

Informe de Actividades durante el período de Beca

Nombre: Natalia Mercedes Espector

Tipo: Beca de Entrenamiento 2014

Período: Octubre 2014 – Octubre 2015

Título: Entrenamiento en técnicas relacionadas con la autorradiografía en detectores de trazas nucleares

Directora de beca: Dra. Gisela Saint Martin

Lugar de trabajo: Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

Introducción

Terapia por Captura Neutrónica de Boro

La Terapia por Captura Neutrónica de Boro (BNCT) es una metodología en desarrollo para el tratamiento de tumores que responden pobremente ante las terapias convencionales (Coderre et al., 2003, Barth et al., 2012; Moss, 2014). La misma se basa en la alta sección eficaz de captura del isótopo ^{10}B para neutrones térmicos, produciéndose la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha) ^7\text{Li}$.

Tanto la partícula α como el ion litio emitidos en esta reacción tienen la particularidad de poseer un alto LET (transferencia lineal de energía). Además, sus rangos (distancia máxima recorrida hasta su frenado) en tejidos son del orden del diámetro celular.

De esta manera, administrando un compuesto borado que se acumule preferencialmente en las células tumorales (y no en las sanas), al producirse la reacción de captura, las partículas resultantes depositarán toda su energía en la célula en cuestión (o en las vecinas), destruyéndolas, pero sin afectar las sanas.

Para poder determinar en qué medida un compuesto borado es captado por las células tumorales, es necesario implementar técnicas de dosimetría que permitan no solamente calcular la concentración total de átomos de boro en una muestra biológica, sino también estudiar la microdistribución de esas partículas.

Autorradiografía Neutrónica

La técnica de autorradiografía neutrónica se basa en la utilización de detectores de trazas nucleares (NTDs) para registrar, en forma permanente, el

daño (trazas) generado por los iones producidos a partir de reacciones inducidas por los neutrones (Armijo and Rosenbaum, 1967; Fleischer et al., 1975; Durrani and Bull, 1987). Tiene una gran aplicación en la investigación de BNCT, ya que permite analizar la microdistribución de elementos emisores (en este caso ^{10}B) tanto en forma cualitativa como cuantitativa (Portu et al., 2011a).

Para el análisis de la distribución de ^{10}B en tejidos, se realizan cortes histológicos de la muestra perteneciente a un animal/paciente previamente infundido con un compuesto borado. Los mismos se llevan a cabo generalmente sobre muestras congeladas, mediante micrótopo criostático. Estos cortes se sitúan sobre los NTD y se los expone a un flujo de neutrones térmicos, tal como se observa en la figura 1. Al producirse la reacción de captura, se emiten una partícula alfa y un ion litio en direcciones opuestas, de manera que algunas de estas partículas impactarán sobre el detector generando un daño (trazas latentes). Mediante un ataque químico adecuado (etching) del detector, las trazas pueden amplificarse a nivel de microscopía óptica, lo que permite su observación y eventualmente la adquisición de imágenes digitales para su análisis.

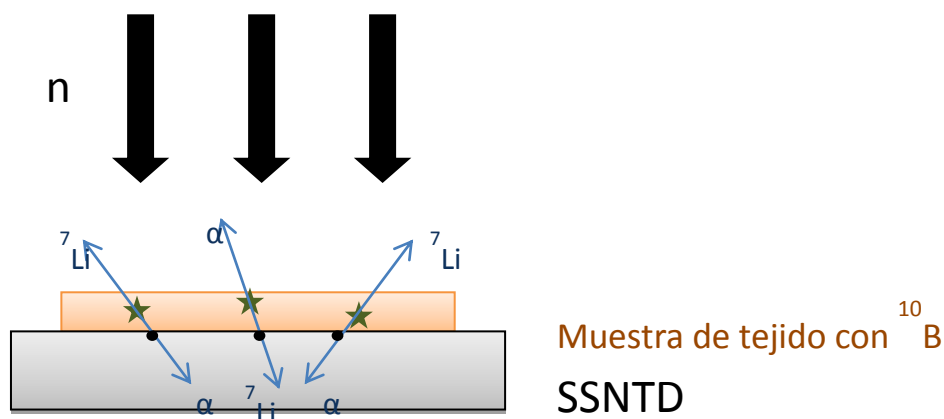


Figura 1. Proceso de formación de trazas en la técnica de autorradiografía neutrónica aplicada a BNCT.

La determinación de la concentración de boro en las distintas zonas se realiza utilizando la imagen autorradiográfica. A través del conteo de eventos en cada imagen se determina la densidad de trazas (eventos por unidad de área). Finalmente, utilizando curvas de calibración obtenidas a partir de soluciones acuosas patrón, se calcula el valor de la concentración de boro (Portu et al., 2011b).

Estudio de espesores de tejidos para autorradiografía

Tanto las características del tejido a estudiar, como el valor del rango máximo de las partículas producidas en la reacción de captura, son factores determinantes del espesor mínimo de corte que puede ser utilizado en la

técnica de autorradiografía. En la figura 2, se observa que a medida que se aumenta el espesor del corte la cantidad de átomos de ^{10}B es mayor y, por lo tanto, se producen más reacciones. Sin embargo, a partir de un cierto espesor que supere el rango de las partículas emitidas, la cantidad de trazas que se generan en el detector será constante, pues los átomos de boro que estén a distancias mayores de la superficie que este valor, darán lugar a reacciones que no podrán ser registradas.

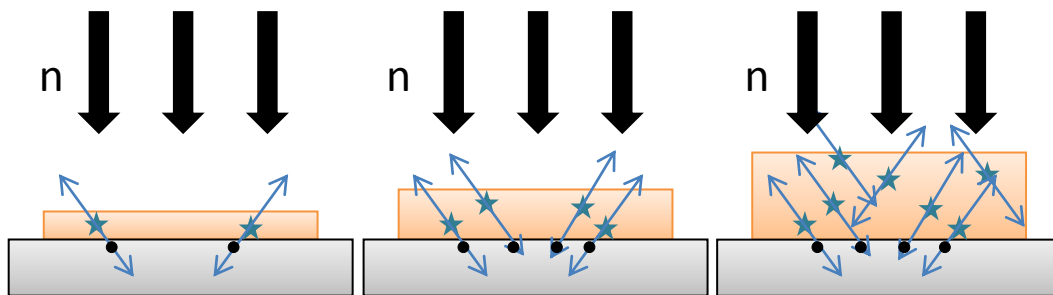


Figura 2. Variación de la densidad de trazas con el espesor del corte histológico.

La curva de calibración utilizada actualmente en el laboratorio para la cuantificación de boro supone un espesor “infinito” de muestra (mucho mayor que el rango de las partículas), por lo que para utilizar cortes más delgados sería necesario determinar un factor de corrección.

Por otra parte, del análisis anterior surge la necesidad de considerar otro factor, fundamental para la determinación de la concentración de boro. En efecto, dado que los cortes se realizan sobre el material congelado, es crítico el proceso de evaporación en el corte histológico, iniciado a partir de su obtención en el micrótopo criostático. El corte se “encogerá” a medida que vaya alcanzando la temperatura ambiente y se vaya deshidratando. Por esta razón, el espesor nominal de corte (predeterminado por el micrótopo criostático) difiere del espesor real de la muestra en el momento de la irradiación y del análisis. Debido a esto, se determinó la necesidad de establecer un coeficiente para corregir el valor del espesor nominal (Gadan et al., 2012)

Tareas realizadas durante el período de beca

En una primera etapa, se realizó un estudio de la bibliografía básica relacionada con los NTDs, con los antecedentes de BNCT y, en particular, de los principios de la técnica de autorradiografía neutrónica y sus aplicaciones. Se utilizaron distintos recursos para la búsqueda de nueva bibliografía, tales como la Biblioteca de Ciencia y Técnica, y buscadores especializados como Scopus, PubMed, etc.

En distintas ocasiones se colaboró con otros grupos del Departamento de Radiobiología en la realización de biodistribuciones de compuestos borados en

animales según distintos protocolos de BNCT, para la preparación y almacenamiento de tejidos a ser estudiados por autorradiografía.

Se procesaron preparados histológicos para su observación, mediante fijación, deshidratación, desparafinación, coloración y montaje de los cortes, para lo cual se contó con entrenamiento en los distintos pasos del proceso.

Se realizó un entrenamiento en las distintas etapas de la generación de un corte de tejido para su análisis autorradiográfico:

- Manejo de muestras biológicas conservadas en nitrógeno líquido para la realización de cortes por congelación.
- Realización de cortes de distintos espesores en micrótopo criostático de los tejidos a estudiar.
- Montaje de los cortes realizados en los detectores poliméricos, y preparación de los mismos para ser irradiados con neutrones térmicos en el reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza.
- Estudio de los principios de operación del reactor, sistemas de seguridad, radioprotección, geometría de la irradiación, etc.

Se llevaron a cabo todos los procedimientos relacionados con el revelado de los detectores irradiados mediante el proceso de etching químico: preparación de soluciones, marcado de muestras, manejo de baño termostático, agitador magnético, etc

Se observaron las imágenes autorradiográficas mediante microscopía óptica y se tomaron fotografías digitales de las mismas para su análisis (aproximadamente 50 fotos por corte). Utilizando un software específico, se cuantificó la densidad de trazas de cada imagen obtenida. Esta información, en conjunto con la curva de calibración y los factores de corrección, se utilizó para evaluar la concentración de boro de cada uno de los cortes analizados.

Se llevaron a cabo las operaciones de pesado y elaboración de geles de agarosa con concentraciones conocidas de boro, para ser utilizados como muestras patrón en la cuantificación en tejidos.

En el marco de esta beca de entrenamiento, se realizaron las primeras pruebas para el estudio de la dinámica de evaporación de tejidos. Para esto, se diseñó un programa en Matlab que permite la comunicación entre una balanza y la computadora mediante el puerto serie RS-232, de manera de obtener un registro online de la variación de la masa en función del tiempo.

Habiéndose determinado que tanto la deriva de la balanza como el proceso de evaporación dependen de factores ambientales, tales como temperatura,

presión y humedad, se vió la necesidad de adquirir sensores, los que fueron conectados con la computadora y probados, de forma de generar un registro de estos factores en función del tiempo.

Por otra parte, habiéndose encontrado que la precisión de la balanza (0.1 mg) no era suficiente para observar correctamente el proceso de evaporación, se decidió adquirir una balanza semi micro (0.01 mg) para aumentar la precisión de la medición. El código del programa fue adaptado a la nueva balanza, que posee comunicación USB.

Se armó una plataforma antivibratoria para la balanza y se participó del proceso de calibración de la misma. Se estudió la deriva de la misma en función del tiempo y se realizaron las primeras pruebas de evaporación de hígado, con resultados satisfactorios.

Finalmente, se participó también en la confección de trabajos científicos para publicaciones y presentaciones del grupo.

Aplicación específica

Como se había planteado en el plan de trabajo de la beca, se estudió la variación de la densidad de trazas en la imagen autorradiográfica con el espesor del corte de tejido. Se utilizaron muestras de hígado sano de ratones NUDE y hámsters, por ser un tejido de estructura homogénea, que por lo tanto presenta una distribución uniforme de boro y permite realizar comparaciones entre cortes de diferentes espesores de una misma muestra o entre diferentes muestras.

Los resultados experimentales se confrontaron con cálculos realizados a partir de un modelo estocástico del proceso de formación de trazas, con el código BPSS (Boron Particle Stochastic Simulation) v.1.0 que había sido desarrollado anteriormente (Saint Martin et al., 2011).

Este análisis permitió determinar el espesor de corte mínimo compatible con la utilización de la curva de calibración actual para la cuantificación de la concentración de boro, y que, a la vez, permite la observación histológica de la sección de tejido.

Resultados obtenidos

El entrenamiento en la aplicación de la técnica de autorradiografía neutrónica en tejidos permitió desarrollar el análisis de la relación entre la densidad de trazas y el espesor de la muestra, cuyos resultados se detallan a continuación.

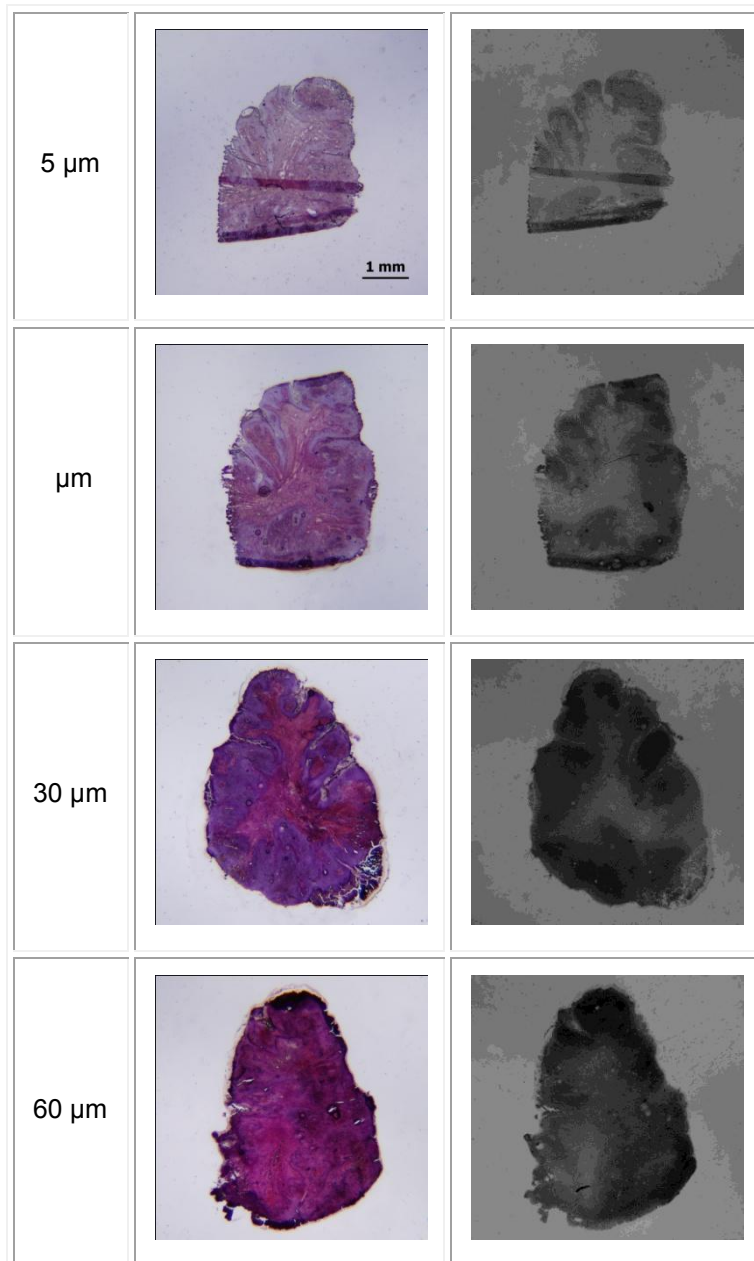


Figura 3. Imágenes histológicas y autorradiográficas para distintos espesores de tumor de hámster. Fluencia 10^{13} n.cm⁻².

Desde un punto de vista cualitativo, en la figura 3 se observa que, para espesores menores, la imagen histológica permite distinguir más claramente las distintas estructuras tisulares. La nitidez de la imagen autorradiográfica, en cambio, mejora a medida que el espesor aumenta, aunque no se observan variaciones significativas en la densidad de trazas a partir de los 30 μm de espesor, de acuerdo a lo observado en los modelos planteados.

Este fenómeno se observó también a mayor aumento, en las imágenes utilizadas para el análisis cuantitativo (figura 4).

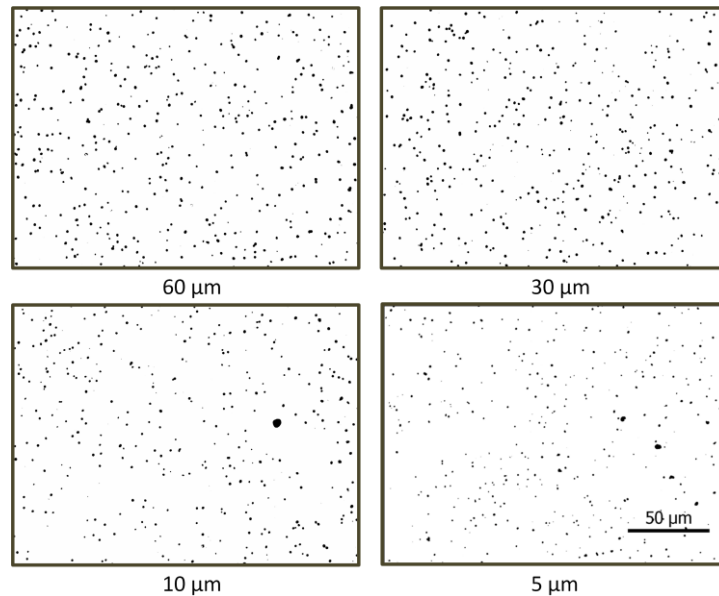


Figura 4. Imágenes autorradiográficas para distintos espesores de hígado normal de ratones NUDE. Fluencia 10^{12} n.cm⁻².

A partir de la cuantificación de la densidad de trazas se observó un aumento sostenido de este valor con el espesor del corte, llegando a un valor máximo para 30 μm de espesor nominal. En la Figura 5 se observa un ejemplo de la evolución en la densidad de trazas en cortes de diferentes espesores obtenidos a partir de una muestra de ratón NUDE.

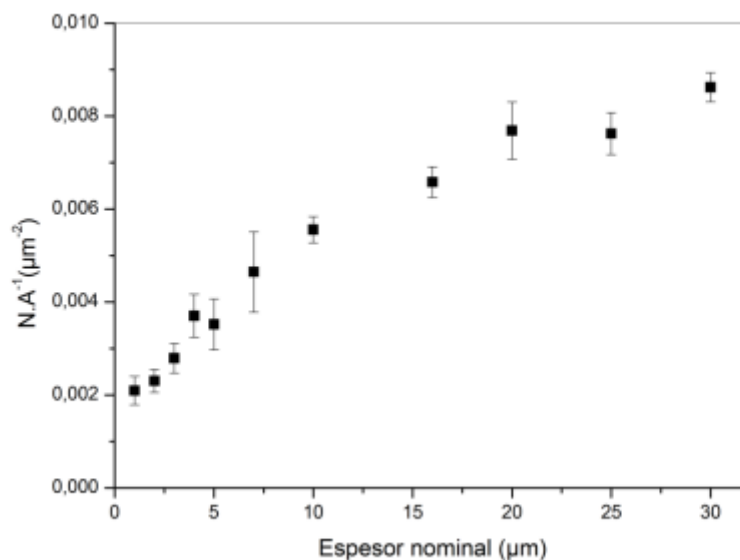


Figura 5. Variación de la densidad de trazas en función del espesor nominal de corte de una muestra de ratón NUDE para valores entre 1 μm y 30 μm .

Las diferencias en la densidad de trazas entre cortes de diferentes espesores alcanzan hasta un 80%. Si bien la desviación que acompaña a los valores más bajos de la curva es alto, se observa una clara diferencia entre los valores

medios de trazas provenientes de cortes cuya diferencia de espesor es sólo 1 μm . Este resultado es de gran relevancia, ya que confirma la posibilidad (y la necesidad) de realizar cortes delgados con gran precisión.

La metodología desarrollada en este laboratorio permite la utilización del mismo corte de tejido para la exploración histológica y el análisis autorradiográfico (Portu et al., 2013). La misma requiere que los cortes sean lo suficientemente delgados como para permitir la identificación de estructuras tisulares, es decir espesores no mayores que 30 μm . Dado que se observó que para cortes de espesor mayor o igual a 30 μm , la densidad de trazas se mantiene constante, éste sería el espesor mínimo para utilizar en este tipo de muestras.

A fin de realizar comparaciones entre muestras de diferentes animales, se normalizaron los valores de densidad de trazas al valor obtenido para 30 μm . En la Figura 6 se presenta la evolución de la densidad de trazas con los espesores del corte para hígados de 4 ratones NUDE distintos y 2 hámsters, observándose que este comportamiento es independiente de la muestra.

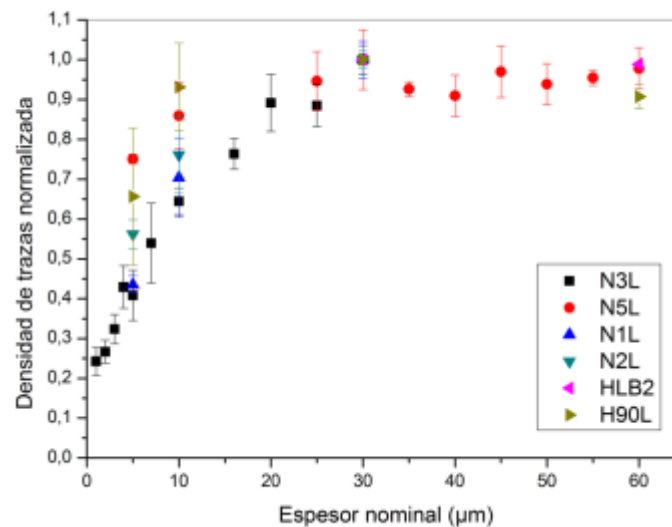


Figura 6. Normalización de la densidad de trazas para muestras provenientes de 4 ratones NUDE distintos y 2 hámsters en función del espesor nominal de corte, para valores entre 1 μm y 60 μm .

Corrigiendo los valores de espesores nominales con el factor de evaporación de la muestra, determinado por termogravimetría (0.31 para hígado) (Portu, 2012), las curvas experimentales pudieron compararse con las obtenidas computacionalmente a partir del modelo estocástico. En la Figura 7, se verifica que ambas coinciden dentro del error experimental.

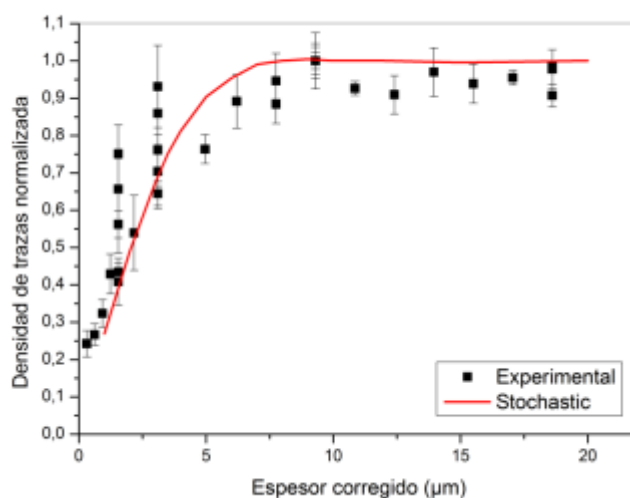


Figura 7. Comparación de la densidad de trazas obtenida experimentalmente con los valores obtenidos utilizando el modelo estocástico. La densidad de trazas se normalizó para incluir muestras de distintos animales. En esta comparación se muestran los espesores corregidos por el coeficiente de evaporación 0.31. Los espesores nominales de corte varían entre $1\mu\text{m}$ y $60\mu\text{m}$.

Como puede verse, se halló buen acuerdo entre las curvas de densidad de trazas en función del espesor del corte obtenidas con el modelo estocástico y las realizadas a partir de los valores experimentales.

Además, se verificó que con cortes de $30\mu\text{m}$ de espesor se obtienen resultados reproducibles y comparables entre diferentes muestras. Este espesor de corte es adecuado para realizar un análisis histológico aproximado en muestras montadas para un estudio autorradiográfico, que se complementa con la observación histológica detallada en cortes de $10\mu\text{m}$.

Presentaciones en reuniones científicas

Algunos de los resultados de este trabajo, bajo el título “Autorradiografía neutrónica de cortes histológicos con boro-10: variación de la densidad de trazas nucleares con el espesor” (Espector N. et al., 2014) fueron presentados en la XLI Reunión Anual de la AATN (Asociación Argentina de Tecnología Nuclear) en Diciembre de 2014. Se presentará también un póster en relación a este trabajo en la 8th Young Researchers Boron Neutron Capture Therapy Meeting (8YBNCT) en Pavia, Italia en Septiembre de 2015.

Conclusión general

Según se ha descrito en los párrafos anteriores, se completó el entrenamiento en una gran parte de las técnicas y metodologías propuestas en el plan de trabajo. Se logró la aplicación de los conocimientos adquiridos a la investigación de un problema concreto, obteniéndose resultados

experimentales que fueron contrastados exitosamente con un modelo que había sido desarrollado previamente.

Trabajo propuesto para el período de prórroga

A partir de este trabajo, se determinó la importancia de establecer un método de medición en el laboratorio para estudiar la dinámica de la evaporación de tejidos con el objeto de determinar los Coeficientes de Evaporación (CEv), a ser utilizados en cada tejido para la cuantificación de boro utilizando la técnica de autorradiografía. Si bien se cuenta con algunos valores preliminares medidos por termogravimetría, la geometría de los cortes podría influir en el proceso de medición, por lo que se requiere buscar un método en el que las condiciones de montaje del corte sean idénticas a las del proceso de autorradiografía.

Se propone, con los nuevos materiales y equipos, continuar con las mediciones de la evaporación de distintos tejidos de manera de poder determinar los CEv correspondientes.

Bibliografía

- Armijo, J. S., Rosenbaum, H. S., 1967. Boron detection in metals by alpha-particle tracking. *J Appl. Phys.* 38:2064-2069.
- Barth, R.F., Vicente, M.G., Harling, O.K., Kiger, W.S. 3rd, Riley, K.J., Binns, P.J., Wagner, F.M., Suzuki, M., Aihara, T., Kato, I., Kawabata, S., 2012. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol.* 7:146.
- Coderre, J.A., Turcotte, J.C., Riley, K.J., Binns, P.J., Harling, O.K., Kiger WS., 2003. Boron Neutron Capture Therapy: cellular targeting of high linear energy transfer radiation. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2(5):355-375.
- Durrani, S.A. and Bull, R.K., 1987. *Solid State Nuclear Track Detection. Principles, methods and applications.* International Series in Natural Philosophy (Ed. D. ter Haar), Pergamon Press, Oxford.
- Espector N., Portu A., Saint Martin G., 2014. Autorradiografía neutrónica de cortes histológicos con boro-10: variación de la densidad de trazas nucleares con el espesor. XLI Reunión Anual de la AATN. 1-5 de Diciembre, 2014. Buenos Aires, Argentina.
- Gadan, M.A., Bortolussi, S., Postuma, I., Ballarini, F., Bruschi, P., Protti, N, Santoro, D., Stella, S., Cansolino, L., Clerici, A., Ferrari, C., Zonta, A., Zonta, C., Altieri, S., 2012. Set-up and calibration of a method to measure ^{10}B concentration in biological samples by neutron autoradiography. *Nucl. Inst. Meth. B* 274:51-56.
- Moss, R.L., 2014. Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Appl Radiat Isot.* 88:2-11.

- Portu, A., Carpano, M., Dagrosa, A., Nievas, S., Pozzi, E., Thorp, S., Cabrini, R.L., Liberman, S., Saint Martin, G., 2011a. Reference systems for the determination of ^{10}B through autoradiography images: Application to a melanoma experimental model. *Appl. Radiat. Isot.* 69:1698-1701.
- Portu, A., Bernaola, O.A., Nievas, S., Liberman, S., Saint Martin, G., 2011b. Measurement of ^{10}B concentration through autoradiography images in polycarbonate nuclear track detectors. *Rad. Meas.* 46:1154-1159.
- Portu, A., 2012. Autorradiografía Neutrónica para Determinar la Distribución Espacial Cuantitativa de ^{10}B . Desarrollo y Aplicación a la Terapia por Captura Neutrónica. Tesis de Doctorado en Ciencia y Tecnología, Mención Química. UNSAM
- 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.
- Saint Martin, G., Portu, A., Santa Cruz, G.A., Bernaola, O.A., 2011. Stochastic simulation of track density in nuclear track detectors for ^{10}B measurements in autoradiography. *Nucl. Instr. Meth. Phys. B* 269:2781-2785.



Natalia M. Espector