos luego de la irradiación

Puede observarse que no hay diferencias considerables en los niveles de expresión de Ku70 en los distintos tratamientos a ninguno de los tiempos estudiados (**Figura 3**). Ku70 participa en la reparación del daño al ADN doble cadena, mediante el mecanismo de unión de extremos no homólogos. Este mecanismo es la vía de reparación más frecuente ante daños al ADN doble cadena en mamíferos. Es por esto que probablemente Ku70, al ser una enzima involucrada en procesos que requieren de su rápida intervención, esté sujeta a regulaciones a nivel proteico más que a nivel de su ARN mensajero. Por otro lado, es posible que el mecanismo esté *down* regulado luego de la radiación y por ello no se detecten cambios en la expresión de sus mensajeros.

2) *Estudio de la inducción y reparación del daño doble cadena al ADN mediante la cuantificación de la fosforilación de la histona H2AX en células de cáncer diferenciado de tiroides.*

2.a) *Imágenes*

2.b) *Distribución de frecuencia de focos por tratamiento y por tiempos.*

En la **Figura 5** se muestran los gráficos de frecuencia de número de focos para cada grupo. Se observa que en el grupo control (**Figura 5A**) casi el 90% de las células presenta en promedio entre 0 y 20 focos y que este valor se mantiene en el tiempo. En el grupo irradiado con 3Gy de radiación gamma, a tiempos cortos, la mayoría de las células presenta en promedio de 20 a 30 focos por célula. A tiempos mayores estos valores disminuyen, pero no llegan a ser iguales que en el grupo control, sino que más elevados. En el grupo BNCT (neutrones+BPA) (**Fig 5C**) a los 30 minutos, hay un número mayor de células que presentan entre 10 y 30 focos; mientras que a partir de 1 hora luego de la irradiación se mantiene la mayor proporción con un promedio de 10 a 20 focos hasta incluso pasadas 24 horas. Al igual que ocurre en el grupo gamma, la proporción de células que presenta mayor cantidad de focos va disminuyendo con el tiempo, sin embargo los valores no vuelven a ser como en el grupo control. Algo similar ocurre en el grupo irradiado solo con neutrones. A tiempos cortos la mayor parte de las células, presenta entre 10 y 20 focos en promedio. Y a medida que pasa el tiempo, esta proporción va disminuyendo, presentando la mayoría hasta 10 focos por célula en promedio. Puede verse claramente que el grupo BPA presenta incluso mayor daño a los 30 minutos de lo que presenta el grupo neutrones solos y la proporción de células con un promedio de focos mayor es más persistente en el tiempo. En esta Figura puede observarse que independientemente del tratamiento, las células que fueron irradiadas, no se recuperan completamente y aún después de transcurrido un tiempo considerable como ser 24 horas, las células presentan mayor daño que antes de ser irradiadas. De manera que el daño por radiación estaría causando un cambio irreversible que se mantiene en el tiempo y que si bien los mecanismos de reparación al activarse remedian algo del daño, las células no vuelven al estado inicial, quedando dañadas y susceptibles de ser eliminadas con el tiempo si el daño persiste.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados, la expresión de los mensajeros de la proteína Rad51 aumenta a las 2 h para todos los grupos irradiados con respecto al grupo control de células sin irradiar. Este aumento en el ARNm de Rad51 se mantiene hasta las 6 h para los dos grupos irradiados con el haz de neutrones (NCT y BNCT) únicamente; para el grupo irradiado con gamma la expresión de esta proteína desciende.

Rad54 aumenta respecto al control en aquellas células irradiadas con neutrones en ausencia o en presencia de BPA entre las 4 y las 24 horas post irradiación. Estos resultados se condicen con una activación de la vía de reparación por medio de recombinación homóloga luego de la irradiación con el haz de neutrones. Esto indicaría en principio que la reparación se está llevando a cabo y que de hacerlo correctamente, esa célula sobrevivirá y volverá a dar un fenotipo tumoral.

En el laboratorio recientemente demostramos que el patrón de genotoxicidad inducido por BNCT es mayor y diferente de aquel generado por la radiación gamma y

que la irradiación tumoral con neutrones en presencia de BOPP disminuye la expresión proteica de Ku70 a las 24 horas post tratamiento (13,14).

La proteína Ku70 es la principal en la vía de reparación por la unión de extremos no homólogos y no muestra cambios apreciables en los niveles de sus mensajeros indicando que esta vía podría no estar activa o estar *down* regulada o regulada a nivel de la proteína .

También pudimos observar que a los 30 minutos post irradiación, el promedio de focos de daño por célula aumenta casi al doble luego de la irradiación en comparación al control y a medida que pasa el tiempo este valor disminuye hasta igualarse a este. A este tiempo, el grupo neutrones+BPA muestra un mayor daño que el grupo irradiado con neutrones solo y que persiste en el tiempo mas que neutrones y gamma. El grupo gamma muestra los mayores valores en los parámetros evaluados.

Referencias

- 1) Coderre JA, Morris GM. Radiat. Res. 1999; 151:1-18.
- 2) Busse PM, Harling OK, Palmer MR, et al. J Neurooncol 2003; 62: 111-121.
- 3) Aihara T, Hiratsuka J, Morita N, et al. Head Neck 2006; 28: 850-855.
- 4) Dargosa MA, Viaggi M, Kreimann E, et al. MA. Thyroid 12 (1): 7-12; 2002.
- 5) Dargosa MA et al, Viaggi M, Longhino J, et al. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys, 57:1084, 2003.
- 6) Dargosa MA, Thomasz L, Longhino J, et al. Int. J. of Radiat. Nöclo. Biol. Phys 2007; 69 (4): 1059-1066.
- 7) Pisarev M, Dargosa MA, Juvenal G. Arq Bras Endocrinol Metab 2007; 51(5):852-856.
- 8) Pasiaka JL. Current opinion in Oncology 2003; 15: 78-83.
- 9) Pawlik T and Keyomarsi K. Int. J Radiat. Oncol. Biol. Phys 2004; 59 (4): 928-942.
- 10) Olive PL. Radiat Res. 1998; 150: 842-851.
- 11) Stefan Sigurdsson, Stephen Van Komen, Galina Petukhova and Patrick Sung. The Journal of Biological Chemistry 2002, Vol 277, N°45, pp 42790-42794.
- 12) Anupama M, Kurland JF, Nishikawa T, et al. Clinical Cancer Res. 2005 ; 11(13):4912-22
- 13) Dargosa MA, Crivello M, Thorp S, et al. Int. J. of Radiat. Oncol. Biol. Physics. 2011; 79(1): 262-268.
- 14) Perona M, Pontiggia O, Carpano M, Thomasz L, Thorp S, Pozzi E, Simian M, Kahl S, Juvenal G, Pisarev M, Dargosa A. Applied Radiation and Isotopes; 2011 (en prensa).
- 15) Sandeep Burman, Benjamin p. Chen, Michael Murphy, Akihiro Kurimasa y David J. Chen. The Journal of Biological Chemistry 2001, Vol 276, N°45, pp 42462-42467.
- 16) Irene Ibañez, Candelaria Bracalante, Beatriz Molinari, Monica A. Palmieri, Lucía Policastro, Andrés J. Kreiner, Alejandro A. Burlon, Alejandro Valda, Daniela Navalesi, Jorge Davidson, Miguel Davidson, Mónica Vazquez, Mabel Ozafrán y Hebe Durán. Int. J Radiat. Oncol. Phys 2009. Vol 74, N°4, pp. 1226-1235.
- 17) Dargosa MA, Viaggi M, Kreimann E, Garavaglia R, Farías S, Agote M, Cabrini RI, Juvenal G, Pisarev MA. Selective biodistribution of p-borophenylalanine by undifferentiated thyroid carcinoma for boron neutron capture therapy (BNCT). Thyroid 12 (1): 7-12; 2002).

Figuras

1) Expresión ARNm de proteínas de reparación

1.a) Efecto de BNCT en la expresión de los ARNm de la proteína Rad51 a diferentes tiempos luego de la irradiación.

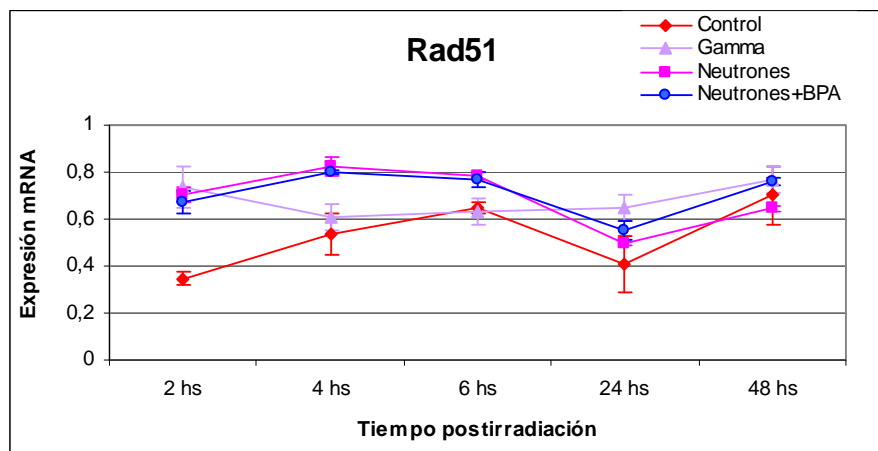


Figura 1: Niveles de expresión relativos de Rad51 en función del tiempo post irradiación en los grupos de células control sin irradiar (C), células irradiadas con radiación γ (gamma), células irradiadas con neutrones sin BPA (N) y células irradiadas con neutrones en presencia de BPA (BNCT). Cada punto es el promedio \pm SD de 3 irradiaciones independientes.

1.b) Efecto de BNCT en la expresión de los ARNm de la proteína Rad54 a diferentes tiempos luego de la irradiación.

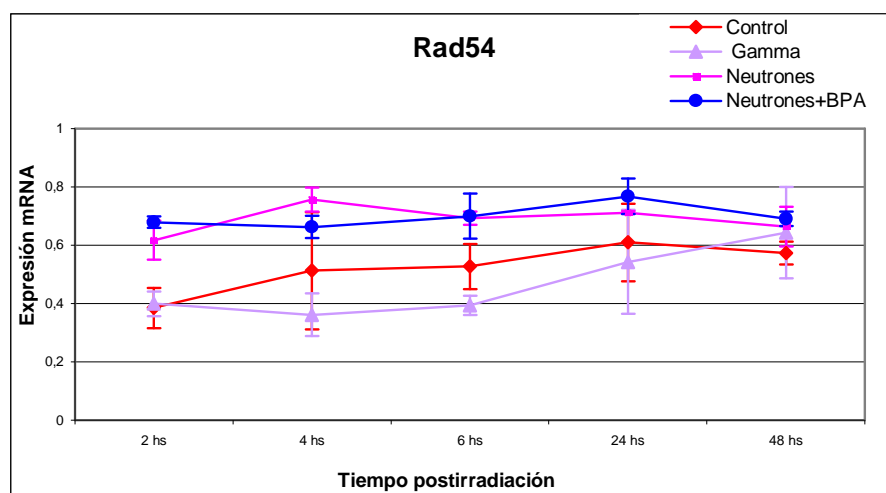


Figura 2: Niveles de expresión relativos de Rad54 en función del tiempo post irradiación en los grupos de células control sin irradiar (C), células irradiadas con radiación γ (gamma), células irradiadas con neutrones sin BPA (N) y células irradiadas con neutrones en presencia de BPA (BNCT). Cada punto es el promedio \pm SD de 3 irradiaciones independientes.

1.c) Efecto de BNCT en la expresión de los ARNm de la proteína Ku70 a diferentes tiempos luego de la irradiación

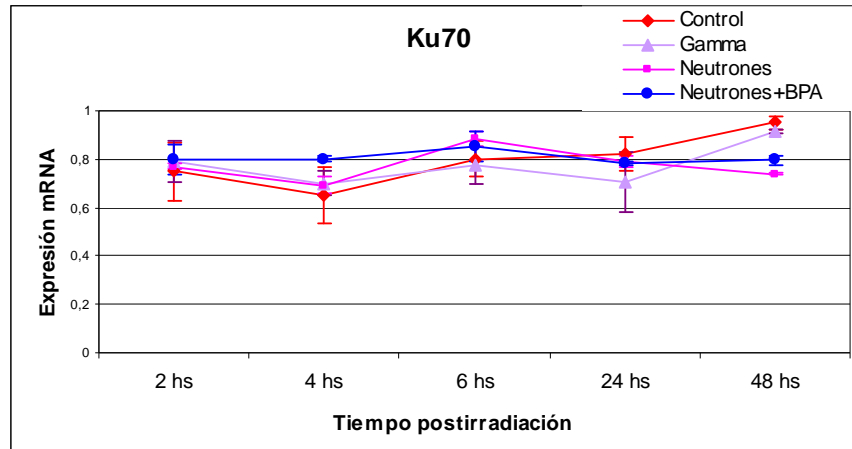


Figura 3: Niveles de expresión relativos de Ku70 en función del tiempo post irradiación en los grupos de células control sin irradiar (C), células irradiadas con radiación γ (gamma), células irradiadas con neutrones sin BPA (N) y células irradiadas con neutrones en presencia de BPA (BNCT). Cada punto es el promedio \pm SD de 3 irradiaciones independientes.

2) Estudio de la inducción y reparación del daño doble cadena al ADN mediante la cuantificación de la fosforilación de la histona H2AX en células de cáncer diferenciado de tiroides.

2.a) Imágenes

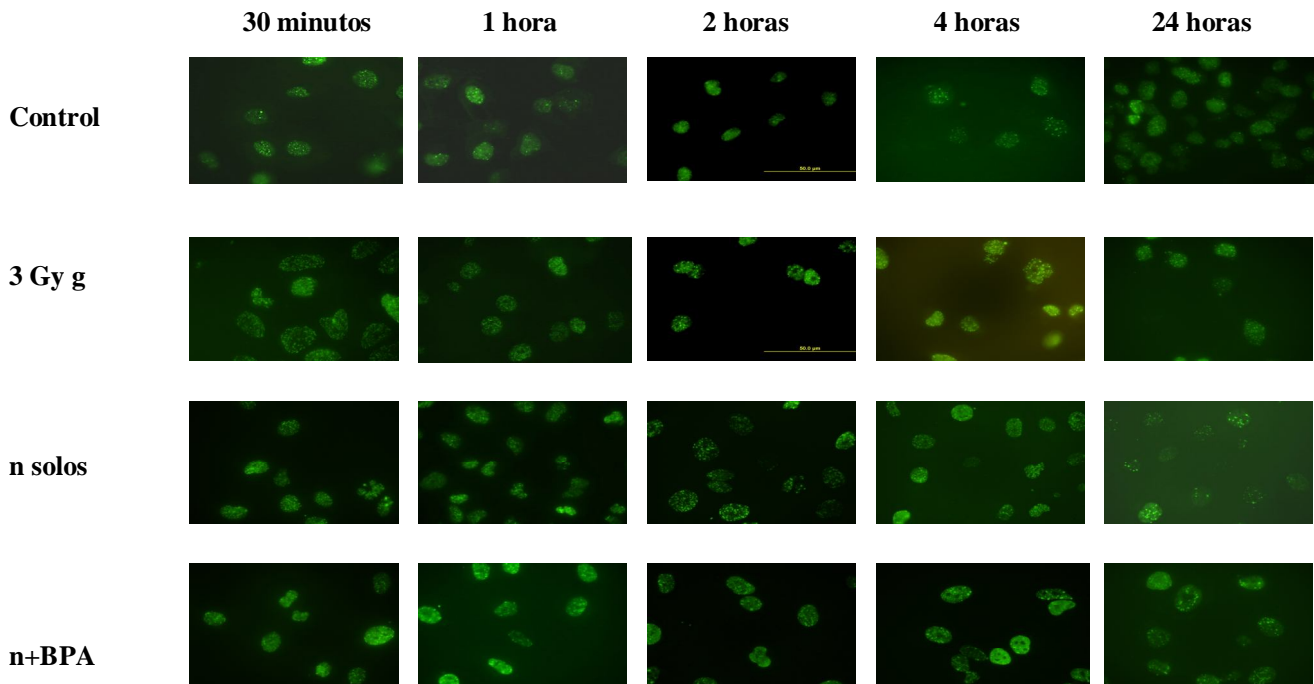


Figura 4.: imágenes representativas de los focos nucleares de γ H2AX en células WRO expuestas a 3Gy de radiación gamma, neutrones y neutrones+BPA a 30 minutos, 1, 2, 4 y 24 horas luego de la irradiación. Así como de sus controles no irradiados.

2.b) Distribución de frecuencia de focos por tratamiento y por tiempos.

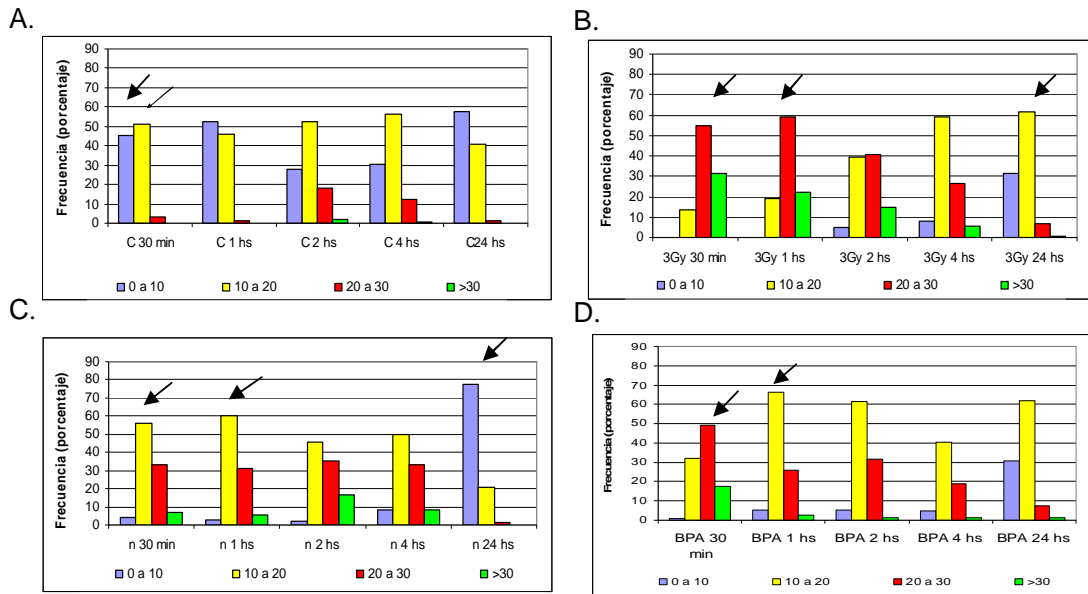


Figura 5.: Gráficos de distribución de frecuencias de los focos de daño, expresados como porcentajes del total de focos por tratamiento a lo largo del tiempo. A) Control, B) Gamma, C) NCT (haz de neutrones sin BPA,) D) BNCT (Neutrones con BPA).

