

CELULAS CLONOGENICAS Y PROBABILIDAD DE CURA TUMORAL (TCP). CLONOGENIC CELLS AND TUMOR CONTROL PROBABILITY (TCP)

J. A. Horas^(1,2), O. R. Olguín⁽¹⁾, M. G. Rizzotto⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Física, Universidad Nacional de San Luis
Instituto de Matemática Aplicada San Luis (IMASL)

Ejército de los Andes 950, (5700) San Luis - Argentina

⁽²⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
e-mail: jhoras@unsl.edu.ar

Se considera la heterogeneidad de la población celular de un tumor cancerígeno. Tal heterogeneidad se manifiesta claramente en su respuesta a la radiación, produciendo que la radiocurabilidad esté determinada por las células más resistentes. Para evaluar la probabilidad de cura tumoral es determinante encontrar el correcto número de células clonogénicas, que también acusan heterogeneidad, la cual es modelada utilizando la estadística de Poisson con modelos de dos compartimientos. Se analiza también otro tipo de modelos para obtener la probabilidad de cura tumoral. En todos los casos el objetivo es determinar el correcto número de células clonogénicas, o sea, aquellas capaces de reproducir el tumor. También se considera el estado de oxigenación en el que se encuentran. Los resultados se comparan con datos experimentales de esferoides celulares de diversos tamaños. Estos sistemas *in vitro* son muy usados como sistema modelo en radioterapia. Palabras claves: probabilidad de control tumoral, células clonogénicas, hipoxia.

The cellular population heterogeneity of a cancer tumor is considered. This heterogeneity is clearly evidenced from radiation response, so the radiocurability is determined by the more resistant cells. In order to evaluate the tumor control probability (TCP) is fundamental to find the correct number of clonogenic cells, which exhibit heterogeneity too, this last being modeled using Poisson statistics with two compartment models. In order to obtain the TCP other models are studied. In every studied situation the aim is to determine the correct number of clonogenic cells, that is, those able to reproduce the tumor. The oxygenation level is also considered. The results are compared with experimental data of cellular spheroids of different sizes. These systems *in vitro* are very used as model systems in radiotherapy.

Keywords: tumor control probability, clonogenic cells, hypoxia.

I. INTRODUCCION

El principal objetivo de este trabajo es la determinación del número total de células clonogénicas, o sea aquellas capaces de regenerar el tumor. Se utiliza para esto un modelo de dos compartimientos para la probabilidad de control tumoral (TCP). El modelo contempla las células clonogénicas altamente sensibles a la radiación y aquellas muy resistentes a la misma. El nivel de oxigenación se considera como la principal causa de esta variación en la radiosensibilidad. En particular las células altamente sensibles están completamente oxigenadas y aquellas resistentes se encuentran en estado hipóxico. La importancia del efecto oxígeno en radioterapia es bien conocida desde hace más de 50 años, cuando se describió que la irradiación en condiciones de hipoxia o anoxia aumentaba la radiorresistencia en un factor de 3.

La TCP se define como la probabilidad de no tener ninguna célula clonogénica sobreviviendo en el tumor al final de la radioterapia [1]. Suponiendo que la fracción de sobrevivencia para cada célula clonogénica es suficientemente pequeña y que el número inicial de células clonogénicas es grande, es posible aplicar la estadística de Poisson. Esta es especialmente indicada en nuestro caso, dado que por las características experimentales no existe repoblación entre dosis.

Nos concentramos en tumores heterogéneos [2]. Estos se caracterizan por la respuesta a la radiación de su población celular, produciendo que la radiocurabilidad

del tumor esté determinada por las células más resistentes. Es sabido que en un tumor existen numerosas fuentes de heterogeneidad, contándose entre las más importantes la hipoxia celular, la progresión a través del ciclo celular, heterogeneidades intrínsecas en la población celular del tumor e inhomogeneidades en la distribución espacial de la dosis de radiación. En este trabajo consideramos a la hipoxia celular como una de las principales fuentes de heterogeneidad.

Cualquier estudio sobre el efecto de la radiación en los tumores incluye dos definiciones básicas y sus correspondientes medidas: la fracción de sobrevivencia (SF) y la TCP. Ambas han sido ya estudiadas en contribuciones anteriores [2,3]; en este trabajo profundizaremos en el uso del modelo de dos compartimientos, determinando el número de células clonogénicas existentes en cada uno de ellos. Mostraremos la importancia que adquiere un pequeño número de células clonogénicas radiorresistentes o hipóxicas.

Está establecido que los esferoides celulares son un sistema modelo en radioterapia [4]. Usaremos datos experimentales provenientes de ellos para contrastar los resultados de nuestro modelo, en particular utilizaremos determinaciones que fueron realizadas sobre esferoides de tamaño creciente, correspondientes a una línea celular de adenocarcinoma de colon humano con radios que van desde $r=50$ micrones hasta 600 micrones [5].

II. METODOS

La TCP tiene una expresión simple, puesto que como es nuestro caso, no existe repoblación entre dosis y puede suponerse la aplicabilidad de la estadística de Poisson [1,6,7].

Esta puede generalizarse para el caso en que haya más de un compartimiento con células clonogénicas y está dada por

$$(1) \quad TCP_i = \exp\left(-\sum_i N_i SF_i\right)$$

Donde $i = 1, 2, 3, \dots, n$ representa los diversos compartimientos. N_i expresa el número inicial de células clonogénicas pertenecientes a cada compartimiento. SF_i es la fracción de supervivencia de cada uno de los grupos mencionados anteriormente [2]. El modelo más aceptado durante los últimos quince años para la fracción de supervivencia, es el denominado lineal cuadrático (LQ). Este modelo presupone que la célula muere como consecuencia de dos posibilidades: 1) que el daño celular sea irreparable, 2) que se produzca un daño reparable por la misma célula. La curva de supervivencia está determinada por dos componentes: una linealmente proporcional a la dosis de radiación (daño letal), y la otra proporcional al cuadrado de la dosis (daño subletal). Según este modelo la fracción de supervivencia está dada por

$$(2) \quad SF_i = f_i \exp\left(-a_{eff}^i D - b_{eff}^i D^2\right)$$

$i = 1, 2, 3, \dots, n$

Aquí D es la radiación recibida en una única dosis y f_i corresponde a la fracción de células pertenecientes a cada compartimiento. En los parámetros del modelo LQ el supraíndice indica el compartimiento de que se trate y el subíndice eff indica el promedio de dichos parámetros. Este último fue realizado según el procedimiento descrito en [2].

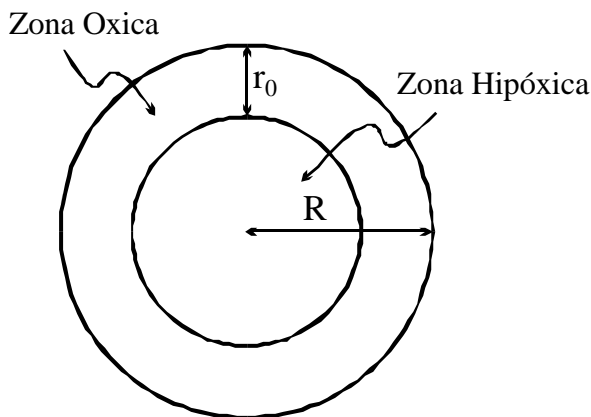


Figura 1

Esquema de un esferoide.

Para utilizar la expresión general ec. (1) en el caso que nos ocupa, solo nos resta definir

a) *geometría del tumor*: En la fig. 1 se muestra un tumor esférico idealizado, consistente de un carozo hipóxico y de un anillo o capa exterior óxica. El tamaño del tumor está definido por su radio R . La

cantidad r_0 define el espesor de la región óxica. La zona interna, de radio $R - r_0$, al estar alejada de la superficie del tumor y de los nutrientes, es la región hipóxica con células crecientemente radioresistentes. Cerca del centro del tumor puede haber también células que se encuentran en estado anóxico. El modelo es una caricatura muy simplificada de un tumor sólido *in vivo* no vascularizado. Sin embargo, la descripción global de la hipoxia es gruesamente correcta.

b) *expresión de TCP para dos compartimientos*: En acuerdo a lo mostrado en la fig. 1, la expresión general incluye solo dos sumandos correspondientes a las fracciones óxica e hipóxica respectivamente.

$$(3) \quad TCP = \exp\left[-N_{ox} f_{ox} \exp\left(-a_{eff}^{ox} D - b_{eff}^{ox} D^2\right) - N_h (1 - f_{ox}) \exp\left(-a_{eff}^h D - b_{eff}^h D^2\right)\right] = TCP_{ox} TCP_{hipox}$$

Tabla 1

Parámetros para el modelo LQ de supervivencia utilizado en las gráficas.

R[μm]	a_{eff}^{ox}	b_{eff}^{ox}	a_{eff}^h	b_{eff}^h
250	0.420	0.030	0.377	0.005
375	0.298	0.019	0.279	0.004
500	0.232	0.080	0.220	0.003
600	0.196	0.018	0.188	0.003

III. RESULTADOS

La ec. (3) para TCP contiene 7 parámetros, que deben ser determinados para hacerla operativa. Ellos son: el número de células clonogénicas en cada compartimiento (N_{ox} y N_h), la fracción óxica (f_{ox}) y los parámetros a_{eff}^i , b_{eff}^i , con $i = ox, h$, del modelo LQ. Para estimar estos parámetros de radiosensibilidad usamos el procedimiento ya descrito y los valores obtenidos en presentaciones anteriores [3] y que se muestran en la tabla 1. Solo resta entonces determinar 3 parámetros:

a) *número de células clonogénicas* N_{ox} y N_h : para determinar el número de células clonogénicas en el compartimiento oxigenado, suponemos, en acuerdo a Brenner [7] que

$$(4) \quad N_{ox} = r V_{ox}$$

Donde r es la densidad de células clonogénicas, que se supone constante y V_{ox} es el volumen del anillo o capa exterior oxigenada. En la fig. 2 se muestra la determinación experimental de la densidad de células clonogénicas con respecto al tamaño del esferoide, explicitando el error que la afecta. Considerando el error experimental, es posible suponer en primera aproximación, que la densidad de células clonogénicas es constante respecto del tamaño del esferoide.

Para determinar el número de células clonogénicas en el compartimiento hipóxico, dado que intentamos evitar la obtención de parámetros ajustables, nos aprovechamos de la existencia de un punto de corte en la

gráfica de TCP versus dosis. Este punto es tal que la parte óxica (TCP_{ox}) y la correspondiente a las células en estado hipóxico (TCP_{hipox}) son iguales. Concretamente, existe una dosis de radiación (D_{eq}) para la cual $TCP(D_{eq})_{ox} = TCP(D_{eq})_{hipox}$. En acuerdo a ello,

$$(5) \quad N_h = \frac{rV_{ox}f_{ox} \exp(-a_{ox}D_{eq} - b_{ox}D_{eq}^2)}{(1-f_{ox}) \exp(-a_h D_{eq} - b_h D_{eq}^2)}$$

La única condición sobre D_{eq} es que la igualdad entre ambas probabilidades de control tumoral, se realice a la menor dosis biológicamente posible.

b) *fracción óxica* f_{ox} : en nuestro esferoide es

$$(6) \quad f_{ox} = \frac{\text{Volumen de la zona óxica}}{\text{Volumen total del esferoide}}$$

Tabla 2

Número de células clonogénicas por compartimiento.

R[mm]	Vox[mm ³]	Nox	Nh	Nox + Nh	Nexp.
250	3.19e+7	7240	100	7.3e+3	2.7e+4 ± 7.3e+3
375	7.71e+7	17500	80	1.8e+4	9.1e+4 ± 5.4e+4
500	1.42e+8	32200	32	3.2e+4	9.5e+4 ± 3.9e+4
600	2.08e+8	47200	1	4.7e+4	1.6e+5 ± 6.5e+4

En la Tabla 2 se muestran el número de células clonogénicas obtenidas según nuestro modelo, utilizando las ecuaciones 4 y 5, y también su determinación experimental obtenida mediante conteo por *plating*, o sea que los esferoides han sido desagregados para efectuar tal conteo. Esto produce obviamente una importante diferencia entre dichos valores experimentales y aquellos obtenidos por nosotros, sin embargo los consideramos aceptables dado la importante incerteza experimental y fundamentalmente por la diferencia en el método de conteo.

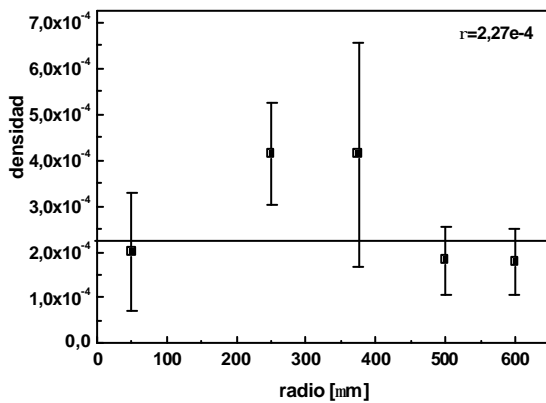


Figura 2

Densidad de células clonogénicas obtenidas por plating versus el radio del esferoide.

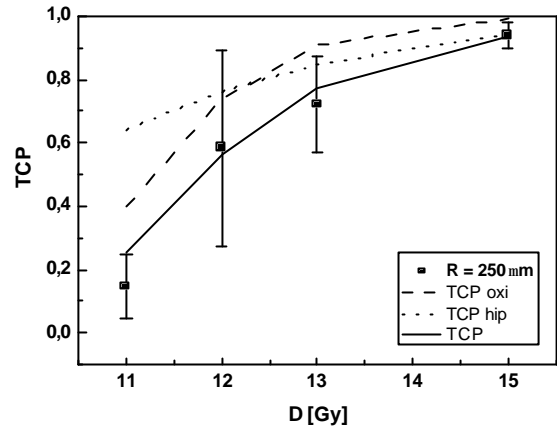


Figura 3

TCP vs. Dosis. Para el esferoide del radio 250mm. Los puntos son los valores experimentales y las barras expresan el error, la línea llena representa el cálculo con nuestro modelo.

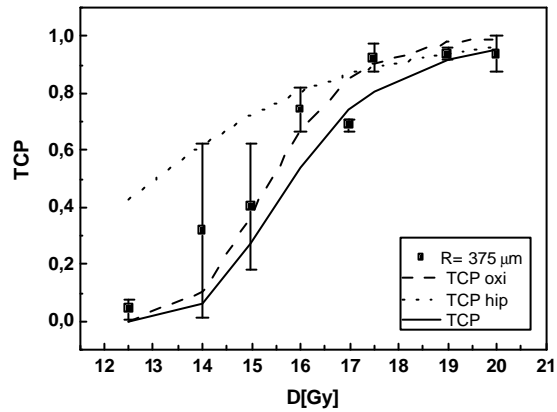


Figura 4

Idem a la figura anterior para el esferoide de radio 375mm.

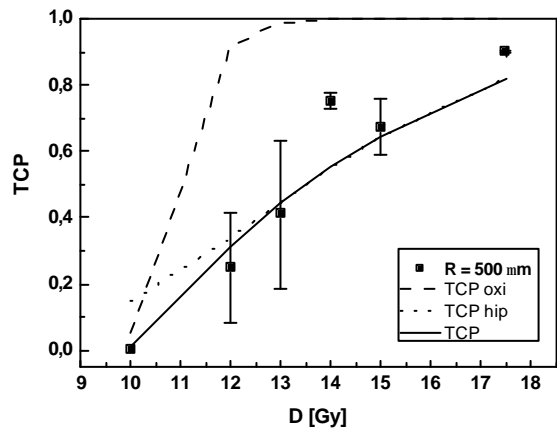


Figura 5

Idem a la figura anterior para el esferoide de radio 500mm.

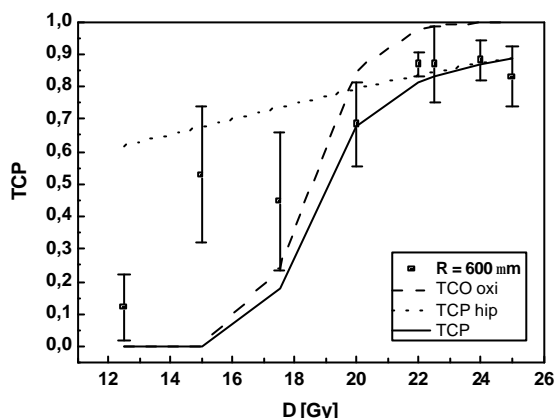


Figura 6

Idem a la figura anterior para el esferoide de radio 600nm.

Para calcular las células clonógenicas en el compartimiento óxico (N_{ox}) utilizamos la ec. 4 con el valor constante $2.27 \cdot 10^{-4}$ (cells/ μm^3), este valor se supone constante acordemente con lo ya expresado.

Debemos mencionar la existencia de células hipóxicas siempre en un pequeño número. Esto es aceptable pues dichas células radiorresistentes manifiestan su efecto aún cuando sean escasas, tanto que determinan la forma de TCP especialmente cuando la dosis de radiación crece. Ello se muestra en las figs. 3, 4, 5 y 6, donde el resultado de nuestro modelo de TCP es dado para esferoide de radio creciente. También puede verse la contribución del compartimiento óxico. Se observa que en dichas figuras la coincidencia en general es buena.

IV. DISCUSIÓN

De acuerdo a lo expresado anteriormente hemos obtenido los siete parámetros necesarios, sin recurrir a ajustes sobre los datos experimentales. Puede evaluarse que la coincidencia en general es buena, considerando la inexistencia de parámetros libres.

La disminución del número de células clonógenicas en el compartimiento hipóxico, al crecer el radio del esferoide puede deberse a la aparición de *anoxia* [5], por lo que las células hipóxicas restantes son muy radiorresistentes. Esto está de acuerdo con lo ya expresado en la introducción, sobre el aumento de la radiorresistencia hasta un factor de 3, ante la reducción de la alimentación de oxígeno. En nuestros esferoide esta limitación se produce al aumentar la distancia a que debe difundir el oxígeno desde la superficie del esferoide, por lo que es lógico suponer que en el interior de los mayores esferoide aparece efectivamente anoxia, pudiendo desarrollarse así un núcleo necrótico. Es natural entonces suponer que las células que rodean a este núcleo necrótico y permanecen vivas, son crecientemente radiorresistentes.

V. CONCLUSIONES

Este trabajo permite concluir que:

- el uso del modelo de dos compartimientos y la aplicación de la estadística de Poisson muestran resultados aceptables para esferoide de radios crecientes,
- los resultados que se muestran se obtienen sin parámetros ajustables,
- se obtiene un valor razonable de $N_{calculado}$.
- para cada tamaño de esferoide se muestra explícitamente la forma y valor de TCP óxico e hipóxico respectivamente

VI. REFERENCIAS

- Yaes R. J.; Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., **14**, 147-157 (1988).
- Horas J. A., Olguín O. R., Rizzotto M.G.; Phys. Med. Biol. **50**, 1689-1701 (2005).
- Horas J. A., Olguín O. R., Rizzotto M.G.; Anales de la AFA **15**, 313-316 (2003).
- Mueller-Klieser W.; Critical Reviews in Oncology/Hematology, **36**, 123-139 (2000).
- Buffa F. M., Fenwick, J. D., Nahum, A. E.; Med. Phys., **27** (6), 1258-1265 (2000).
- Munro T. R.; Gilbert, C. W.; Br. J. Radiol., **34**, 246-251 (1961) (1989).
- Brenner D. J.; Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., **26**, 171-179 (1993).