



22 a 27 de abril de 1990

ANAIS - PROCEEDINGS**ESTUDOS DA BIODISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS RICOS EM BORO-10 PARA UTILIZAÇÃO EM BNCT (Boron Neutron Capture Therapy)**Priscila de Faria Gaspar
Nélida Lúcia Del MastroDepartamento de Aplicações em Ciências Biológicas
Divisão de Radiobiologia
Comissão Nacional de Energia Nuclear-IPEN-CNEN/SPSUMÁRIO

A BNCT baseia-se na capacidade dos átomos de boro-10 absorverem neutrons térmicos e transmutarem-se em átomos de lítio-7, emitindo uma partícula alfa com energia cinética de 2,33 MeV, o que lhe confere baixo alcance e alto poder destrutivo. Incorporando-se boro-10, que não é radioativo, em tumores e irradiando-se com neutrons térmicos pode-se destruir o tumor sem danificar o tecido adjacente, uma vez que a reação nuclear é restrita à região onde ambos os fatores estiverem presentes, ou seja, neutrons térmicos e átomos de boro-10. Dessa forma é fundamental o conhecimento da biodistribuição destes compostos, o que é feito através da determinação quantitativa de boro-10 em tecidos animais. Com esse objetivo, apresentamos os primeiros dados de nosso trabalho em amostras de sangue e outros tecidos biológicos, com o uso do método do registro de traços, que consiste em irradiar com neutrons térmicos provenientes do reator IEA-R1 amostras justapostas a filme detetor apropriado, no qual são marcados traços pelas partículas alfa emitidas. O número de traços é diretamente proporcional à concentração de boro-10 na amostra, de modo que a concentração pode ser obtida por meio de uma curva-padrão.

ABSTRACT

BNCT is based on the boron-10 atoms capacity of absorbing thermal neutrons with the emission of 2.33 MeV alpha particles, which are confined to a little locus and have high destructive power. By incorporating ^{10}B a nonradioactive isotope, in tumors before thermal neutrons irradiation it can be possible to destroy the tumor without surrounding normal cell damage, then the nuclear reaction will take place where both thermal neutrons and boron-10 occur. Thus, the understanding ^{10}B compounds biodistribution is very important, and it can be established by quantitative analysis of boron-10 in animal tissues. We present here the earliest result of our work using nuclear track detector. We used a thermal neutron beam from the IEA-R1 reactor incident on tissue and blood samples in contact with an appropriate detector film, where tracks are impressed. The number of tracks is proportional to samples ^{10}B concentrations which are obtained by means of a standard curve.

1. INTRODUÇÃO

Em qualquer tipo de terapia contra o câncer é tão importante preservar as funções normais do corpo quanto a destruição do tumor. No caso particular do câncer cerebral, se as funções normais não forem preservadas o paciente pode ficar inválido, daí a necessidade de uma terapia seletiva, ou seja, que destrua as células tumorais sem no entanto atingir o tecido sadio adjacente (Hatanaka, 1986).

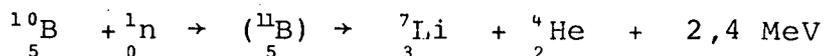
Em radioterapias convencionais usando raios X, raios gama ou feixe de elétrons, podem ocorrer danos a tecidos circunvizinhos às células tumorais. As partículas alfa, entre tanto, são 8.000 vezes mais pesadas que elétrons e têm o dobro da carga elétrica. Juntos, esses fatores as tornam mais efetivas na destruição de tecidos humanos com a vantagem de atuarem apenas localmente, devido ao seu baixo alcance. Desta forma, têm sido feito estudos para marcação de anticorpos e certos compostos com capacidade de se ligar especificamente a tumores, com nuclídeos que emitem partículas alfa, como o Astatínio-211, bismuto-209 e o tório-228 (Sutton C.1987).

Alguns nuclídeos, no entanto, não são emissores alfa a princípio, mas têm capacidade de absorverem neutrons térmicos provenientes de um reator nuclear de baixa potência e sofrer uma reação de captura neutrônica seguida da emissão de uma partícula alfa. Essa propriedade é determinada pela seção de choque de absorção neutrônica, cuja unidade é o barn ($1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$). Exemplos de alguns nuclídeos com alta seção de choque de absorção de neutrons são dados abaixo:

^3He	=	5237	barn	^6Li	=	940	barn
^{10}B	=	3837	barn	^{113}Cd	=	15787	barn
^{149}Sm	=	41000	barn				
^{235}U	=	693	barn	$(^{155},^{157})\text{Cd}$	=	160000	barn

Com exceção do lítio, urânio e boro, os demais são também emissores de raios gama de alta energia, que não atuam apenas localmente, uma vez que estes raios são muito penetrantes.

Segundo Hatanaka (1986), a possibilidade de aplicação terapêutica da reação de captura neutrônica foi primeiramente proposta por Locher, em 1936, baseado na reação nuclear:



Desde então, numerosos estudos foram feitos a fim de se obterem compostos ricos em boro-10 que tenham capacidade de se acumular em tecidos tumorais, proporcionando uma terapia seletiva dependente de dois fatores principais: concentração de ${}^1_0\text{B}$ nas células tumorais e incidência de um feixe de neutrons térmicos proveniente de um reator nuclear de baixa potência (reator de pesquisa).

Essa terapia é atualmente conhecida por BNCT (Boron Neutron Capture Therapy), sendo que diversos ensaios clínicos com pacientes portando gliomas e glioblastomas obtiveram êxito. Neste tratamento foi utilizado o mercaptohidrododecaborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{H}_{10}\text{SH}$), injetado endovenosamente sob a forma de uma solução isotônica, algumas horas antes de submeter

o paciente à irradiação neutrônica (M.D., D.Sc. H. Hatanaka - Teyko University - Japan). No caso desse composto, a deposição diferencial que ocorre pode ser parcialmente explicada pela presença da barreira hematoencefálica nos capilares que irrigam o tecido cerebral normal, mas não existente ou imperfeita nos capilares que irrigam o tumor. A barreira hematoencefálica reside na parede dos capilares, os quais são estruturas contínuas, com células endoteliais unidas por extensas junções íntimas, sendo revestidas por pequenas expansões das células da glia, de modo a dificultar ou mesmo impedir o trânsito de moléculas entre o sangue e o interstício (Zago, D.A. 1988). Desta forma, o composto pode atingir altas concentrações no tumor, passando do sangue para este, sem contudo depositar-se nas células cerebrais sadias.

Outros compostos têm sido estudados, tanto para tumores cerebrais como para outros tipos. Mishima por exemplo, estuda compostos que participam da via metabólica de síntese da melanina, que podem servir como carregadores de ^{10}B para melanomas (Mishima, Y. 1985). É importante salientar que a afinidade do composto pelo tipo de tumor é imprescindível, pois são necessários cerca de 10^9 átomos de ^{10}B por célula tumoral ($\sim 20 \mu^{10}\text{B/g}$ de tumor) para eficácia da terapia. Por outro lado, a especificidade do composto garante a proteção do tecido sadio adjacente, o que torna de suma importância o conhecimento da biodistribuição desses compostos no organismo inteiro e especialmente em alguns tecidos (tumor, tecido adjacente, capilares etc.)

Desta forma, o estudo da biodistribuição de compostos ricos em boro 10 em animais de experimentação portadores de tumores induzidos ou implantados se faz necessário para estabelecer o alcance desta técnica radioterapêutica, podendo elucidar alguns pontos importantes em relação à dinâmica e cinética da distribuição nesses organismos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análise Qualitativa

Através da técnica de neutronografia com filme radiográfico e placa conversora de gadolínio, tentou-se desenvolver um método de mapeamento de ^{10}B em camundongos.

Inoculou-se suspensão de células cultivadas de melanoma B.16.F.10 através de injeção subcutânea na parte traseira direita em três grupos de camundongos da linhagem C.57B1 com idades entre 5 e 10 semanas. Ao terceiro grupo foi administrada água deuterada por via oral (Tabela I).

Os animais foram injetados intraperitonealmente com $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ enriquecido a 92,41% ou solução salina, sendo após algumas horas sacrificados por punção cardíaca e exsanguinação, sob anestesia com éter etílico. Após o sacrifício foram fixados em suporte de alumínio e irradiados no beam-hole nº 10 do reator IEA.R1, o qual apresentava um fluxo de $\sim 10^6 \text{ n/cm}^2\text{s}$, conforme especificações na figura 1 e tabela II.

2.2. Análise Quantitativa

2.2.1. Determinação indireta do ^{10}B a partir do Li formado na reação $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$

Foram preparadas soluções de ácido bórico em cinco concentrações diferentes entre 1,6 e 16 ppm. Acrescentou-se ácido bórico enriquecido a amostras de sangue de forma que a concentração final de ^{10}B fosse a mesma das soluções. Todas as amostras foram irradiadas no núcleo do reator IEA.R1 a um fluxo neutrônico de $10^{13}\text{n/cm}^2\text{s}$ durante 45 minutos.

Após o decaimento, determinou-se a concentração de ^7Li através de espectrometria de absorção atômica, comparando-se os resultados obtidos com curva-padrão traçada a partir de soluções padrão feitas com hidróxido de lítio.

2.2.2. Determinação de ^{10}B através da técnica do registro de Traços

A determinação de ^{10}B em homogeneizados de tecidos e preparações histológicas utilizando a técnica de Abe et al. (1983) emprega a propriedade dos átomos de ^{10}B emitirem partículas alfa quando irradiados com neutrons térmicos, as quais marcam traços em filmes detetores apropriados.

Para tal finalidade foi confeccionado um porta-amostras de alumínio com 25 concavidades para serem colocadas as amostras, conforme esquema na figura 2.

As soluções de ácido bórico e amostra de sangue citadas no item 2.2.1. foram colocadas nas cavidades do porta-amostras estando o filme detetor de traços MAKROFOL diretamente em contato com estas, e pressionado entre as duas placas. A seguir, foram irradiadas no beam-hole nº 10 do reator IEA.R1, com fluxo de $10^6\text{n/cm}^2\text{s}$ durante 1 hora. Posteriormente os filmes foram revelados em solução de NaOH.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas neutrongrafias obtidas do grupo 1 é possível observar áreas mais claras na cabeça, abdômen e tumor, o que poderia indicar a captura neutrônica produzida pela presença dos compostos de boro. No entanto, o mesmo resultado é observado no animal-controle, no qual injetou-se solução salina. Dessa forma, as regiões mais claras parecem estar relacionadas simplesmente à maior espessura do tecido nessa região, uma vez que, sendo a matéria orgânica rica em hidrogênio, ocorre maior espalhamento dos neutrons diminuindo o contraste esperado entre as regiões com diferentes concentrações de boro. Com relação ao grupo 2, houve excesso de exposição a raios gama devido a mudança de configuração do núcleo do reator, levando à queima dos filmes radiográficos utilizados. A fim de se diminuir o espalhamento de neutrons pelo hidrogênio e aumentar o contraste, ao terceiro grupo foi administrada água deuterada. Nas neutrongrafias obtidas também não fica claro se as regiões menos impregnadas do filme se deve ao boro ou à espessura. Nota-se no entanto, que as extremidades finas dos animais (membros sem tumor e cauda) tornaram-se totalmente transparentes aos

neutrons, além de se observar algumas cavidades do corpo do animal (canal auditivo e pulmões). (Fig. 3 e 4).

A única determinação de lítio que pode ser feita foi da solução mais concentrada de ácido bórico (16 ppm), sendo a quantidade de lítio observada de $5,3 \times 10^{-4}$ ppm, enquanto que a esperada era de $1,6 \times 10^{-3}$ ppm. Para as demais soluções, a absorvância lida estava abaixo do limite inferior de sensibilidade do aparelho. Com relação às amostras de sangue, ocorreu solidificação durante a irradiação, o que impossibilitou que a determinação do lítio fosse realizada.

A densidade dos traços observados no filme detector apresentou-se bastante elevada, podendo inclusive observar-se o aspecto opaco a olho nu. No entanto, por terem sido as concavidades completamente preenchidas, e por ser o porta-amostras posicionado na vertical durante a irradiação (perpendicularmente ao feixe), ocorreu mistura entre as diferentes amostras. Este problema foi contornado utilizando-se menor volume de fluido por concavidade e ainda aplicando-se graxa de silicone nas bordos, de forma a compor barreiras impermeáveis entre as concavidades e permitindo maior adesão ao filme. No momento encontra-se no aguardo de novos resultados.

4. CONCLUSÃO

A neutrongrafia como técnica de mapeamento de ^{10}B apresenta dificuldades relacionadas principalmente ao contraste. Além de espalhamento de neutrons produzido pelo hidrogênio o corre emissão de raios gama-pronto em pequena proporção na reação de captura neutrônica pelo ^{10}B . No entanto, a utilização de D_2O parece ser viável, desde que se evite a morte por desidratação pela não aceitação desta pelos animais e eventuais efeitos tóxicos. Segundo Thomson (1963), isto pode ser obtido através da adição de traços de NaCl , bem como da diluição a 50% em H_2O . O autor cita ainda que um equilíbrio de 30% de deuteração é atingido após 14 dias de administração via oral em camundongos. Outro importante fator é a energia dos neutrons, uma vez que o feixe utilizado apresentava predominantemente neutrons térmicos e frios, de baixa penetrabilidade. Com um feixe tendendo à energia dos neutrons epitérmicos a espessura do corpo do animal não seria tão prejudicial.

O método de determinação indireta através do lítio formado demonstrou-se inapropriado para materiais biológicos por causa da denaturação proteica, baixa sensibilidade para as concentrações de ^{10}B usadas em BNCT além do inconveniente da demora do decaimento dos sais presentes ativados na irradiação.

Dessa forma, parece que o método do registro de traços é mais viável, o que já é demonstrado inclusive pelos inúmeros trabalhos citados na literatura (Pugliesi et al., 1985; Gabriel et al., 1987; Abe et al., 1983). Uma vez que a grande densidade de traços obtida formou regiões opacas visíveis a olho nu, é ainda possível obter-se alfa-autorradiografia induzida por neutrons de cortes histológicos.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Reinaldo Pugliesi pela contribuição e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, M.; AMANO, K.; KITAMURA, K.; TAKEISHI, H. Boron-10 distribution in rat brain tumors. In: Proceedings of the First International Symposium on Neutron Capture Therapy, New York, October 12-14, 1983. P. 155-158.
2. GABEL, D.; HOLSTEINS, H.; LARSSON, B.; GUILLE, L.; ERICSSON, G.; SACKER, D.; SOUR, K.; FAIRCHILD, R.G.. Quantitative Neutron Capture Radiography for Studying the Biodistribution of Tumor Seeking boron-containing Compounds. Cancer Research 47:5451-5454, October, 1987.
3. HATANAKA, H. Boron Neutron Capture Therapy for tumors. Japan, Nishimura Co. Ltd., 1-28, 1986.
4. MISHIMA, Y. (Ed.) Selective Thermal Neutron Capture Treatment of Malignant Melanoma using its specific Metabolic Activity. Kyoto, KURRI - TR 260, 1985.
5. PUGLIESI, R.; MORAES, M.A.P.V.; KHOURI, M.T.C. Determinação de boro em soluções aquosas empregando um feixe de neutrons filtrado, pela técnica do registro de traços. São Paulo, Publicação IPEN, 89, 1985.
6. SUTTON, C. Nuclear Medicine homes in on disease. New Scientist, 1543:48-53, 1987.
7. THOMSON, J.F. Biological Effects of Deuterium. In: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology. The McMullan Company New York, 1963.
8. ZAGO, D.A. Barreiras Biológicas In: VALLE, L.B.; OLIVEIRA FILLHO, R.M.; DE LUCIA, R. OGA, S. Farmacologia Integrada vol.I - Princípios Básicos São Paulo, Livraria Atheneu, 55-59, 1988.

TABELA I - Características dos diferentes grupos experimentais

GRUPO	IMPLANTE DO TUMOR	TUMOR OBSERVÁVEL	TRATAMENTO	OBSERVAÇÕES
1	22 dias após nascimento	10 dias após implante	H ₂ O	Falecimento de 5 machos por metástase pulmonar
2	32 dias	7 dias após implante	H ₂ O	Todos sobre - viveram
3	39 dias	9 dias após implante	D ₂ O	Falecimento de 4 machos por desidratação

TABELA II - Tratamentos aplicados nos animais analisados por neutrongrafia

GRUPO	PESO	INJEÇÃO (dias após implante)	COMPOSTO INJETADO	DOSE DE ¹⁰ B (µg/g)	SACRIFÍCIO (horas após injeção)	PERIODO IRRADIAÇÃO (min)
1	19,2	19	Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ SH	199	-	-
	21,4	19	H ₃ BO ₃	175	18	20
	24,2	19	Sol. salina	-	-	-
2	19,9	7	Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ SH	200	-	-
	19,5	7	H ₃ BO ₃	200	-	-
	19,1	7	Sol. salina	-	-	-
	22,2	10	Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ SH	200	-	-
	21,7	10	H ₃ BO ₃	200	16	25
	22,1	10	Sol. salina	-	-	-
	18,3	10	Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ SH	200	-	-
	17,4	10	Sol. salina	-	-	-
3	19,3	10	Na ₂ B ₁₂ H ₁₁ SH	199	-	-
	18,9	10	Sol. salina	-	18	10

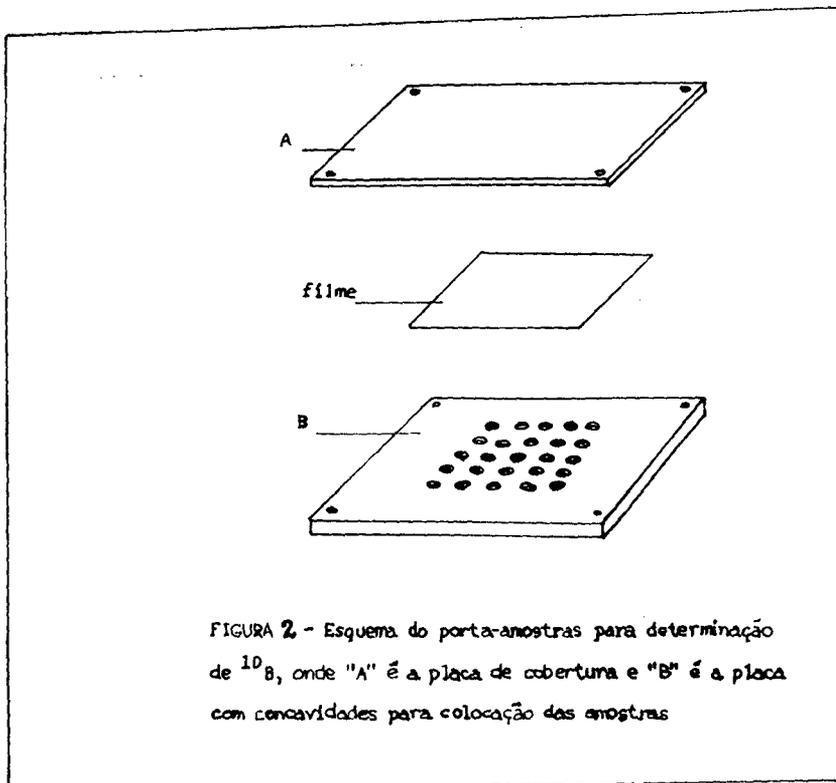
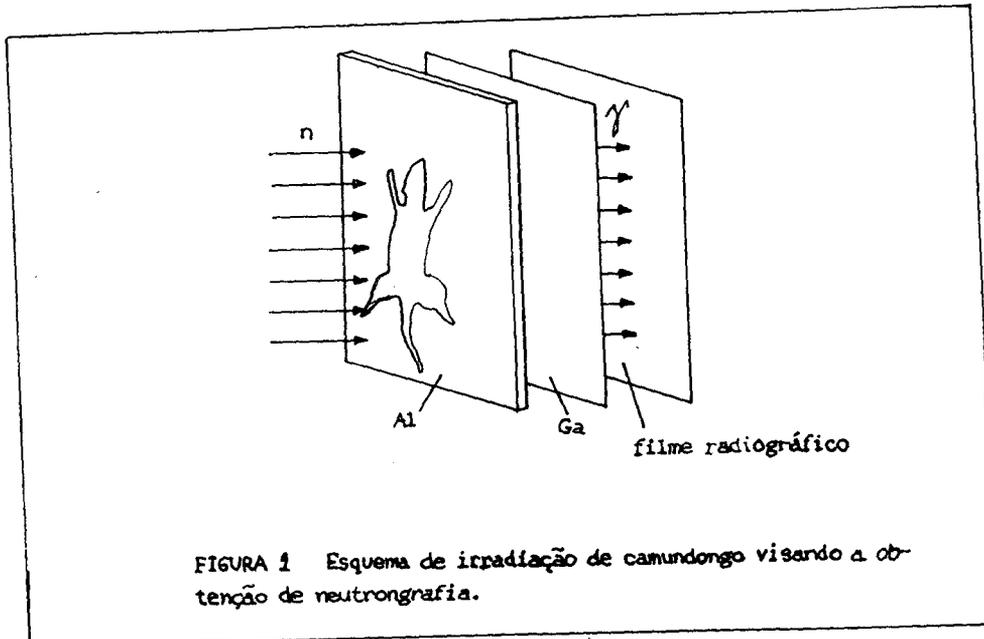




FIG.3 - Neutronografia de camundongo C57B1 com tumor injetado com $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ 18 horas antes do sacrifício.

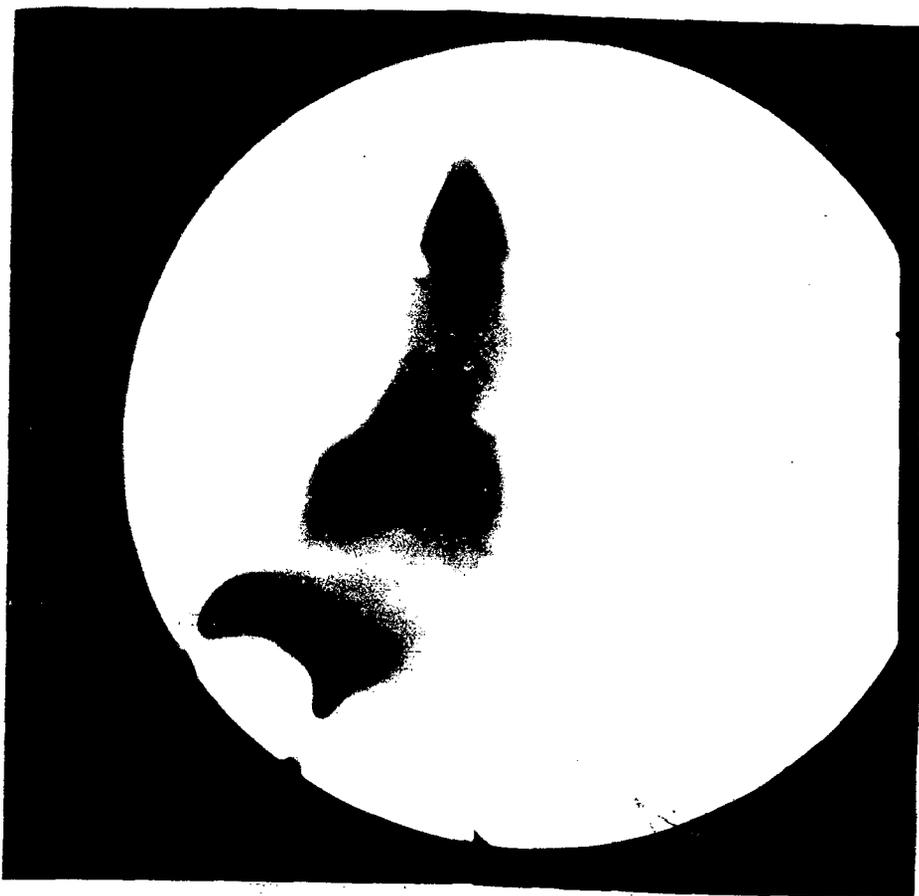


FIG.4 - Neutronografia de camundongo C57B1 com tumor ao qual administrou-se D_2O via oral durante 10 dias, injetado com $Na_2B_{12}H_{11}SH$ 18 h antes do sacrifício.