

Tumor control induced by Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) as a function of dose in an experimental model of liver metastases at 5 weeks follow-up

E.C.C. Pozzi¹, V.A. Trivillin¹, L.L. Colombo², A. Monti Hughes¹, S. Thorp¹, J.E. Cardoso², M.A. Garabalino¹, A.J. Molinari¹, E.M. Heber¹, Paula Curotto¹, M. Miller¹, M.E. Itoiz^{1,3}, R.F. Aromando^{1,3}, D.W. Nigg⁴, A.E. Schwint¹

¹National Atomic Energy Commission (CNEA), Argentina; ²Oncology Institute Angel H. Roffo, Argentina; ³Dept. Oral Pathology, Faculty of Dentistry, University of Buenos Aires, Argentina, ⁴Idaho National Laboratory, USA

Abstract

Introduction

BNCT has been proposed for the treatment of multifocal, non-resectable, bilobar colorectal liver metastases that do not respond to chemotherapy. We recently reported that BNCT mediated by boronophenylalanine (BPA) induced significant remission of experimental colorectal tumor nodules in rat liver at 3 weeks follow-up with no contributory liver toxicity (Pozzi et al., 2012). The aim of the present study was to evaluate tumor control and potential liver toxicity of BPA-BNCT at 5 weeks follow-up. Prescribed dose was retrospectively evaluated based on blood boron values, allowing for assessment of response over a range of delivered dose values.

Materials and Methods

BDIX rats were inoculated into the liver with syngeneic colon cancer cells, DHD/K12/TRb, to induce the development of subcapsular tumor nodules that simulate liver metastases, which are more amenable to follow-up. Two weeks post-inoculation the animals were used for *in vivo* BNCT studies at the RA-3 thermal neutron facility. Dose prescription was based on previously reported biodistribution studies and dose-related radiotoxicity at 3 weeks follow-up. The tumor-bearing animals were divided into 3 groups, i.e. **BPA-BNCT (n=19)**: BNCT mediated by BPA (46.5 mg ¹⁰B/kg ip); **Beam only (n=8)**: exposure to the same thermal neutron fluence as the **BPA-BNCT** group and **Sham (n=7)**: exposed to matched manipulation, but not irradiated. Prior to irradiation, a laparotomy was performed to measure the tumor nodule surface area. Two copper wires were inserted in the liver, alongside the tumor nodule, to assess the flux at the tumor site. Blood samples were taken prior to irradiation for later boron measurement by ICP-OES or ICP-MS and retrospective dose assessment. Five weeks after irradiation the animals were killed humanely for tumor assessment and histological analysis of tumor and normal liver. Tumor nodules were dissected and weighed prior to processing for histological analysis. An additional set of tumor-bearing animals were killed humanely 2 weeks after the inoculation of cells to determine the mean tumor nodule weight before irradiation. Clinical signs and body weight were monitored regularly. Statistical analysis was performed by ANOVA.

Results

The total physical dose administered with BPA-BNCT ranged from 4.5 Gy to 16.3 Gy to tumor and 4.2 to 11 Gy to normal liver. For the sake of analysis, data for the **BPA-BNCT** group were pooled for separately for **BPA-BNCT I**: total absorbed doses to tumor of 4.5 to 8.9 Gy (tumor boron dose between 0.7 and 4.5 Gy) and **BPA-BNCT II**: total absorbed doses to tumor of 9.2 to 16.3 Gy (tumor boron dose between 5.6 and 11.8 Gy). At 5 weeks post-irradiation, the tumor surface area post-treatment/pre-treatment ratio was 4.4 ± 5.6 for **BPA-BNCT I (n=10)**, 0.4 ± 0.2 for **BPA-BNCT II (n=9)**, $7.8 \pm$

4.1 for **Beam only (n=8)** and 12.2 ± 6.6 for the **Sham group (n=7)**. The tumor nodule weight pre-treatment was 34 ± 17 mg (n=10). Five weeks post-irradiation tumor nodule weight fell significantly ($p=0.0003$) to 7.3 ± 5.9 mg for **BPA-BNCT II**, but rose (albeit not significantly) to 385 ± 717 mg for **BPA-BNCT I**, rose significantly ($p=0.0002$) to 960 ± 615 mg for the **Beam only** group and rose significantly ($p=0.0002$) to 751 ± 480 mg for the **Sham group**. For both end-points, the differences between the **BPA-BNCT II** group and each of the other groups were statistically significant ($p \leq 0.0003$). No statistically significant differences were found between the **Beam only** and **Sham** groups. No contributory liver toxicity was observed. The tumor weight ratio for **BPA-BNCT II/Sham** was 1% at 5 weeks (this study), falling from 6% at 3 weeks follow-up as previously reported for a similar dose range.

Conclusion

BPA-BNCT induces consistent, significant partial remission of experimental implanted colorectal tumor nodules in the liver 5 weeks post-irradiation at total absorbed tumor doses above 9.2 Gy.

Control tumoral en función de la dosis de BNCT en un modelo experimental de metástasis hepática luego de 5 semanas de seguimiento

Pozzi ECC^{a,b}, Trivillin VA^a, Colombo LL^{c,d}, Monti Hughes A^a, Thorp S^e, Cardoso JE^c, Garabalino MA^a, Molinari AJ^a, Heber EM^a, Curotto P^b, Miller M^e, Itoiz ME^f, Aromando RF^f, Nigg DW^g, Schwint AE^a

^a Dpto. de Radiobiología, Gerencia de Química Nuclear y Ciencias de la Salud, GAATEN, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

^b Gerencia de Reactores de Investigación y Producción, GAATEN, CNEA.

^c Instituto de Oncología Angel H Roffo.

^d Universidad Abierta Interamericana.

^e Subgerencia Instrumentación y Control, Gerencia de Área de Energía Nuclear, CNEA.

^f Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires (UBA).

^g Idaho National Laboratory, Idaho Falls, Idaho, EE.UU.

Contacto: epozzi@cnea.gov.ar y/o schwint@cnea.gov.ar

Introducción: Se propuso BNCT como alternativa terapéutica para casos intratables de metástasis hepáticas de cáncer de colon. En un modelo experimental de metástasis hepática en ratas, recientemente demostramos que BNCT mediado por borofenilalanina (BPA-BNCT) con 13 Gy de dosis prescrita a tumor, es terapéuticamente útil luego de 3 semanas de seguimiento. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta en función de la dosis a 5 semanas de seguimiento, sobre la base de un estudio retrospectivo de dosis para cada animal.

Materiales y métodos: Las ratas portadoras de nódulos tumorales hepáticos fueron utilizadas para estudios de BNCT *in vivo* en el RA-3, La prescripción de dosis se basó en estudios de biodistribución previos y la radiotolerancia observada anteriormente a 3 semanas de seguimiento. Los animales fueron divididos en tres grupos experimentales, BPA-BNCT (n=19), Solo Haz (n=8) y Sham (n=7) (misma manipulación, sin tratamiento). Para la valoración retrospectiva de la dosis individual de cada rata, se midió el flujo neutrónico en la zona próxima al tumor para cada animal y el contenido de boro en una muestra de sangre tomada pre-irradiación. Luego de monitorear los signos clínicos de los animales durante 5 semanas post-irradiación, fueron eutanasiados para evaluar la respuesta de tumor e hígado normal a nivel macroscópico e histológico.

Resultados: Para el análisis estadístico (ANOVA), los datos individuales para el grupo BPA-BNCT fueron combinados de acuerdo a la dosis total absorbida en tumor, BPA-BNCT I: 4,5 a 8,9 Gy y BPA-BNCT II: 9,2 a 16,3 Gy. Cinco semanas post-irradiación la relación de superficie tumoral post-tratamiento/pre-tratamiento fue $12,2 \pm 6,6$ para el Sham, $7,8 \pm 4,1$ para el Solo haz, $4,4 \pm 5,6$ para BPA-BNCT I, y $0,4 \pm 0,2$ para BPA-BNCT II. La masa del nódulo tumoral pre-tratamiento fue 34 ± 17 mg. Cinco semanas post-irradiación esta masa creció significativamente a 751 ± 480 mg para el grupo Sham, y a 960 ± 615 mg para el grupo Solo haz ($p=0,0002$), y creció (aunque no significativamente) a 385 ± 717 mg para el grupo BPA-BNCT I; mientras que cayó significativamente ($p=0,0003$) a $7,3 \pm 5,9$ mg en el grupo BPA-BNCT II. Las diferencias entre el grupo BPA-BNCT II y los grupos Sham y Solo haz fueron altamente significativas ($p \leq 0,001$). No se observaron cambios clínicos, macroscópicos o histológicos en hígado en ninguno de los grupos evaluados.

Conclusión: BPA-BNCT induce una remisión parcial consistente y significativa de nódulos tumorales hepáticos experimentales 5 semanas post-irradiación a dosis absorbidas totales en tumor por encima de 9 Gy (dosis componente boro = 5,6 Gy).

Introducción

Las metástasis hepáticas (MH) son la primera causa de tumores malignos en el hígado y constituyen la segunda localización secundaria más frecuente de las enfermedades neoplásicas malignas, sólo precedida de la localización linfonodal (Martínez et al. 2008). En particular, 50% de los pacientes con cáncer colorectal (CCR) desarrollan metástasis en el hígado y son responsables de dos tercios de las muertes debidas a esta enfermedad. El único tratamiento estándar potencialmente curativo de pacientes de metástasis hepática colorectal (MHCR) es la resección quirúrgica de las metástasis o su combinación con el tratamiento ablativo localizado (radiofrecuencia, crio-terapia) (Van den Eynde and Hendlitz 2009)

La tasa de supervivencia seguida de resección oscila entre el 25% a 58% comparada con el 0% a 5% de pacientes que no se operan. Desafortunadamente, solo entre el 10 y el 20% de los pacientes con MHCR reúnen inicialmente los requisitos necesarios para someterse a dicho procedimiento (Adam et al. 2011). El tamaño, localización y número de las metástasis, su presencia en ambos lóbulos y la presencia de enfermedad extrahepática son factores de mal pronóstico condicionando las alternativas de tratamiento (Figueras et al. 2001). A su vez, la recurrencia local después de la cirugía debido a la enfermedad residual microscópica ocurre en la mayoría de los pacientes (Ruan and Warren 2005).

En los últimos 5 años, la combinación de algunas drogas quimioterapéuticas ha logrado inducir una respuesta tumoral u, ocasionalmente ha servido como neoadyuvante haciendo resecables casos de MHCR que no lo eran, aunque todavía se necesitan ensayos controlados al respecto (Van den Eynde and Hendlitz 2009, Adam et al. 2011).

En cuanto a la terapia radiante, la radiosensibilidad del hígado, pone en peligro el tratamiento eficaz de las metástasis hepáticas sin exceder la radiotolerancia del hígado normal. (Jirtle et al. 1984). El hígado tolera poco los amplios volúmenes de tratamiento implicados en radioterapia convencional utilizando fotones o electrones (Suzuki et al. 2000). Avances más recientes en radioterapia externa utilizando fotones, incluyendo radioterapia 3D conformal o radioterapia de intensidad modulada (RTIM), han contribuido a circunscribir parcialmente estos defectos (Suzuki et al. 2007; Kim et al. 2005; Thomas et al. 2005).

Las terapias dirigidas capaces de destruir las células tumorales selectivamente preservando el tejido normal, podrían mejorar la eficacia y reducir la toxicidad. En este contexto, se ha propuesto la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) como potencial tratamiento de casos de metástasis hepáticas derivadas de CCR, múltiples, bilobares, irresecables, y resistentes a quimioterapia. (Zonta et al. 2006, Suzuki et al. 2007 Altieri et al. 2004; Wittig et al. 2008; Cardoso et al. 2009).

La técnica de BNCT aplica la tecnología nuclear al área biomédica. BNCT es una modalidad de tratamiento binario que combina la administración de compuestos borados enriquecidos en el isótopo B-10 y la irradiación externa con neutrones. El isótopo estable del boro, ^{10}B , interactúa con neutrones de baja energía (neutrones térmicos de $<0,4$ eV) desencadenando una reacción de captura que da lugar a la formación de partículas (alfa (^4He) y un núcleo de ^7Li) de alta transferencia lineal de energía (LET), rango corto (5 a 10 micrómetros) y alta eficacia biológica relativa (RBE) (Coderre y Morris, 1999). La estrategia consiste en administrar compuestos borados que sean incorporados selectivamente a las células tumorales, tal que el contenido de boro en las células normales y en la sangre sea menor que en el tumor. De esta manera, la reacción de captura que ocurre entre los neutrones térmicos y el átomo de ^{10}B se producirá mayormente en las células tumorales, y permitiría así dañar los tejidos tumorales sin producir daño significativo al tejido normal. Más aún, siendo una técnica basada en un direccionamiento biológico y no geométrico (radioterapia convencional), permitiría dañar selectivamente las células tumorales infiltrantes en el tejido sano en

general, y las micrometástasis en particular, un desafío en las terapias oncológicas actuales (Cardoso et al. 2007).

Desde el punto de vista de la investigación, estudios en un modelo experimental de metástasis hepática pueden contribuir al entendimiento de la radiobiología de la aplicación de BNCT a esta patología y a respaldar y mejorar el diseño de protocolos clínicos terapéuticamente útiles y más seguros. En principio, nuestro grupo evaluó algunos aspectos sobre la potencial toxicidad de la aplicación de BNCT en hígado sano de rata (Cardoso et al. 2007). Luego, llevamos adelante estudios de biodistribución en un modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX, con 11 protocolos de administración utilizando los compuestos borados borofenilalanina (BPA) y decahidrodecaborato (GB-10), lo que permitió evaluar el contenido de boro en sangre, tumor y una amplia variedad de tejidos sanos potencialmente limitantes de dosis (Garabalino et al. 2011). Basados en este estudio de biodistribución, seleccionamos uno de los protocolos potencialmente útiles (BPA en una dosis de 46,5 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$, por vía intraperitoneal+intravenosa) y evaluamos el control tumoral y la potencial radiotoxicidad a 3 semanas de seguimiento. Habiendo demostrado la remisión parcial en el 100% de los nódulos tumorales evaluados 3 semanas post tratamiento, prescribiendo 13 Gy de dosis absorbida total en tumor, los objetivos de este trabajo fueron: extender el tiempo de seguimiento a 5 semanas post tratamiento y evaluar el efecto considerando potenciales variaciones en las dosis administradas en torno a un intervalo de prescripción. Teniendo en cuenta potenciales diferencias entre la dosis prescrita y la dosis realmente administrada, realizamos una evaluación retrospectiva de la dosis absorbida en cada animal tratado con BPA-BNCT. De esta manera fue posible estudiar individualmente para cada rata el efecto en función de la dosis efectivamente administrada. A partir de los resultados observados según este procedimiento, intentamos establecer un posible umbral de dosis para el control tumoral.

Materiales y Métodos

En este estudio se utilizaron un total de 44 ratas machos o hembras BDIX adultas de entre 170 - 250g de peso corporal (Charles River Lab., MA, USA). Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales en una habitación con ciclos de luz-oscuridad de 12hs. A cada uno de los animales se le practicó una laparotomía bajo anestesia (ketamina (36,5 mg/kg p.c.) + xylazina (5,4 mg/kg p.c.)) y se expuso el lóbulo lateral derecho del hígado (LLD). Luego, se inocularon 10 μl de medio de cultivo F10-DMEM (GIBCO) con aproximadamente 5×10^5 células singeneicas de cáncer de colon DH/DK12/TRb (ECACC, UK). Cada inóculo se realizó en forma subcapsular usando una jeringa Hamilton 22G.

El modelo experimental de metástasis fue adaptado del método utilizado por Roveda et al. (2004) y Caruso et al. (1993). Se realizaron inoculaciones subcapsulares para inducir el desarrollo de nódulos tumorales que simulan metástasis hepáticas pero que permiten un seguimiento más reproducible posterior al tratamiento (De Jong et al. 2009). Dos semanas luego de la inoculación, el 100% de los animales desarrolló nódulos tumorales medibles y vascularizados, sin diseminación intraperitoneal ni pulmonar como se describió anteriormente (Pozzi et al., 2012).

Los animales portadores de tumor en el hígado fueron utilizados para estudios de BNCT *in vivo* usando como fuente de irradiación la facilidad de columna térmica del reactor nuclear RA-3 (Miller et al., 2009).

Un blindaje de carbonato de litio (96 % enriquecido en Li-6), fabricado *ad hoc*, fue utilizado para proteger el cuerpo de cada animal del flujo de neutrones térmicos, a la vez que se exponía el área a la altura del hígado a través de una apertura colimada (Pozzi et al. 2012).

Dado el alto contenido de boro en los riñones al momento de la irradiación (Garabalino et al. 2011), se utilizaron un par de paletas de acrílico para desplazar artificialmente los riñones, distanciándolos de la ventana de exposición durante la irradiación (Pozzi et al. 2012).

Los cálculos dosimétricos se basaron en datos reportados previamente para la facilidad del RA-3 (Pozzi et al., 2009, 2012) y en los datos de biodistribución reportados en forma separada para este modelo (Garabalino et al., 2011).

En esta facilidad, el campo neutrónico se encuentra muy bien termalizado, siendo despreciable la contribución a la dosis de radiación de protones de retrodispersión en hidrógeno (dosis debida a interacción con neutrones rápidos) (Coderre and Morris 1999). Las dosis reportadas incluyen tres componentes: la dosis debida a protones producto de la reacción de captura en nitrógeno (Coderre and Morris 1999); una componente de dosis gamma, medida en forma separada para el mismo sistema de irradiación con una cámara de ionización de grafito (Far West Technology 0,1 cm³ de volumen de aire); y la contribución de la dosis boro, expresada en Gy / ppm ¹⁰B. Para obtener la dosis boro, esta última componente debe ser multiplicada por la concentración de boro correspondiente, expresada en ppm.

Durante cada irradiación, se realizaron mediciones en una posición monitora usando detectores de neutrones auto-energizados (SPND (Miller et. al. 2004)), para evaluar potenciales variaciones en el flujo neutrónico y estimar los tiempos de irradiación necesarios para llegar a las dosis prescritas.

Los animales se dividieron en 3 grupos experimentales. Un grupo **BPA-BNCT** (n=19), a los cuales se les administró una dosis de 46,5 mg ¹⁰B/kg en forma intraperitoneal del compuesto BPA (L-enantiomer, >98% enriquecido en ¹⁰B) preparado según se describió anteriormente como una solución acuosa 0,42 M de BPA-fructosa (Garabalino et al. 2011). El protocolo de administración fue seleccionado en base a los datos de biodistribución reportados anteriormente. Este protocolo cumple con los lineamientos establecidos de potencial valor terapéutico (sin toxicidad, concentración de boro absoluta en tumor >20 ppm, relación de concentración tumor/hígado normal ≥ 1) (Garabalino et al. 2011). Tres horas post-administración del compuesto borado, los animales fueron expuestos a la irradiación con neutrones.

Un grupo **Sólo Haz** (n=8), fue expuesto a la misma fluencia de neutrones que el grupo BPA-BNCT sin administrar el compuesto borado. En el caso del grupo **Sham** (n=7), los animales fueron sometidos a la misma manipulación (inoculación de células y laparotomía 2 semanas post-inoculación) pero sin tratamiento.

Al no disponer de una técnica no invasiva de seguimiento del crecimiento tumoral en el hígado de la rata, previamente a la irradiación los animales fueron sometidos a una laparotomía para medir el área superficial pre-tratamiento del nódulo tumoral. En todos los animales, dos alambres de cobre de 0,25 mm de diámetro y aproximadamente 7 mm de largo, fueron insertados en el hígado, a los lados del nódulo tumoral; para evaluar la relación de flujo neutrónico térmico existente entre la posición del tumor y la posición de monitoreo externo con el SPND.

Adicionalmente, en el grupo BPA, se lavó la cavidad peritoneal con solución salina tibia para remover el BPA residual en el líquido intraperitoneal, que pudiera ocasionar reacciones neutrónicas de captura con el boro y contribuir a la radiotoxicidad intestinal. Luego, previamente a la irradiación, se tomaron muestras de sangre para realizar mediciones posteriores del contenido de boro. Los animales fueron suturados de manera simple y después de la irradiación el abdomen fue abierto nuevamente para retirar los alambres y luego fue re-suturado.

Los alambres fueron medidos por espectrometría gamma para obtener el flujo térmico en el área del tumor. Las muestras de sangre fueron procesadas como se describió previamente (Garabalino et al., 2011; Heber et al. 2012) para la evaluación del

contenido de boro por ICP-OES (Optima 3100 XL, UV, axial, Perkin Elmer) o ICP-MS (ELAN DRC2, Perkin Elmer).

En el grupo BPA, la fluencia de neutrones térmicos fue prescrita para entregar una dosis absorbida en el rango de 6 Gy a 15 Gy. La estimación de la componente de dosis boro se basó en el supuesto que la concentración de boro en el tumor era 39 ± 10 ppm, como se reportó anteriormente (Tabla 1). La dosis absorbida en tumor, realmente entregada para cada animal, fue determinada retrospectivamente en base a la determinación del flujo térmico en el área del tumor y la concentración de boro inferida a partir de la concentración de boro respectiva, medida en sangre al momento de la irradiación. La relación de concentración tumor/sangre utilizada para la estimación de la concentración de boro en tumor a partir de la medición de sangre fue $1,9 \pm 0,4$, tomada de los datos previos reportados para el protocolo de administración empleado en este trabajo (Tabla 1).

Asumiendo que el hígado normal que rodea al tumor fue expuesto al mismo flujo neutrónico que el tumor, y utilizando la relación de la concentración de boro en hígado normal/sangre de $0,8 \pm 0,2$ (Tabla 1) para estimar la concentración de boro en hígado normal a partir de la concentración medida en sangre, se estimó la dosis en hígado normal retrospectivamente para cada uno de los animales.

El flujo térmico promedio en el lóbulo del hígado inoculado, obtenido de la activación de los alambres de cobre insertados a los lados del tumor, fue $(2,3 \pm 0,5) \times 10^9$ n cm⁻² seg⁻¹. El rango de los valores individuales de boro en sangre fue de 1,2 a 16,2 ppm. La dosis absorbida total administrada con BPA-BNCT fue de $(4,5 \pm 0,3)$ Gy a (16 ± 4) Gy en tumor y de $(4,2 \pm 0,4)$ Gy a (11 ± 2) Gy en hígado normal. La dosis correspondiente a la componente boro fue de $(0,7 \pm 0,2)$ Gy a (12 ± 4) Gy en tumor, y de $(0,5 \pm 0,2)$ Gy a (7 ± 2) Gy en hígado normal. En todos los casos, la dosis del grupo Solo Haz ($3,6 \pm 0,3$ Gy), correspondió a una exposición a la misma fluencia prescrita al grupo BPA-BNCT.

Los animales se siguieron por 5 semanas post-tratamiento. Durante este tiempo, se monitorearon regularmente los signos clínicos y el peso corporal. Al término del experimento, se hizo una laparotomía bajo anestesia y se midió nuevamente el área del nódulo tumoral. Luego se realizó la eutanasia de los animales. Los nódulos tumorales fueron disecados y pesados. Los nódulos tumorales fueron disecados y pesados. Las muestras remanentes de los nódulos tumorales (cuando la masa fue suficiente para muestrear) y de hígado normal, fueron tomadas y fijadas en formol-buffer 10% para realizar el análisis histológico de la respuesta tumoral y la toxicidad en hígado, respectivamente. Un grupo adicional de animales portadores de tumor (n=10) fueron sacrificados 2 semanas post-inoculación para determinar la masa tumoral promedio antes del tratamiento.

Los parámetros de evaluación de la respuesta tumoral fueron, el cociente de la superficie externa del nódulo tumoral subcapsular post-/pre-tratamiento y la masa del nódulo tumoral disecado. El cociente entre la superficie post-/pre-tratamiento presenta la ventaja de ser un parámetro determinado para cada animal evaluado, es decir, que permite estimar la respuesta individual de cada animal. Sin embargo, es un indicador indirecto de la masa/volumen tumoral.

Por el contrario, la masa del nódulo tumoral post-tratamiento es un estimador directo de la masa/volumen, pero solo puede ser comparado con un valor promedio de la masa tumoral pre-tratamiento; ya que naturalmente no se puede disponer del valor real de masa tumoral pre-tratamiento de cada animal. Así, ambos indicadores contribuyen de forma complementaria a evaluar la respuesta tumoral.

El análisis histológico de los tumores remanentes 5 semanas post-tratamiento se realizó para estudiar aspectos complementarios de la respuesta de los tejidos. Se realizó una evaluación complementaria semi-cuantitativa, considerando algunas características observadas como la presencia o ausencia de signos de viabilidad y características

similares a los tumores pre-tratados (presencia de mitosis, células en grupos compactos en formaciones glandulares, núcleos leptocrómicos), presencia o ausencia de signos de daño por radiación (núcleos bizarros y picnóticos, aumento de fibrosis/necrosis) y el porcentaje de área ocupada por células tumorales viables *versus* el área de fibrosis/necrosis. A partir de este análisis histológico se definió una escala semi-cuantitativa de nivel de respuesta individual: **bajo-intermedio-alto**, considerando como referencia de nivel “**sin respuesta**”, el conjunto de características observadas en el grupo control con el que se evaluó el promedio de masa tumoral pre-tratamiento. Al momento de presentar los resultados en este congreso, el análisis histológico no fue finalizado y solo se informan los avances obtenidos hasta el momento.

La radiotoxicidad fue evaluada en términos de signos clínicos generales, cambios en el peso corporal, cicatrización de la piel irradiada y alteraciones macroscópicas/histológicas en el hígado normal.

El análisis estadístico fue realizado por Análisis de Varianza (ANOVA). La significancia estadística fue considerada a $p=0,05$,

Resultados

La relación entre la superficie externa post-/pre-tratamiento (Sup. Post/ Pre) y la masa de los nódulos tumorales a las 5 semanas posteriores al tratamiento con **BPA-BNCT** para cada uno de los animales se muestran en la Tabla 2, La dosis absorbida total y la componente de dosis boro entregada en hígado normal y en tumor, estimada retrospectivamente como se describió previamente, se muestra para cada caso. Las Figuras 1 y 2 muestran la respuesta tumoral individual para ambos parámetros evaluados en función de la dosis total absorbida, comparados con los valores promedio \pm DS obtenidos de las mediciones realizadas en los grupos **Sham** y **Solo Haz**.

Teniendo en cuenta como indicador de respuesta la masa tumoral, si se considera el Intervalo de Confianza (IC) que incluya el 95% de los valores obtenidos, para el grupo **Sham** [307 – 1195] mg y para el grupo **Solo Haz** [446 – 1474] mg, las ratas 66 y 50 no responderían porque los valores correspondientes de masa del nódulo tumoral en estos dos casos cae dentro del IC del 95% para ambos grupos control. Análogamente, considerando como parámetro de respuesta la superficie tumoral Post/Pre y un IC del 95% para los valores del grupo **Sham** [6,1 – 18,3] y para el grupo **Solo Haz** [4,4 – 11,2], se podría considerar que las ratas 66 y 50 no respondieron. Siguiendo este criterio de evaluación el resto de los animales habrían respondido al tratamiento, y la menor dosis que induce un control tumoral considerando ambos indicadores de respuesta sería 6,1 Gy (Rata 4). Este análisis sugiere un potencial umbral de dosis para algún grado de respuesta a $\geq 6,1$ Gy de dosis absorbida total y a $\geq 1,8$ Gy de dosis boro.

A los fines del análisis estadístico de los datos y considerando la elevada incerteza en la determinación de la dosis boro, se estableció arbitrariamente un factor de cobertura $k = 3$ veces el umbral de dosis boro definido anteriormente ($1,8 \times 3 = 5,4$ Gy), para reagrupar los animales tratados con **BPA-BNCT**. El sub-grupo **BPA-BNCT I**: dosis boro en tumor $\leq 5,4$ Gy (en este trabajo animales tratados con dosis total absorbida entre 5,5 y 8,9 Gy ($n = 10$)), y sub-grupo **BPA-BNCT II**: dosis boro $\geq 5,4$ Gy (en este trabajo animales tratados con dosis total absorbida entre 9,2 y 16 Gy ($n = 9$)).

En la Tabla 3 se muestran los datos agrupados para **BPA-BNCT I**, **BPA-BNCT II**, **Solo Haz** y **Sham**. Para el grupo **Sham**, 5 semanas post-tratamiento la relación de superficie Post/Pre fue $12,2 \pm 6,6$, Este valor indica que sin tratamiento, la superficie tumoral se incrementa en promedio 12 veces sobre un periodo de 5 semanas. En el caso del grupo **Solo Haz** la relación de superficie Post/Pre fue $7,8 \pm 4,1$, La diferencia entre los grupos **Sham** y **Solo Haz** no fue estadísticamente significativa. En el caso del

subgrupo BPA-BNCT I, la superficie Post/Pre fue $4,4 \pm 5,6$, Este valor fue significativamente menor que el valor correspondiente al grupo **Sham** ($p < 0,02$), pero no hubo diferencia significativa con el grupo **Solo Haz**. Para el subgrupo BPA-BNCT II el valor de superficie Post/Pre fue $0,45 \pm 0,20$, significativamente menor que para el grupo Sham ($p = 0,000$), el grupo Solo Haz ($P = 0,001$) y el grupo BPA-BNCT I ($p < 0,05$).

La masa tumoral pre-tratamiento fue 34 ± 17 mg. A las 5 semanas post-tratamiento, la masa tumoral crece significativamente ($p = 0,0002$) a 750 ± 480 mg en el grupo **Sham** y 960 ± 620 en el grupo **Solo Haz**; crece (pero no significativamente) a 390 ± 720 mg para el subgrupo **BPA-BNCT I** y cae significativamente ($p = 0,0003$) a $7,3 \pm 5,9$ mg para el subgrupo **BPA-BNCT II**. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos **Sham** y **Solo Haz**, ni entre el grupo **BPA-BNCT I** y los grupos Sham o Solo Haz. Por el contrario, se observaron diferencias altamente significativas entre el grupo BPA-BNCT II y los grupos Sham y Solo Haz ($p = 0,000$).

Aunque las medias correspondientes a los subgrupos **BPA-BNCT I** y **BPA-BNCT II** difieren ampliamente (385 ± 717 vs $7,3 \pm 5,9$ respectivamente), la diferencia no alcanza significancia estadística, principalmente debido a la gran dispersión de los valores en cada grupo, producto del reagrupamiento de animales que recibieron dosis muy dispares.

Pese a estas amplias variaciones, es importante destacar que el subgrupo de tratamiento **BPA-BNCT II** alcanza un 99% de reducción ($1 - [7,3/750]$) del peso tumoral comparado con el valor promedio que alcanzaron los tumores sin tratamiento (grupo **Sham**), mientras que el subgrupo **BPA-BNCT II** alcanza un 48% de reducción ($1 - [390/750]$).

La Tabla 4 muestra el porcentaje de de animales cuyos tumores exhibieron una remisión parcial en términos de algún grado de reducción del área tumoral pre-tratamiento (RP; sup Post/Pre < 1) y el porcentaje de animales cuyos tumores exhibieron una reducción a menos del 50% de la superficie tumoral pre-tratamiento (RP_{0,5}; Post/Pre < 0,5) para los diferentes grupos 5 semanas post-tratamiento. La remisión parcial fue de 0% para los grupos Sham y Solo Haz para ambos parámetros, mientras que el **BPA-BNCT II** indujo una RP en el 100% y RP_{0,5} en el 56% de los casos.

A nivel histológico, hasta el momento se estudió el 50 % de los tumores remanentes 5 semanas post-tratamiento. Según la escala semi-cuantitativa definida en este trabajo, los casos analizados del grupo BPA-BNCT I presentaron un nivel de respuesta bajo o intermedio, mientras que el grupo BPA-BNCT II presentó un nivel intermedio o alto. Todos los casos observados de material correspondiente a los grupos Solo Haz y Sham, presentaron características similares a las de los preparados obtenidos del grupo pre-tratamiento y fueron considerados sin respuesta. En cuatro casos, todos correspondientes al grupo BPA-BNCT II (dosis absorbida total mayor a 9 Gy), el material obtenido fue insuficiente (masa tumoral disecada mínima), para poder realizar una fijación y tinción correcta para poder ser analizado. A los fines de la semi-cuantificación, estos 4 casos fueron considerados como de nivel alto de repuesta al tratamiento.

No se observaron cambios a nivel clínico, ni macroscópicos o a nivel histológico en hígado en ninguno de los grupos evaluados. Varios casos de ausencia de recuperación capilar y problemas de cicatrización e infección de las heridas post-quirúrgicas, fueron observados en la piel de la zona expuesta de los animales del subgrupo **BPA-BNCT II**.

Discusión

En un trabajo anterior pudimos demostrar a nivel experimental *in vivo*, que mediante la aplicación de BPA-BNCT, 3 semanas post tratamiento, se puede inducir la remisión parcial en el 100% de los nódulos tumorales tratados (Pozzi et al. 2012). En este trabajo, evaluamos la respuesta 5 semanas post-tratamiento con BPA-BNCT en el mismo modelo experimental en rata, en un rango de dosis determinado a partir de una evaluación dosimétrica retrospectiva individual para cada animal tratado. En la Tabla 5 se puede ver una comparación entre ambos estudios. Considerando el subgrupo de mayor dosis evaluado en este trabajo, se observa que 5 semanas post tratamiento se mantiene el control tumoral, mientras que en los controles (grupos Solo Haz y Sham), los tumores crecen significativamente ($p < 0,05$).

Nuestra hipótesis de trabajo fue que las diferencias entre la dosis absorbida prescrita y la realmente suministrada se deberían principalmente a la conocida dispersión en los valores de concentración de boro (por ej. Garabalino et al., 2011), a las variaciones en el flujo neutrónico que recibe el tumor (principalmente como resultado de diferencias de posicionamiento de los animales dentro del dispositivo de irradiación), y la deficiente reproducibilidad en la administración intraperitoneal de compuestos (Gaines Das and North, 2007). Este tipo de variaciones también se observa en la experiencia clínica cuando se suministran compuestos para terapia radiante con radionucleídos, siendo fundamental realizar una dosimetría individual del paciente (por ej. Wessels et al., 2006, Wierts et al. 2011). El procedimiento de reevaluar la dosis en forma retrospectiva incluido en este trabajo, nos permitió ampliar nuestro estudio e intentar establecer un posible umbral de dosis para el control tumoral.

A partir de los datos obtenidos para los grupos control Sham y Solo Haz, se determinó un intervalo de confianza del 95% (IC95%) de no respuesta al tratamiento. Comparando la respuesta tumoral individual de los animales tratados con BPA-BNCT, con el IC95%, se determinó el número de animales respondedores y no respondedores. Según este criterio de mínima respuesta, solo dos animales no responden al tratamiento, y el primer respondedor (Tabla 2, R4) fue tratado con una dosis absorbida total de 6.1 ± 0.6 Gy, correspondiente con una componente de dosis boro de 1.8 ± 0.5 Gy. Considerando las limitaciones del método, principalmente la elevada incerteza en la distribución del componente borado (Garabalino et al., 2011), se estableció un límite de dosis 3 veces superior (Dosis Boro = 5.4 Gy), para agrupar los individuos y comparar su respuesta. Del análisis realizado, se observa una diferencia significativa en la respuesta del grupo tratado con dosis absorbidas totales mayores que 9 Gy (Tabla 2, R77). Es más, según este criterio, 5 semanas post-tratamiento con BPA-BNCT 100% los animales respondedores presentaron una remisión parcial, y más del 55% una remisión parcial 0.5 (Tabla 4). A su vez, no se observaron cambios agudos en hígado en ninguno de los casos tratados (dosis total absorbida máxima 11 ± 2 Gy, dosis componente boro 7 ± 2 Gy) al tiempo de evaluación. Sin embargo, la toxicidad hepática tardía no puede ser descartada y debe ser monitoreada cuidadosamente.

Conclusión

El tratamiento con BPA-BNCT induce una remisión parcial de nódulos colorectales experimentales en hígado de ratas BDIX 5 semanas post-tratamiento, manteniendo la tendencia de respuesta observada en trabajos anteriores a menor tiempo de seguimiento. Los valores de control tumoral al tiempo evaluado muestran un efecto terapéutico progresivo con el aumento de la dosis. El análisis de los datos agrupados demostraron una respuesta significativa del subgrupo de tratamiento BPA-BNCT II (mayores dosis) comparada con los grupos control (Solo Haz y Sham), mientras que la respuesta tumoral del subgrupo BPA-BNCT I (menores dosis) no alcanzó niveles de significancia estadística. Este resultado sugiere un potencial umbral de dosis total

absorbida en tumor por encima de 9 Gy (dosis boro ≥ 5.6 Gy), para lograr inducir un control tumoral estadísticamente significativo en este modelo experimental, 5 semanas post-tratamiento.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por las contribuciones de un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de un subsidio de la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y por el Department of Energy (DOE, US), a través del Idaho National Laboratory (INL, US). Los autores agradecen la colaboración de expertos de los grupos de Mantenimiento, Operación y Protección Radiológica del Reactor RA-3,

Referencias

- Adam R., Hoti E. y Luis Bredt L.C., 2011. Estrategias oncoquirúrgicas en el cáncer hepático metastásico. *Cir. Esp.*; 89 (1):10–19.
- Altieri S., Braghieri A., Bortolussi S., Bruschi P., Fossati F., Pedroni P., Pinelli T., Zonta A., Ferrari C., Prati U, Roveda L., Barni S., Chiari P., Nano R., 2004. Neutron radiography of human liver metastases after BPA infusion. *Proceedings Eleventh World Congress on Neutron Capture Therapy.*
- Cardoso J.E., Trivillin V.A., Heber E.M., Nigg D.W., Calzetta O., Blaumann H., Longhino J., Itoiz M.E., Bumashny E., Pozzi E., Schwint A.E., 2007. Effect of BNCT on normal liver regeneration: towards a novel therapy for liver metastases. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 699–706.
- Cardoso J., Nievas S., Pereira M., Schwint A., Trivillin V., Pozzi E., Heber E., Monti Hughes A., Sanchez P., Bumashny E., Itoiz M., Liberman S., 2009. Boron biodistribution study in colorectal liver metastases patients in Argentina. *Applied Radiation and Isotopes* 67 S76–S79.
- Caruso M., Panis Y., Gagandeep S., Houssin D., Salzmann J., Klatzmann D., 1993. Regression of established macroscopic liver metastases after *in situ* transduction of suicide gene. *Proc Natl Acad Sci* 90:7024-7028.
- Coderre J.A., Morris G.M., 1999) The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiat Res* 151(1):1-18.
- De Jong G.M., Aarts F., Hendriks T., Boerman O.C., Bleichrodt R.P., 2009. Animal Models for Liver Metastases of Colorectal Cancer: Research Review of Preclinical Studies in Rodents. *Journal of Surgical Research* 154, 167–176.
- Figueras J., Torras J., Valls C., Ramos E., Lama C., Busquets J., Lladó L., Rafecas A., Fabregat J., Serrano T., López S., Martí-Rague J. y Jaurrieta E., 2001. Resección de metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal. Índice de reseccabilidad y supervivencia a largo plazo. *Cir. Esp.* vol 70:27-33.
- Gaines Das R. and North D., 2007. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures *Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals* 41, 312–320.
- Garabalino M.A., Monti Hughes A., Molinari A.J., Heber E.M., Pozzi E.C.C., Cardoso J.E., Colombo L.L., Nievas S., Nigg D.W., Aromando R.F., Itoiz M.E., Trivillin V.A., Schwint A.E., 2010. Boron biodistribution for BNCT in an experimental model of liver metastases. *International Congress on Neutron Capture Therapy 14 (ICNCT-14).* Buenos Aires, Argentina.

- Heber E.M., Kueffer P.J., Lee Jr M.W., Hawthorne M.F., Garabalino M.A., Molinari A.J., Nigg D.W., Bauer W., Monti Hughes A., Pozzi E.C.C., Trivillin V.A., Schwint E.A., 2012. Boron delivery with liposomes for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT): biodistribution studies in an experimental model of oral cancer demonstrating therapeutic potential. *Radiation and Environmental Biophysics*, 51(2):195-204.
- Jirtle RL, Michalopoulos G, Strom SC, Deluca PM, Gould MN (1984) The survival of parenchymal hepatocytes irradiated with low and high LET radiation. *Br J Cancer* 49(6):197-201.
- Kim D.Y., Park W., Lim D.H., Lee J.H., Yoo B.C., Paik S.W., Kho K.C., Kim T.H., Ahn Y.C., Huh S.J., 2005. Three-dimensional conformal radiotherapy for portal vein thrombosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 103:2419-2426.
- Martínez J.C., Jarufe N.C., González R.D. y Álvarez M.Z., 2008. Alternativas terapéuticas actuales de las metástasis hepáticas. *Rev. Méd. Chile*; 136: 376-384.
- Miller M.E., Mariani L.E., Szejnberg Gonçalves-Carralves M.L., Skumanic M., Thorp S.I., 2004. Implantable self-powered detector for on-line determination of neutron flux in patients during NCT treatment. *Applied Radiation and Isotopes* 61 1033–1037.
- Miller M., Quintana J., Ojeda J., Langan S., Thorp S., Pozzi E., Szejnberg M., Estrzyk G., Nosal R., Saire E., Agrazar H., Graiño F., 2009. New irradiation facility for biomedical applications at the RA-3 reactor thermal column. *Appl. Radiat. Isotopes* 67 S226–S229.
- Pozzi E., Nigg D.W., Miller M., Thorp S.I., Heber E.M., Zarza L., Estrzyk G., Monti Hughes A., Molinari A.J., Garabalino M., Itoiz M.E., Aromando R.F., Quintana J., Trivillin V.A., Schwint A.E., 2009. Dosimetry and radiobiology at the new RA-3 reactor boron neutron capture therapy (BNCT) facility: Application to the treatment of experimental oral cancer. *Applied Radiation and Isotopes* 67 S309–S312.
- Pozzi E.C.C., Cardoso J.E., Colombo L.L., Thorp S., Monti Hughes A., Molinari A.J., Garabalino M.A., Heber E.M., Miller M., Itoiz M.E., Aromando R.F., Nigg D.W., Quintana J., Trivillin V.A., Schwint A.E., 2012. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for liver metastasis: therapeutic efficacy in an experimental model. *Radiation and Environmental Biophysics*, DOI 10.1007/s00411-012-0419-8.
- Roveda L., Prati U., Bakeine J., Trotta F., Marotta P., Valsecchi P., Zonta A., Nano R., Facoetti A., Chiari P., Barni S., Pinelli T., Altieri S., Braghieri A., Bruschi P., Fossati F., Pedroni P., 2004. How to study boron biodistribution in liver metastases from colorectal cancer, *J. Chem.* 16, 15–18.
- Suzuki M., Masunaga S., Kinashi Y., Takagaki M., Sakurai Y., Kobayashi T., Ono K., 2000. The Effects of Boron Neutron Capture Therapy on Liver Tumors and Normal Hepatocytes in Mice. *Jpn J Cancer Res*, 91:1058-1064
- Suzuki M., Sakurai Y., Hagiwara S., Masunaga S., Kinashi Y., Nagata K., Maruhashi A., Kudo M., Ono K., 2007. First Attempt of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 37 (5) 376–381.
- Thomas E., Chapet O., Kessler M.L., Lawrence T.S., Ten Haken R.K., 2005. Benefit of using biologic parameters (EUD and NTCP) in IMRT optimization for treatment of intrahepatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 62(2):571-578.
- Van den Eynde M. and Hendlisz A., 2009. Treatment of Colorectal Liver Metastases: A Review. *Reviews on recent clinical trial*, 4, 56-62
- Wessels B.W., Syh J.H. and Meredith R.F., 2006. Overview of dosimetry for systemic targeted radionuclide therapy (STaRT). *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 66(2) ppS39-S45.
- Wierts R., de Pont C.D.J.M., Brans B., Mottaghy F.M., Kemerink G.J., 2011. Dosimetry in molecular nuclear therapy. *Methods* 55, 196-202.
- Wittig A., Malago M., Collette L., Huiskamp R., Bührmann S., Nievaart V., Kaiser G.M., Jöckel K.H., Schmid K.W., Ortman U., Sauerwein W., 2008. Uptake of two

¹⁰B- compounds in liver metastases of colorectal adenocarcinoma for extracorporeal irradiation with boron neutron capture therapy. *Int J Cancer* 122:1164-1171.

Zonta A., Prati U., Roveda L., Ferrari C., Zonta S., Clerici A.M., Zonta C., Pinelli T., Fossati F., Altieri S., Bortolussi S., Bruschi P., Nano R., Barni S., Chiari P., Mazzini G., 2006. Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases. *J. Phys. Conf. Ser.* 41, 484–495.

Tabla 1 Valores de concentración de boro y factores de relación tejido/sangre usados para los cálculos dosimétricos. Los valores se expresan como [media \pm DS]

Datos de biodistribución (Garabalino et al. 2011)	
Tejidos	BPA (46,5 mg ¹⁰ B/Kg) ip
Tumor*	39 \pm 10 (n=15)
Hígado Normal*	15,1 \pm 6,5 (n=10)
Sangre*	16,5 \pm 3,1 (n=10)
Hígado normal/ Sangre	0,8 \pm 0,2
Tumor /Sangre	1,9 \pm 0,4

*Las concentraciones de boro se expresan en ppm.

Tabla 2 Respuesta tumoral expresada como superficie del nódulo tumoral Post / Pre-tratamiento y masa del nódulo tumoral.

Dosis Absorbida en tumor [Gy]				
# rata	Dosis Total*	Dosis Boro*	Superficie tumoral Post/Pre	Masa tumoral [mg]
R66	4,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	16,56	2176,0
R50	4,8 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	12,83	1137,0
R4	6,1 \pm 0,6	1,8 \pm 0,5	3,98	273,3
R82	6,8 \pm 0,9	3,3 \pm 0,9	3,13	55,3
R81	7,0 \pm 1,0	3,5 \pm 0,9	0,34	15,2
R73	8,1 \pm 1,3	4,7 \pm 1,2	1,68	28,0
R83	8,3 \pm 1,3	4,8 \pm 1,3	0,88	29,0
R95	8,8 \pm 1,3	4,6 \pm 1,2	0,95	59,3
R94	8,8 \pm 1,3	4,7 \pm 1,2	1,19	59,9
R61	8,9 \pm 1,5	4,5 \pm 1,5	2,33	16,7
R77	9,2 \pm 1,5	5,6 \pm 1,5	0,33	3,3
R76	9,4 \pm 1,5	5,8 \pm 1,5	0,31	4,9
R51	10,5 \pm 1,8	6,9 \pm 1,8	0,65	7,7
R86	10,6 \pm 1,7	6,3 \pm 1,7	0,69	20,9
R80	10,9 \pm 1,9	7,2 \pm 1,9	0,55	8,2
R85	11,2 \pm 2,0	6,9 \pm 2,0	0,22	5,6
R60	11,2 \pm 1,8	7,5 \pm 1,8	0,25	0,9
R84	12 \pm 2	8 \pm 2	0,73	10,4
R62	16 \pm 4	12 \pm 4	0,32	3,6

*Los valores se expresan como [media \pm DS]

Figura 1 Respuesta tumoral 5 semanas post- tratamiento con BPA-BNCT, medida como la relación de la superficie tumoral Post-/Pre-tratamiento en cada animal, en función de la dosis total absorbida. Los resultados se comparan con los valores promedio \pm DS obtenidos de las mediciones realizadas en los grupos Sham y Solo Haz.

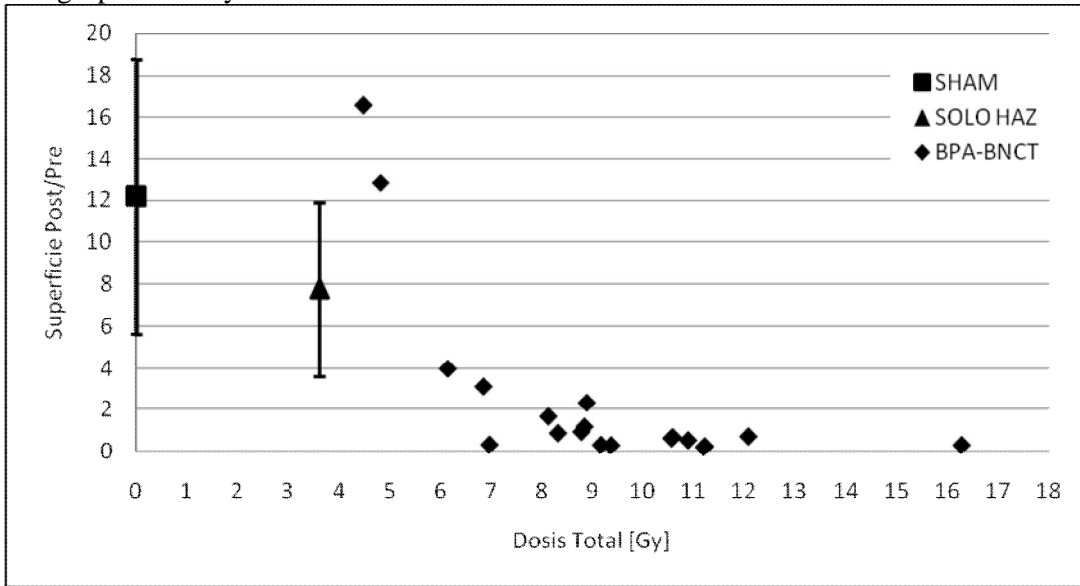


Figura 2 Masa del nódulo tumoral medida en cada animal 5 semanas post-tratamiento con BPA-BNCT, en función de la dosis total absorbida. Los resultados se comparan con los valores promedio \pm DS obtenidos de las mediciones realizadas en los grupos Sham y Solo Haz.

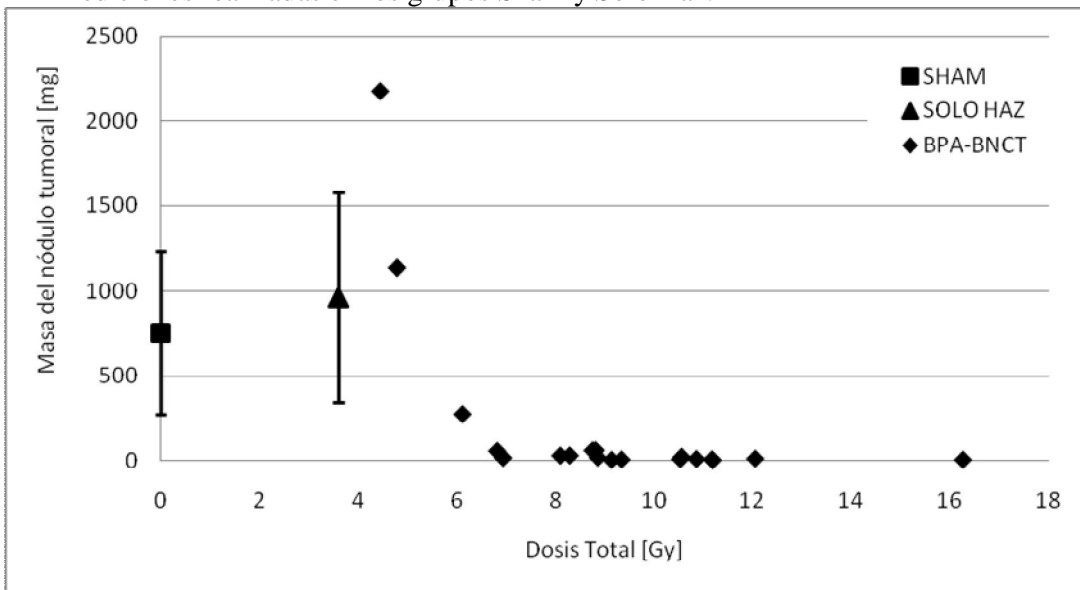


Tabla 3 Respuesta tumoral 5 semanas post-tratamiento expresada como superficie del nódulo tumoral Post/Pre-tratamiento y masa del nódulo tumoral, considerando los subgrupos BPA-BNCT I y BPA-BNCT II (ver detalle en el texto). Los valores se expresan como [media \pm DS]

Tratamiento	Superficie post/pre tratamiento	Masa tumoral post-tratamiento [mg]
Sham	12,2 \pm 6,6 n = 7	750 \pm 480 n = 7
Solo Haz	7,8 \pm 4,1 n = 8	960 \pm 620 n = 8
BPA-BNCT I	4,4 \pm 5,6 n = 10	390 \pm 720 n = 10
BPA-BNCT II	0,45 \pm 0,20 n = 9	7,3 \pm 5,9 n = 9

Tabla 4 Porcentaje de animales, 5 semanas post-tratamiento, cuyos tumores exhibieron una remisión parcial, en términos de algún grado de reducción del área tumoral pre-tratamiento.

Sham	Solo Haz	BPA-BNCT I		BPA-BNCT II	
PR	PR	PR	PR _{0,5}	PR	PR _{0,5}
0%	0%	30%	10%	100%	56%

Tabla 5 Comparación de la respuesta tumoral observada a diferentes tiempos post-tratamiento con BPA-BNCT, Solo Haz (irradiación sin compuesto borado) o Sham (sin tratamiento). Los valores se expresan como [media \pm DS].

Protocolo/Tiempo	3 semanas post-tratamiento (BPA-BNCT: dosis total absorbida 13 \pm 3 Gy, Pozzi et al., 2012)		5 semanas post-tratamiento (BPA-BNCT II: dosis total absorbida entre 9-16 Gy, este estudio)	
	Post/Pre Sup.	Masa (mg)	Post/Pre Sup.	Masa (mg)
Sham	4,5 \pm 3,1 (n=13)	346 \pm 302 (n=13)	12,2 \pm 6,6 (n=7)	751 \pm 480 (n=7)
Solo Haz	2,7 \pm 1,8 (n=10)	147 \pm 102 (n=10)	7,8 \pm 4,1 (n=8)	960 \pm 615 (n=8)
BPA-BNCT	0,5 \pm 0,2 (n=10)	19 \pm 16 (n=10)	0,4 \pm 0,2 (n=9)	7 \pm 6 (n=9)