

PUEDE APLICARSE LA DISTRIBUCION DE POISSON PARA CELULAS CLONOGENICAS TUMORALES SOMETIDAS A TRATAMIENTOS DE RADIACION FRACCIONADA?

CAN THE POISSON DISTRIBUTION FOR TUMUOR CLONOGENIC CELLS UNDER FRACTIONATED IRRADIATION TREATMENTS BE APPLIED?

J. A. Horas, O. R. Olgún, M.G. Rizzotto

IMASL – Instituto de Matemática Aplicada San Luis
Departamento de Física
Universidad Nacional de San Luis – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Ejército de los Andes 950, (5700) San Luis - Argentina
e-mail: jhoras@unsl.edu.ar

Se trata de responder bajo qué condiciones se cumple la convergencia a la distribución de Poisson, para células tumorales sometidas a tratamientos radiobiológicos fraccionados, utilizando varias formas de administración de la dosis. Para ello también se comparan modelos que dan la probabilidad de control tumoral (TCP) usando datos experimentales obtenidos de la bibliografía. Se usan dos líneas celulares que crecen como megacolonias *in vitro*, las cuales son irradiadas con diversos esquemas de fraccionamiento: convencional y acelerado. Se concluye sobre las hipótesis fundamentales de los modelos utilizados y se obtiene información sobre los parámetros de cada modelo y la validez de los procesos que involucran. Se estudian, entre otros, la recuperación celular total o parcial, el efecto de la resensitización y de la repoblación celular producidos entre fracciones en ambos tipos de fraccionamiento. Se consideran los límites generalmente utilizados en mediciones de fracción de supervivencia y se analiza la validez de la aproximación de Poisson en cada caso.

We try to answer under which conditions for tumor cells under fractionated radiobiological treatments, the convergence to Poisson distribution is valid, using different protocols of dose administration. We also compare tumor control probability models (TCP) using experimental data obtained from bibliography. Two cellular lines growing as megacolonies *in vitro* are used which are irradiated with different fractionation schemes: conventional and accelerated. We conclude about the fundamental hypothesis of the used models and obtain information about the parameters of each model and the validity of the involved processes. Total or partial cellular recovery is studied in other two cases, as well as the effect of resensitization and the cellular repopulation between fractions in both types of fractionation schemes. We consider the limits generally used in measurements of surviving fraction and analyze the validity of Poisson approximation for each case.

I. INTRODUCCION

En tratamientos radiobiológicos prolongados existe el problema de cómo es la distribución de probabilidad de las células clonogénicas en un tumor. Concretamente, se trata de establecer si la aproximación de Poisson es aplicable o no, teniendo en cuenta que las células clonogénicas del tumor pueden reproducirse en el tiempo que media entre fracciones de irradiación.

Desde el punto de vista teórico el problema fue rigurosamente examinado por Hanin *et al.*, 2001⁽¹⁾, pero desde el punto de vista práctico u operativo no podemos descartar los modelos Poissonianos.

En este trabajo se ajustan tres modelos y se comparan sus resultados, dos de ellos usan la estadística de Poisson, mientras que el tercero, denominado de tipo "nacimiento y muerte", no la usa. Para realizar los ajustes antes mencionados, se utilizan datos experimentales provenientes de Tarnawsky *et al.*, 2003⁽²⁾, que determina la TCP para megacolonias de dos líneas celulares: *murine squamous cell carcinoma* (AT478) y *human adenocarcinoma* (A549), que se hacen crecer como megacolonias epiteliales *in vitro*. Una característica muy interesante de este conjunto de datos, es que dichas

megacolonias son irradiadas tanto en dosis única como fraccionadas en dos esquemas: irradiación convencional (CONV: cinco días con irradiación y dos sin ella) e irradiación acelerada (CAIR: irradiación todos los días). Esto las hace especialmente indicadas para el estudio que aquí se propone.

El carácter Poissoniano de TCP tiene algunas bien conocidas fallas⁽³⁾, en especial referido a tratamientos prolongados⁽⁴⁾, en tumores que continúan proliferando. Sin embargo, Hanin *et al.*, 2001⁽¹⁾ mostraron que la distribución del número de clonógenos sobrevivientes ya no es una distribución binomial, aunque converge a ella, siendo la distribución de Poisson una buena aproximación bajo ciertas condiciones límites que son generalmente válidas en la práctica.

Se pretende contribuir a la discusión planteada sobre lo correcto: ajustar los datos experimentales con un tipo (P) u otro (No-P) de modelos, e intentaremos también, determinar si existe dependencia de la tasa de repoblación entre diferentes tratamientos prolongados, i.e. CONV y CAIR.

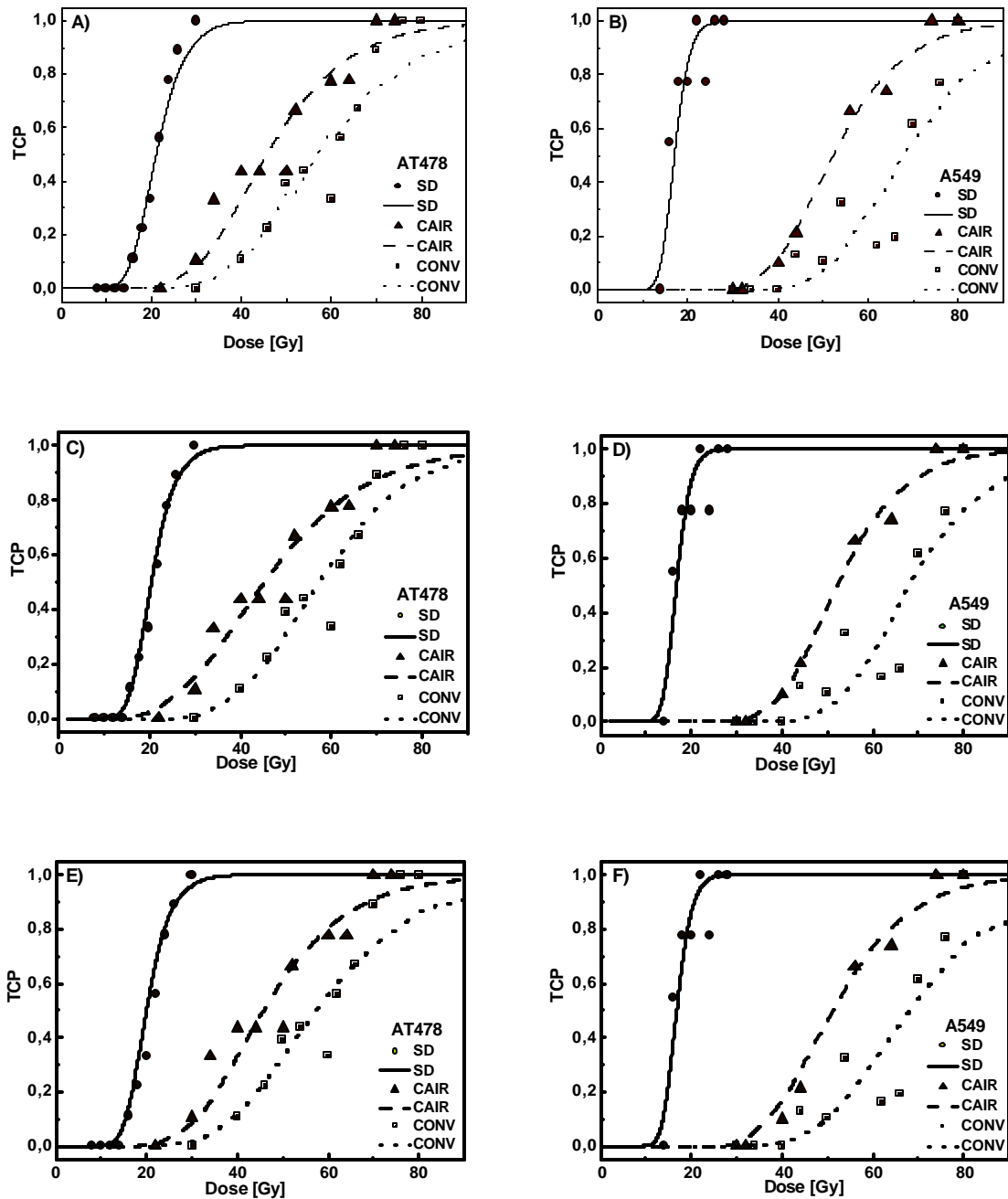


Figure 1. Resultados de ajustes (líneas). Los símbolos representan valores experimentales. Se indican también los protocolos de aplicación de las dosis. A) y B) Poissoniano con modelo LQ clásico [Ec. (1)]. C) y D) Poissoniano con modelo LQ extendido [Ec. (2)]. E) y F) Modelo no Poissoniano tipo "nacimiento y muerte" [Ec. (3)]. En cada caso se muestran también los parámetros y medidas de la bondad de los ajustes en las Tablas 1, 2 y 3.

Table 1: *Modelo Poissoniano con LQ clásico [Ec. (1)]. Parámetros de regresión y bondad de ajuste.*

Parámetro	Estimación	SE	Intervalo de confianza del 95%
AT478			
$K=\ln(N)$	3.5018	0.3728	2.7382, 4.2653
α [Gy^{-1}]	0.1230	0.0283	0.0651, 0.1809
β [Gy^{-2}]	0.0056	0.0127	-0.0205, 0.0317
λ [día^{-1}] (SD) fijo	0	-----	-----
λ [día^{-1}] (CAIR)	0.0989	0.0150	0.0681, 0.1296
λ [día^{-1}] (CONV)	0.0980	0.0124	0.0726, 0.1233
Chi ² /DoF= 0.0090, SSR=0.2515			
A549			
$K=\ln(N)$	4.9000	0.8037	3.2333, 6.5667
α [Gy^{-1}]	0.1202	0.1287	-0.1468, 0.3871
β [Gy^{-2}]	0.0200	0.0648	-0.1144, 0.1544
λ [día^{-1}] (SD) fijo	0	-----	-----
λ [día^{-1}] (CAIR)	0.1169	0.0258	0.0634, 0.1704
λ [día^{-1}] (CONV)	0.1210	0.0221	0.0753, 0.1668
Chi ² /DoF= 0.0151, SSR=0.3302			

Table 2: *Modelo Poissoniano con LQ extendido [Ec. (2)]. Parámetros de regresión y bondad de ajuste.*

Parámetro	Estimación	SE	Intervalo de confianza del 95%
A T478			
$K=\ln(N)$	2.8608	0.4206	1.9908, 3.7309
α [Gy^{-1}]	0.1315	0.0125	0.1057, 0.1573
β [Gy^{-2}]	0.0264	0.0060	0.0140, 0.0388
τ_R [día]	0.8862	5.1217E-4	0.8851, 0.8873
$(1/2)\sigma^2$ [Gy^{-2}]	0.5965	0.3954	-0.2215, 1.4145
τ_S [día] (SD)	6.5602E-4	4.0941E-4	-1.9091E-4, 0.0015
τ_S [día] (CAIR)	0.0019	0.0015	-0.0012, 0.0051
τ_S [día] (CONV)	0.4095	0.3095	-0.2308, 1.0497
λ [día^{-1}] (SD) fijo	0	-----	-----
λ [día^{-1}] (CAIR)	0.1277	0.0224	0.0814, 0.1741
λ [día^{-1}] (CONV)	0.0772	0.0205	0.0348, 0.1196
Chi ² /DoF= 0.0089, SSR= 0.2036			
A549			
$K=\ln(N)$	4.4885	1.1981	1.9608, 7.0162
α [Gy^{-1}]	0.1447	0.0283	0.0849, 0.2044
β [Gy^{-2}]	0.0407	0.0331	-0.0292, 0.1105
τ_R [día]	0.0166	0.0157	-0.0165, 0.0496
$(1/2)\sigma^2$ [Gy^{-2}]	1.1833	0.6480	-0.1838, 2.5504
τ_S [día] (SD)	1.6518E-4	1.5766E-4	-1.6744E-4, 4.9780E-4
τ_S [día] (CAIR)	0.0862	0.1467	-0.2234, 0.3957
τ_S [día] (CONV)	0.1370	0.0961	-0.0657, 0.3397
λ [día^{-1}] (SD) fijo	0	-----	-----
λ [día^{-1}] (CAIR)	0.0702	0.0820	-0.1027, 0.2431
λ [día^{-1}] (CONV)	0.0871	0.0403	0.0020, 0.1722
Chi ² /DoF= 0.0181, SSR= 0.3075			

Table 3: Modelo no Poissoniano tipo “nacimiento y muerte” [Ec. (3)]. Parámetros de regresión y bondad de ajuste.

Parámetro	Estimación	SE	Intervalo de confianza del 95%
A T478			
N	56.6283	17.4662	20.8503, 92.4063
α	0.1190	0.0157	0.0869, 0.1512
β	0.0227	0.0044	0.0137, 0.0317
λ (SD) fijo	0	-----	-----
λ (CAIR)	0.1654	0.0144	0.1948, 0.1360
λ (CONV)	0.1426	0.0133	0.1658, 0.1195
Chi ² /DoF= 0.0102, SSR= 0.2854			
A549			
N	127.9672	43.0256	38.7376, 217.1968
α	0.1381	0.0091	0.1193, 0.1569
β	0.0121	0.0015	0.0091, 0.0152
λ (SD) fijo	0	-----	-----
λ (CAIR)	0.1401	0.0131	0.1128, 0.1673
λ (CONV)	0.1368	0.0086	0.1190, 0.1546
Chi ² /DoF= 0.0149, SSR= 0.3280			

II. MODELOS Y METODOS

El primer modelo⁽²⁾ a comparar utiliza el modelo lineal cuadrático (LQ) en su expresión “clásica” y responde a la estadística de Poisson. Su expresión está dada en (1):

$$(1) \quad TCP = \exp(-\exp(K - \mathbf{a} * D - \mathbf{b} * D * df_x + I * T))$$

donde TCP es la probabilidad de control tumoral, $K = \ln(N)$, N el número inicial de células clonogénicas, \mathbf{a} y \mathbf{b} son parámetros de radiosensibilidad, D es la dosis total aplicada y df_x es la dosis por fracción (medidas en grays), I es el parámetro de repoblación o crecimiento del tumor y T es la duración del tratamiento en días.

El segundo modelo⁽⁵⁾ a comparar utiliza el modelo LQ ahora en una expresión “extendida”, que intenta considerar las cuatro R's de la radiobiología y también responde a la estadística de Poisson. Su expresión está dada en (2):

$$(2) \quad TCP = \exp(-\exp(K - \mathbf{a}D - \mathbf{b}G(t_R)Ddf_x + \left(\frac{1}{2}S^2\right)G(t_S)Ddf_x + IT))$$

con

$$G(t_R) = 2\left(\frac{t_R}{T}\right)^2 \left(\exp(-T/t_R) - 1\right) + 2\frac{t_R}{T},$$

$$G(t_S) = 2\left(\frac{t_S}{T}\right)^2 \left(\exp(-T/t_S) - 1\right) + 2\frac{t_S}{T},$$

Donde las magnitudes K , \mathbf{a} , \mathbf{b} , D , df_x y T son las mismas que antes y se agregan t_R que es el tiempo de reparación (1° R) y t_S que es el tiempo de resentización, el cual contempla tanto la redistribución como la reoxigenación (2° y el 3° R). Por último, I es el parámetro de Repoblación (4° R).

El tercer modelo⁽⁶⁾ a comparar utiliza el modelo LQ en su expresión “clásica”, y es de carácter no Poissoniano, conocido como del tipo “nacimiento y muerte”. Si se considera la recuperación total, como es de común uso, el modelo tiene cuatro parámetros y responde a lo siguiente (3)

$$(3) \quad TCP = \{1 - G(D, T) / [1 - (1 - \exp I)(G(D, T) - G(2, 1)) / (G(2, 1) - 1)]\}^N$$

Donde

$$G(D, T) = \exp(-\mathbf{a}D - \mathbf{b} \cdot df_x \cdot D + I \cdot T)$$

Aquí las magnitudes N , \mathbf{a} , \mathbf{b} , D , df_x y T son las mismas que antes.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 (A, B, C, D, E y F) se muestra TCP versus la dosis administrada para los tres conjuntos de datos (dosis única, y con los dos esquemas de fraccionamiento) para las líneas celulares AT478 y A549, para los tres modelos presentados. Hemos hecho un ajuste simultáneo de los tres conjuntos de datos para cada línea celular. En cada caso la curva para dosis única refleja la curva teórica para tratamientos fraccionados sin proliferación, puesto que la dosis física ha sido convertida a una dosis de fraccionamiento standard de 2 Gy.

En las tablas 1 a 3 mostramos la estimación de los parámetros para los 3 modelos usados para cada línea celular, incluyendo también el intervalo de confianza y otros indicadores de la bondad de ajuste. En todas las tablas, DoF significa los grados de libertad del ajuste, y SSR la suma de cuadrados de la diferencia entre los datos y la bondad de ajuste. También indicamos si los parámetros son compartidos o no, mostrando en este último caso el correspondiente protocolo de irradiación.

El primer modelo⁽²⁾ presenta un ajuste aceptable, como se muestra en la Fig. 1A) y B). Los valores de β son un poco bajos en una de las líneas celulares. La tasa de repoblación, según puede verse en la Tabla 1, se muestra insensible al protocolo de aplicación de la dosis en este modelo.

El segundo modelo⁽⁵⁾ muestra una similar performance, según se aprecia en la Fig. 1C) y D) pero tiene siete parámetros a ajustar, y alguno de ellos presenta anomalías, según puede verse en la Tabla 2. También puede concluirse que en este modelo la tasa de repoblación no es sensible al protocolo de aplicación de la dosis.

El otro parámetro no compartido t_s , que es el tiempo de resensitización, está relacionado con los fenómenos de redistribución y reoxigenación, y toma pequeños valores, excepto para la irradiación convencional en ambas líneas celulares.

El tercer modelo⁽⁶⁾ da buenos ajustes, según se muestra en la Fig. 1E) y F). Es importante mencionar que en todos los casos los parámetros radiobiológicos muestran los valores usuales. También se observa que en este modelo la tasa de repoblación no es sensible al protocolo de aplicación de la dosis.

IV. CONCLUSIONES

Considerando que el resultado de los ajustes es similar y el número de parámetros (complejidad) es menor, es claro que el modelo no Poissoniano con cuatro parámetros es preferible al modelo Poissoniano de siete parámetros.

Comparando ahora los resultados de ajuste entre modelos con el mismo número de parámetros, puede concluirse que ambos modelos tanto Poissonianos como no Poissonianos, son aceptables. Esto es así, puesto que por aplicación del Teorema de Poisson, Hanin et al., 2001⁽¹⁾, concluyeron que en el límite, la distribución de células clonogénicas converge a la distribución de Poisson. Este límite se cumple en nuestro caso, dado que la fracción de sobrevivencia es muy pequeña y el número inicial de células clonogénicas es muy grande.

En consecuencia, para ajustar datos de TCP pueden usarse ambos tipos de modelos, siempre que el límite mencionado sea válido. Este es normalmente el caso en las medidas de fracción de sobrevivencia.

Refiriéndonos a la existencia de diferencias significativas en la tasa de repoblación entre ambos tipos de tratamiento prolongado, no es posible establecer estadísticamente una conclusión definitiva. A pesar de ello, nuestros resultados pueden ser tomados en el sentido de que no existen diferencias significativas en la tasa de repoblación. Esto último es coincidente con lo obtenido por Tarnawski et al., 2003, utilizando otra metodología de ajuste.

REFERENCIAS

1. L. G. Hanin, M. Zaider and A. Y. Yakovlev. 2001. Distribution of the number of clonogens surviving fractionated radiotherapy: a long-standing problem revisited. *Int. J. Radiat. Biol.* 77 205-13.

2. Rafal Tarnawski, María Widel and Krzysztof Skladowski. Tumor cell repopulation during conventional and accelerated radiotherapy in the *in vitro* megacolony culture. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **55** (4), 1074-1081 (2003).
3. S. L. Tucker, H. D. Thames and J. M. G. Taylor. How well is the probability of tumor cure after fractionated-irradiation described by Poisson statistics. *Radiat. Res.* Vol. **124** 273-82 (1990).
4. P. Stavrev, M. Weldon, B. Warkentin, N. Stavreva and B. B. Fallone. Radiation damage, repopulation and cell recovery analysis of *in vitro* tumor cell megacolony culture data using a non-Poissonian cell repopulation TCP model. *Phys. Med. Biol.* **50**, 3053-3061 (2005).
5. David J. Brenner, Lynn R. Hlatky, Phylip J. Hahnfeldt, Eric J. Hall and Rainer K. Sachs. A convenient extension of the linear quadratic model to include redistribution and reoxygenation. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. **32** (2), 379-390 (1995).
6. M. Zaider and G. N. Minerbo. Tumor control probability: a formulation applicable to any temporal protocol of dose delivery. *Phys. Med. Biol.* **45**, 279-293 (2000).