

USO DE UN MODELO DE DOS COMPARTIMIENTOS PARA PREDECIR LA PROBABILIDAD DE CURA TUMORAL (TCP). APLICACIÓN A ESFEROIDES CELULARES IRRADIADOS.

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 utiliza un modelo de dos compartimientos para predecir la probabilidad de cura tumoral (TCP) en esferoides celulares irradiados. Usando este modelo es posible determinar los parámetros de radiosensibilidad efectiva, considerando una distribución tipo mezcla gaussiana para dichos parámetros. Con estos y aplicando la estadística de Poisson se obtiene una expresión para la probabilidad de cura tumoral. Se estudia el efecto de la radiación sobre las células en estado hipóxico (radioresistentes) y sobre aquellas en estado óxico (Menos radioresistentes). El análisis se centra en verificar que la curva de TCP es determinada por las células clonogénicas de mayor resistencia a la radiación. El modelo se aplica a esferoides celulares (MCTS) de distinto tamaño de una línea celular de adenocarcinoma de colon (WiDr), obteniéndose interesantes correlaciones. La variación de la densidad de células clonogénicas y otros aspectos en el interior del esferoide son también considerados.

A two-compartment model is used to predict the tumor control probability (TCP) in irradiated cellular spheroids. Using this model is possible to establish the effective radiosensitivity parameters. With these parameters and applying the Poisson statistics an expression for TCP is obtained. The effect of radiation on both cells in hypoxic (radioresistent) and oxic state (less radioresistent) is studied. The analysis is focused in verifying that the curve of tcp is determined by those clonogenic cells that are more resistant to radiation. The model is applied to cellular spheroids (MCTS) of different size of a human colon adenocarcinoma cell line (WiDr), obtaining interesting correlations. The variation in the density of clonogenic cells and other aspects in the interior of the spheroid are also considered.

I. INTRODUCCIÓN

La probabilidad de control tumoral (TCP), objeto de este trabajo, se define como la probabilidad de no tener ninguna célula clonogénica sobreviviente en el tumor al final de la radioterapia⁽¹⁾

Bajo el supuesto de que la probabilidad de sobrevida para cada célula clonogénica es suficientemente pequeña y que el número inicial de células clonogénicas es alto comparado con el número de células sobrevivientes después de la irradiación, es posible aplicar la estadística de Poisson. Nótese que esta son las condiciones que se cumplen en un tumor sometido a tratamiento radioterapéutico.

Lo anterior puede ser dicho en otro lenguaje marcando que el objetivo de la radioterapia es precisamente obtener, para cada paciente, la máxima probabilidad de cura cancerígena mientras se minimiza la posibilidad de daño en el tejido normal circundante a la zona de irradiación.

Es un hecho muy conocido que la población de un tumor es heterogénea⁽²⁾, hecho que se manifiesta claramente con la respuesta a la radiación de una población celular, produciendo que la radiocurabilidad de un tumor esté determinada por la células más resistentes. En un tumor existen varias fuentes de heterogeneidad, siendo las más notables 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 nos concentraremos en la hipoxia celular, que

puede considerarse como una de las principales fuentes de heterogeneidad.

Cualquier estudio sobre los efectos de la radiación sobre tumores incluye dos mediciones básicas, la fracción de sobrevida (SF) y la probabilidad de control tumoral (TCP). En este trabajo profundizaremos en el uso del modelo de dos compartimientos considerando el nivel de oxigenación celular y calcularemos TCP, utilizando resultados del trabajo anterior en que se obtuvo SF⁽³⁾.

Se considerará la importancia de las células clonogénicas o sea aquellas células capaces de generar un tumor, y el estado de oxigenación en que se encuentran. Se mostrará también la influencia de dichas células en el cálculo de TCP y en particular la dramática importancia que adquiere un pequeño número de células clonogénicas radioresistentes.

Está establecida la conveniencia de los esferoides como sistema modelo⁽⁴⁾ en radioterapia, de allí que al igual que en nuestro trabajo anterior sobre SF, para contrastar nuestros resultados se utilizarán datos experimentales de TCP en esferoides celulares, con radios que van desde $R=50\mu\text{m}$ hasta $R=600\mu\text{m}$, obtenidos por Buffa et al.⁽⁵⁾. Las determinaciones fueron realizadas sobre esferoides de la línea celular WiDr (adenocarcinoma de colon humano). Se ha mostrado que este es un buen modelo para describir la respuesta a la radiación de tumores WiDr in vivo.

II. MÉTODOS

Siendo nuestro objetivo el cálculo de TCP en una población celular heterogénea, se dará una formulación general teniendo en cuenta la existencia de diversos compartimientos en los que se considerarán los diversos tipos de células. Se explicitará luego el modelo para nuestro caso particular en que se considera el nivel de oxigenación y la radioresistividad celular concomitante.

Modelo de TCP usando compartimientos

El modelo de probabilidad de control tumoral más usado es el de Munro⁽⁶⁾ que asume la estadística de Poisson⁽⁷⁾ y da una simple relación para un tumor que contiene N células clonogénicas con una fracción de supervivencia muy pequeña. Su expresión en el caso de que haya más de un tipo de células clonogénicas está dada por:

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

donde $i=1,2,3,\dots,n$ diversos compartimientos. N_i corresponde al número inicial de células clonogénicas pertenecientes a cada compartimiento. SF_i es la fracción de supervivencia de cada uno de los grupos mencionados anteriormente y se lo considera dado por el conocido modelo lineal cuadrático (LQ)⁽³⁾:

$$(2) \quad SF_i = f_i \exp(-\mathbf{a}_{eff}^i D - \mathbf{b}_{eff}^i D^2)$$

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

En esta expresión D es la radiación recibida en única dosis, f_i la fracción de células correspondiente a cada compartimiento. En los parámetros del modelo LQ el supraíndice indica el compartimiento de que se trate y con el subíndice eff indicamos que son valores promediados según el procedimiento ya descrito⁽³⁾.

La probabilidad de control tumoral TCP en todo el tumor, esta dada por el producto de las probabilidades de control tumoral TCP_i locales, correspondientes a un pequeño volumen donde la dosis de radiación administrada se supone homogénea.

$$(3) \quad \ln TCP = \sum_i \ln TCP_i = - \sum_i N_i SF_i$$

entonces:

$$(4) \quad TCP = \exp\left(- \sum_i N_i SF_i\right)$$

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

Obviamente en el límite para pequeños volúmenes, $N_i = g(V_i)$, la sumatoria se transforma en una integral.

La formulación general, ec. (4) involucra n compartimientos, pero es posible simplificar notablemente las ecuaciones, basándose en la muy aceptada consideración de que la población celular que conforma un tumor se puede dividir en sólo dos subpoblaciones, de acuerdo a su nivel de oxigenación: una oxigenada que es menos radioresistente y otra hipóxica que es comparativamente muy radioresistente. Consecuentemente y asumiendo la existencia de dos subpoblaciones corresponde describir:

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 oxigenada. El tamaño del tumor está definido por su radio R . La cantidad r_0 define el ancho o penetración máxima de la región oxica.

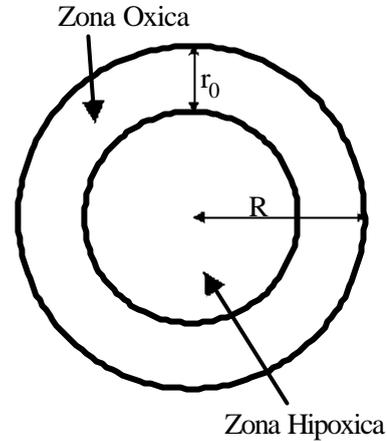


Figura 1

Esquema de un esferoide.

La esfera 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. Nuestro 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) La expresión de TCP para dos compartimientos

Para nuestro caso en que tenemos un carozo hipóxico y una capa exterior oxigenada (fig.1) la sumatoria de la ec.(4) incluye solo dos sumandos correspondientes a la fracción óxica e hipóxica respectivamente, por lo que la expresión de TCP queda:

$$(5) \quad TCP = \exp\left[- N_{ox} f_{ox} \exp(-\mathbf{a}_{eff}^{ox} D - \mathbf{b}_{eff}^{ox} D^2) - N_h (1 - f_{ox}) \exp(-\mathbf{a}_{eff}^h D - \mathbf{b}_{eff}^h D^2)\right]$$

III. RESULTADOS

La expresión para TCP dada por la ec.(5) contiene siete cantidades que deben ser determinadas:

El número de células clonogénicas en cada compartimiento (N_{ox} y N_h), la fracción óxica f_{ox} y por último los parámetros \mathbf{a}_{eff} y \mathbf{b}_{eff} del modelo LQ para el compartimiento óxico e hipóxico respectivamente.

En lo que sigue reduciremos a un solo parámetro ajustable la contrastación de nuestra ec.(5) con los datos experimentales.

a) Número de células clonogénicas N_{ox} y N_h

Para determinar el número de células clonogénicas en el compartimiento oxigenado asumimos que el número de células clonogénicas está dada por:

$$(6) \quad N_{ox} = g(V_{ox}) = \mathbf{r}V_{ox}$$

donde r es la densidad de células clonogénicas que se supone constante y V_{ox} es el volumen del anillo o capa exterior oxigenada (fig.1). Lo anterior sigue la aceptada hipótesis descrita por Brenner⁽⁸⁾ de que el número de células clonogénicas es proporcional al volumen del tumor. Es trivial obtener el volumen de dicha cáscara esférica y por lo tanto el número de células clonogénicas, en ese compartimiento, ya no será un parámetro ajustable, sino que servirá también para evaluar el modelo. Por el contrario, N_h es el único parámetro ajustable de nuestro modelo. Es claro que en un sistema complejo, como cualquier tumor, es difícil determinar analíticamente la dependencia del número inicial de células clonogénicas en el compartimiento hipóxico.

Tabla 1

Número de células clonogénicas en cada compartimiento y número total de células clonogénicas determinadas experimentalmente.

R[m]	$V_{ox}[m^3]$	N_{ox}	N_h	$N_{ox} + N_h$	$N_{exp.}$
250	3.19e+7	1.47e+4	67	1.47e+4	2.7e+4 ± 7.3e+3
375	7.71e+7	3.5e+4	5	3.5e+4	9.1e+4 ± 5.4e+4
500	1.42e+8	6.53e+4	32	6.53e+4	9.5e+4 ± 3.9e+4
600	2.08e+8	9.56e+4	26	9.56e+4	1.6e+5 ± 6.5e+4

b) La fracción óxica f_{ox} surge de un simple cálculo geométrico, en nuestro esferoide es

$$(7) \quad f_{ox} = \frac{\text{volumen de la zona óxica}}{\text{Volumen total del esferoide}}$$

c) Fracción de sobrevida SF_{ox} y SF_h

Para obtener SF en cada compartimiento dado que se utiliza el modelo LQ, solo es preciso contar con el valor de los parámetros de radiosensibilidad. Como una prueba más de la bondad o no de nuestro modelo utilizaremos entonces los parámetros del modelo LQ ya obtenidos en el trabajo anterior⁽³⁾. Recuérdese que en ese trabajo se obtuvieron valores de los parámetros que permitan predecir con precisión aceptable la fracción de sobrevida. Es importante resaltar el uso de determinaciones de la fracción de sobrevida y con ellas predecir la probabilidad de control tumoral.

Determinación de parámetros

En la tabla 1 se muestra el número de células clonogénicas en cada compartimiento y su determinación experimental, y también los valores obtenidos por ajuste para el parámetro N_h . En esta tabla, para calcular la células clonogénicas en el compartimiento óxico (N_{ox}) utilizamos la ec. (7) con una densidad igual a 4.6e-04 células/m³, este valor que se asume constante, es obtenido de Buffa et al⁽⁵⁾.

En la tabla 2 se muestran los valores ya obtenidos⁽⁹⁾ para el modelo LQ. En esta tabla los valores de los parámetros son idénticos a los ya calculados, excepto

para a_{eff}^{ox} cuyos valores han sido modificados levemente cuidando de mantenerse dentro de la incerteza experimental.

IV. DISCUSIÓN

Puesto que N_{ox} es calculado analíticamente, el único parámetro que resta para obtener TCP, es N_h , los valores de este parámetro se dan en la Tabla 1. Lo importante a mencionar sobre este, es que el ajuste determina un número pequeño de células hipóxicas, lo cual es aceptable puesto de que se trata de células muy radioresistentes que determinan la forma de TCP. También se ha mencionado que no existiendo una funcionalidad simple que relacione el número de células clonogénicas hipóxicas con el volumen de la zona hipóxica, no se tiene una expresión para comparar los resultados numéricos.

Tabla 2

Parámetros para el modelo LQ de sobrevida 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

Es de remarcar la coincidencia entre el número total de células clonogénicas según nuestro modelo ($N_{ox} + N_h$) y el valor determinado experimentalmente (N_{exp})⁽⁵⁾.

En las figuras 2, 3, 4 y 5 mostramos los valores experimentales y el ajuste con nuestro modelo de TCP, para esferoides de radio creciente.

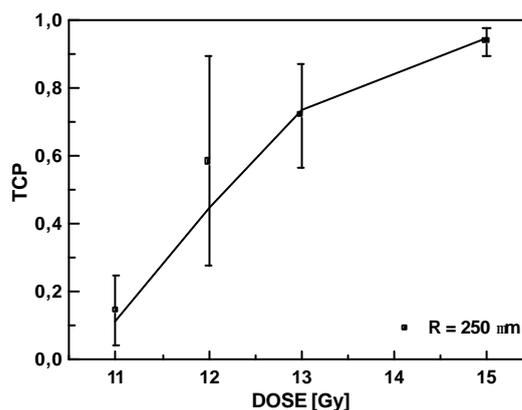


Figura 2

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

Se observa que en dichas figuras la coincidencia en general es buena. Es importante mencionar que el ajuste

realizado implica un sólo parámetro libre, el número de células clonogénicas en la región hipóxica (N_h).

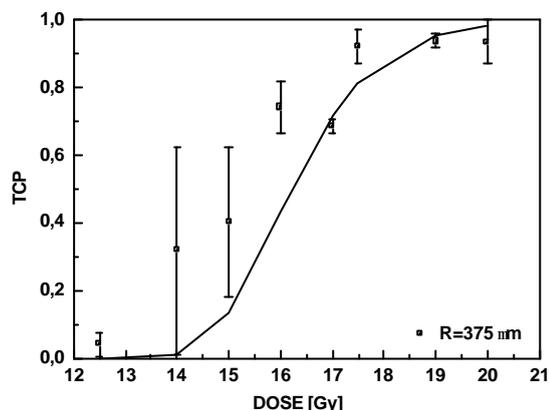


Figura 3

Idem anterior.

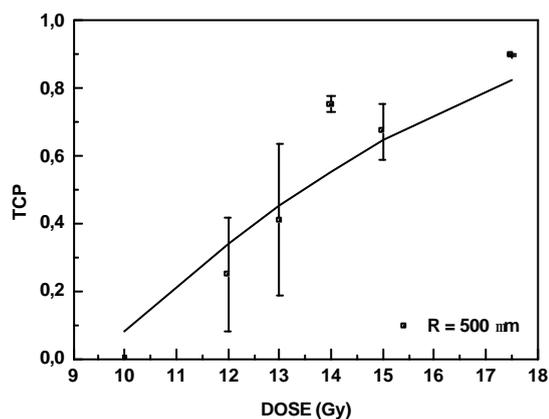


Figura 4

Idem anterior.

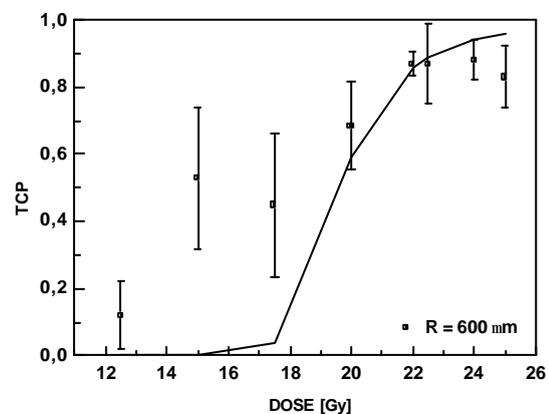


Figura 5

idem anterior.

V. CONCLUSIONES

Este trabajo permite concluir:

- que el uso del modelo de dos compartimientos expresado por la ec. (5) y la aplicación de la estadística de Poisson muestra aceptables resultados para esferoides de tamaños crecientes,
- que los ajustes mostrados implican el uso de un solo parámetro ajustable,
- que hay buena coincidencia entre $N_{\text{experimental}}$ y $N_{\text{calculado}}$,
- que se han utilizado, con el buen resultado mostrado, determinaciones independientes para obtener TCP. Recuérdese que en nuestro modelo de TCP hemos tomado los parámetros del modelo LQ para la fracción de sobrevida, que han sido determinados previamente en forma independiente.

VI. REFERENCIAS

1. Buffa. F. M., Fenwick, J. D., Nahum, A. E.; Med. Phys., **27** (6), 1258-1265 (2000).
2. Yaes. R. J.; Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys., **14**, 147-157 (1988).
3. Horas J. A., Olgúin O. R., Rizzotto M.G. Radio sensibilidad y tamaño tumoral en esferoides celulares. Aceptado para su publicación en los Anales de la AFA 2003.
4. Mueller Kliese, W. Critical Reviews in Oncology/Hematology, **36**, 123-139 (2000).
5. Buffa. F. M., West, C., Byrne, K., Moore, J., Nahum, A. E.; Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys., **49**(4), 1109-1118 (2001).
6. Munro, T. R.; Gilbert, C. W.; Br. J. Radiol., **34**, 246-251 (1961) (1989).
7. W Feller. Introduccion a la teoria de probabilidades. Editorial Limusa. Mexico. 1978.
8. Brenner, D. J.; Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys., **26**, 171-179 (1993).
9. Horas J. A., Olgúin O. R., Rizzotto M.G. On the surviving fraction in irradiated multicellular tumor spheroids: Calculation of overall radiosensitivity parameters, influence of hypoxia and volume effects. Enviado a publicar.