

Radio sensibilidad y tamaño tumoral en esferoides celulares

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

Universidad Nacional de San Luis, Facultad de Cs. Físico Matemáticas y Naturales,
Departamento de Física, Instituto de Matemática Aplicada San Luis.
Ejército de los Andes 950, (5700) San Luis - Argentina
jhoras@unsl.edu.ar

A partir de un modelo de dos compartimientos, uno para las células oxicas y el otro para las hipoxicas (que tienen una presión de oxígeno deprimida respecto de la normal), se obtienen los parámetros α y β del modelo lineal cuadrático (LQ) de la supervivencia celular. Para la obtención de estos parámetros se promedia convenientemente utilizando modelos que hacen explícita la dependencia con la posición.

El modelo LQ de dos compartimientos con sus parámetros así obtenidos, se aplica a una serie de determinaciones experimentales del factor de supervivencia de esferoides *in vitro* que son usados como modelos de tumores sólidos. Se muestran los resultados del modelo teórico en dichos esferoides de 100, 500, 750, 1000 y 1200 μm de diámetro. Se enfatiza sobre la posibilidad de predecir la variación de los parámetros con el tamaño del esferoide, realizando los ajustes solo sobre el esferoide de menor tamaño (100 μm).

We use the linear quadratic (LQ) model for surviving fraction. Specifically we use a two compartment model, one for oxidic cells and other for hypoxic ones (these have a depressed oxygenation level), and we obtain the respective parameters α and β . For the calculation of these parameters we use models with an explicit position dependence and then we average.

We apply this two compartment LQ model to experimental data of surviving fraction for *in vitro* spheroids. We show results of our theoretical model for spheroids with diameters of 100, 500, 750, 1000 and 1200 μm . We emphasize on the possibility to predict the parameters spheroid's size dependence. The only fit is made over the smallest spheroid (100 μm).

INTRODUCCIÓN

La diversa respuesta de los tumores cancerígenos a la terapia radiobiológica se atribuye fundamentalmente al desarrollo de células radioresistentes y también a la distinta capacidad de las células para proliferar^{(1) (2)}. Trataremos aquí la primera de estas fuentes de heterogeneidad.

Las modalidades de tratamiento pueden ser superadas si se conoce mejor la forma de crecimiento de estos tumores, esto es posible si se cuenta con un sistema *in vitro* que mime la situación *in vivo*. Este es el caso de los esferoides celulares que son conglomerados tridimensionales, también denominados "Multicelular Tumor Spheroids" (MCTS)⁽³⁾.

Los objetivos del trabajo pueden ser descriptos como

- Proponer un método para calcular los parámetros de radiosensibilidad.
- Investigar sobre la dependencia con la posición de la radiosensibilidad en esferoides multicelulares.
- Predecir la fracción de supervivencia de esferoides en función de su tamaño

Para contrastar nuestros resultados, usamos los completos datos experimentales de fracción de supervivencia celular en esferoides, con radios desde $R = 50\mu\text{m}$ hasta $R = 600\mu\text{m}$, obtenidos por Buffa et al⁽⁵⁾. El primero es también medido en estado hipoxico.

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*.⁽⁵⁾

MÉTODOS

La hipoxia celular es una de las principales fuentes de heterogeneidad en un tumor. Las células que lo forman pueden ser divididas en dos subpoblaciones, de acuerdo a su nivel de oxigenación, una oxigenada (menos radioresistente) y otra hipoxica (muy radioresistente).

Modelo lineal cuadrático de dos compartimientos para células oxicas e hipoxicas

El modelo más aceptado para la fracción de supervivencia es el denominado lineal cuadrático (LQ), que es un modelo "mecánico" de muerte celular y reparación de daños subletales⁽⁶⁾. Si diferenciamos dos estados de las células cancerígenas de acuerdo a su nivel de oxigenación, y usando una distribución Gaussiana bi-variada del tipo "mezcla"⁽⁴⁾, usando el modelo LQ, podemos escribir:

$$SF = f^{ox} \exp(-\alpha_{eff}^{ox} D - \beta_{eff}^{ox} D^2) + (1 - f^{ox}) \exp(-\alpha_{eff}^h D - \beta_{eff}^h D^2) \quad (1)$$

en esta expresión D es la radiación recibida en única dosis, f^{ox} la fracción oxica y tenemos además cuatro parámetros, en ellos el supraíndice expresa la situación oxigenada (ox) o hipoxica (h). Con el subíndice "eff" indicamos que son valores promedio calculados según se describe luego. En particular $\beta_{eff} = \langle \beta \rangle - \sigma_\alpha^2 / 2$ puesto que la precisión experimental hace imposible diferenciar entre el valor promedio de β y la dispersión en α .

Determinación de α_{eff} y β_{eff}

Para determinar el valor de los parámetros, necesitamos describir los siguientes aspectos:

a) *geometría del tumor*. En la fig 1 se muestra un tumor esférico idealizado consistente de un carozo hipoxico y de un anillo o capa exterior oxigenada. El tamaño del tumor esta definido por su radio R . La cantidad r_0 define el ancho o penetración máxima de la región oxica.

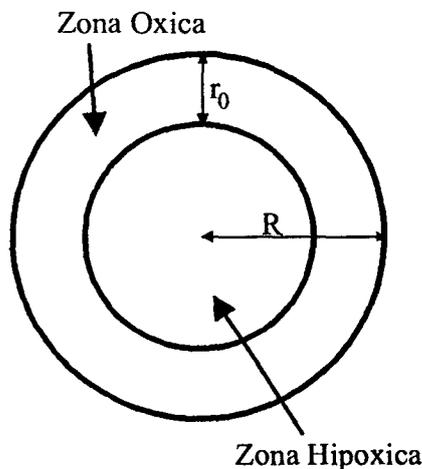


Figura 1: Esquema de un esferoide

La esfera interna de radio $R - r_0$, al estar alejada de la superficie del tumor y de los nutrientes es la region hipóxica con células crecientemente radiosensibles. 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) *Las expresiones de la radiosensibilidad local como una función de la posición en el tumor*. Proponemos que los parámetros de radiosensibilidad locales, $\alpha(r, R)$ y $\beta(r, R)$ dependan de la distancia radial r desde el centro del tumor ($0 \leq r \leq R$). En la tabla 1 describimos las funcionalidades propuestas. En ella α_0 y β_0 son parámetros de los distintos modelos, relacionados con la oxigenación en la superficie de los tumores.

La razón para proponer estas expresiones es doble. Primeramente es conveniente minimizar el número de parámetros. En segundo lugar con la misma idea de simplicidad, conviene analizar diversas funcionalidades, tanto lineales como no lineales, y permitir que la radiosensibilidad crezca con r o sea aproximadamente constante.

c) *las expresiones para la radiosensibilidad promedio o completa*

En la ec. (1), α_{eff}^i y β_{eff}^i (con i igual ox, h) denotan los valores efectivos o promedios. Si asumimos como válida la hipótesis ergódica, suponiendo que estamos en presencia de sistemas estadísticamente homogéneos ⁽⁷⁾, los promedios sobre el conjunto estadístico y el promedio volumétrico son intercambiables, supuesto que los volúmenes sobre los que se opera son suficientemente grandes.

Entonces podemos escribir

$$\langle \alpha \rangle = \underbrace{\iint \alpha f(\alpha, \beta) d\alpha d\beta}_{\text{Ergodicidad}} = \frac{1}{V} \int \alpha(r, R) \underbrace{4\pi r^2 dr}_{dV} \quad (2)$$

donde $f(\alpha, \beta)$ es la función de distribución de α y β .

En consecuencia, para obtener los parámetros de radiosensibilidad efectiva usamos la Tabla 1, y luego de la correspondiente integración, obtenemos las expresiones que se dan en las Tabla 2 y 3. La primera es para esferoides con $R = 50 \mu\text{m}$ en que es aceptable suponer $r_0 = R$ y la segunda vale para esferoides con $R > 50 \mu\text{m}$.

RESULTADOS

El procedimiento general sigue la secuencia:

1. Datos experimentales de la fracción de supervivencia.
2. Modelo, ec (1).
3. Obtención de α_{eff} y β_{eff} , tablas 2 y 3.
4. Determinación de parámetros, tabla 4.
5. Resultados, fig. 2 y tablas 5, 6 y 7.

Determinación de parámetros

Para usar apropiadamente la ec (1) y las tablas 2 y 3 es necesario dar valores a los parámetros r_0 , α_0^{ox} , β_0^{ox} , α_0^h , β_0^h y f^{ox} , en consecuencia.

a. Tomamos $r_0 = 50 \mu\text{m}$ para todos los tumores siguiendo el modelo de la capa externa constante (bien oxigenada), ver el review de Mueller - Kliese⁽³⁾.

b. Obtenemos α_0^{ox} y β_0^{ox} usando la tabla 3 y ajustando los datos correspondientes al esferoide de $50 \mu\text{m}$ que se encuentra en estado óxico (irradiado en aire).

c. Obtenemos α_0^h y β_0^h usando la tabla 3 y ajustando los datos correspondientes al esferoide de $50 \mu\text{m}$ en estado hipóxico (irradiado en atmósfera de nitrógeno).

d. La fracción de zona óxica es $f^{ox} = (R^3 - (R - r_0)^3) / R^3$.

El procedimiento involucra un ajuste sobre los datos correspondiente al esferoide más pequeño ($R = 50 \mu\text{m}$). Los resultados de este *único ajuste* se dan en la tabla 4 donde las incertezas consignadas corresponden al nivel de confianza de 95%.

Calculamos con esto los parámetros de radiosensibilidad para los tumores mayores de $50 \mu\text{m}$, usando las expresiones dadas en la tabla 3. Los resultados para cada modelo se dan en las tablas 5, 6 y 7.

En la fig. 2 se muestran resultados para el modelo de saturación. Se presentan cuatro gráficos separados para mejorar la visualización. Debe resaltarse que la línea llena es nuestra *predicción* usando las expresiones correspondientes.

Discusion

Los valores de los parámetros calculados para los diferentes modelos dan en general valores físicamente aceptables según se muestra en las tablas 5, 6 y 7. Para el modelo de saturación se observa una aceptable disminución de los parámetros de radiosensibilidad mientras aumenta el tamaño del esferoide.

TABLA1: EXPRESIONES LOCALES DE LOS PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD PARA CADA ZONA

MODELO	ZONA OXICA ($R - r_0 \leq r \leq R$)	
	$\alpha(r, R)$	$\beta(r, R)$
LINEAL	$\alpha_0^{ox} \frac{r}{R} - (\alpha_0^{ox} - \alpha_0^h) \frac{(R-r_0)}{R}$	$\beta_0^{ox} \frac{r}{R} - (\beta_0^{ox} - \beta_0^h) \frac{(R-r_0)}{R}$
CUADRATICO	$\frac{\alpha_0^{ox}}{R^2} r^2 - (\alpha_0^{ox} - \alpha_0^h) \frac{(R-r_0)}{R^2}$	$\frac{\beta_0^{ox}}{R^2} r^2 + (\beta_0^h - \beta_0^{ox}) \frac{(R-r_0)}{R^2}$
SATURACION	$\alpha_0^{ox} \frac{r}{r+r_0} - (\alpha_0^h - \alpha_0^{ox}) \frac{(R-r_0)}{R}$	$\beta_0^{ox} \frac{r}{r+r_0} - (\beta_0^h - \beta_0^{ox}) \frac{(R-r_0)}{R}$
ZONA HIPOXICA ($0 \leq r < R - r_0$)		
MODELO	$\alpha(r, R)$	$\beta(r, R)$
LINEAL	$\alpha_0^h \frac{r}{R}$	$\beta_0^h \frac{r}{R}$
CUADRATICO	$\frac{\alpha_0^h}{R^2} r^2$	$\frac{\beta_0^h}{R^2} r^2$
SATURACION	$\alpha_0^h \frac{r}{r+r_0}$	$\beta_0^h \frac{r}{r+r_0}$

TABLA2: PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD PROMEDIADOS PARA CADA ZONA. R=50 μm

MODELO	Oxico=Irradiado en aire		Hipoxico=Irradiado en Nitrogeno	
	α_{eff}^{ox}	β_{eff}^{ox}	α_{eff}^h	β_{eff}^h
LINEAL	$\frac{3}{4} \alpha_0^{ox}$	$\frac{3}{4} \beta_0^{ox} - \frac{3}{160} (\alpha_0^{ox})^2$	$\frac{3}{4} \alpha_0^h$	$\frac{3}{4} \beta_0^h - \frac{3}{160} (\alpha_0^h)^2$
CUADRATICO	$\frac{3}{5} \alpha_0^{ox}$	$\frac{3}{5} \beta_0^{ox} - \frac{6}{175} (\alpha_0^{ox})^2$	$\frac{3}{5} \alpha_0^h$	$\frac{3}{5} \beta_0^h - \frac{6}{175} (\alpha_0^h)^2$
SATURACION	$0.421 \alpha_0^{ox}$	$0.421 \beta_0^{ox} - 2.682 \times 10^{-3} (\alpha_0^{ox})^2$	$0.421 \alpha_0^h$	$0.421 \beta_0^h - 2.682 \times 10^{-3} (\alpha_0^h)^2$

TABLA3: PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD PROMEDIADOS PARA CADA ZONA. R>50 μm

MODELO	Zona Oxica	($R - r_0 \leq r \leq R$)
	α_{eff}^{ox}	β_{eff}^{ox}
LINEAL	$\frac{\alpha_0^{ox} (12R^3 - 3r_0^3 + 12Rr_0^2 - 18R^2 r_0)}{12R^3 + 4Rr_0^2 - 12R^2 r_0} - (\alpha_0^{ox} - \alpha_0^h) \frac{(R-r_0)}{R}$	$\frac{\beta_0^{ox} (12R^3 - 3r_0^3 + 12Rr_0^2 - 18R^2 r_0)}{12R^3 + 4Rr_0^2 - 12R^2 r_0} - (\beta_0^{ox} - \beta_0^h) \frac{(R-r_0)}{R} + \frac{(\alpha_0^{ox})^2 (12R^3 - 3r_0^3 + 12Rr_0^2 - 18R^2 r_0)}{2(12R^3 + 4Rr_0^2 - 12R^2 r_0)} - \frac{(\alpha_0^{ox})^2 (15R^4 + 3r_0^4 - 15Rr_0^3 - 30R^3 r_0 + 30R^2 r_0^2)}{2(15R^4 - 15R^3 r_0 + 5R^2 r_0^2)}$
CUADRATICO	$\frac{3}{5} \frac{\alpha_0^{ox} (5R^4 + r_0^4 - 5Rr_0^3 - 10R^3 r_0 + 10R^2 r_0^2)}{R^2 (3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2)} - (\alpha_0^{ox} - \alpha_0^h) \frac{(R-r_0)}{R^2}$	$\frac{3\beta_0^{ox} (5R^4 + r_0^4 - 5Rr_0^3 - 10R^3 r_0 + 10R^2 r_0^2)}{5R^2 (3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2)} - (\beta_0^{ox} - \beta_0^h) \frac{(R-r_0)}{R^2} + \frac{9(\alpha_0^{ox})^2 (5R^4 + r_0^4 - 5Rr_0^3 - 10R^3 r_0 + 10R^2 r_0^2)}{50R^4 (3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2)} - \frac{3(\alpha_0^{ox})^2 (R^4 + \frac{1}{2}r_0^4 - Rr_0^3 - 3R^3 r_0 + 3R^2 r_0^2 - 5R^3 r_0^3 + 5R^4 r_0^2)}{2R^4 (3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2)}$
SATURACION	$\frac{\alpha_0^{ox} (3R^2 - 6Rr_0 + \frac{1}{2}r_0^2 + 3r_0^2 \ln(\frac{R}{R+r_0}))}{3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2} - (\alpha_0^{ox} - \alpha_0^h) \frac{(R-r_0)}{R}$	$\frac{\beta_0^{ox} (3R^2 - 6Rr_0 + \frac{1}{2}r_0^2 + 3r_0^2 \ln(\frac{R}{R+r_0}))}{3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2} - (\beta_0^{ox} - \beta_0^h) \frac{(R-r_0)}{R} + \frac{1}{2} \frac{(\alpha_0^{ox})^2 (3R^2 - 6Rr_0 + \frac{1}{2}r_0^2 + 3r_0^2 \ln(\frac{R}{R+r_0}))^2}{(3R^2 - 3Rr_0 + r_0^2)^2} - \frac{1}{2} \frac{(3R^4 + 3r_0^4 + 13Rr_0^3 - 6R^3 r_0 + 4R^2 r_0^2)}{3R^4 + Rr_0^3 - 2R^2 r_0^2} - \frac{1}{2} \frac{(\alpha_0^{ox})^2 (12Rr_0^3 \ln(\frac{R}{R+r_0}) + 12R^2 r_0^2 \ln(\frac{R}{R+r_0}))}{3R^4 + Rr_0^3 - 2R^2 r_0^2}$
Zona Hipoxica		($0 \leq r < R - r_0$)
	α_{eff}^h	β_{eff}^h
LINEAL	$\frac{3\alpha_0^h (R-r_0)}{4R}$	$\frac{120\beta_0^h R(R-r_0) - 3(\alpha_0^h)^2 (R-r_0)^2}{160R^2}$
CUADRATICO	$\frac{3\alpha_0^h (R-r_0)^2}{5R^2}$	$-\frac{3}{175} \frac{(R-r_0)^4 (2R^2 (\alpha_0^h)^2 - 4Rr_0 (\alpha_0^h)^2 - 35R^2 \beta_0^h + 2r_0^2 (\alpha_0^h)^2)}{R^4}$
SATURACION	$\frac{\alpha_0^h (\frac{1}{2}r_0^3 - R^3 - 9Rr_0^2 + \frac{9}{2}R^2 r_0 + 3r_0^3 \ln(\frac{R}{r_0}))}{r_0^3 - R^3 - 3Rr_0^2 + 3R^2 r_0}$	$\frac{\beta_0^h (\frac{1}{2}r_0^3 - R^3 - 9Rr_0^2 + \frac{9}{2}R^2 r_0 + 3r_0^3 \ln(\frac{R}{r_0}))}{r_0^3 - R^3 - 3Rr_0^2 + 3R^2 r_0} - \frac{(\alpha_0^h)^2 (3r_0^4 - R^4 + 10Rr_0^3 + 6R^3 r_0 + 12Rr_0^3 \ln(\frac{R}{r_0}) - 18R^2 r_0^2)}{2(Rr_0^3 - R^4 + 3R^3 r_0 - 3R^2 r_0^2)} + \frac{(\alpha_0^h)^2 (\frac{1}{2}r_0^3 - R^3 - 9Rr_0^2 + \frac{9}{2}R^2 r_0 + 3r_0^3 \ln(\frac{R}{r_0}))^2}{2(r_0^3 - R^3 - 3Rr_0^2 + 3R^2 r_0)^2}$

El modelo que da mejores predicciones es el llamado de saturación (fig 2), en los otros casos las predicciones están más alejadas de los valores experimentales.

CONCLUSIONES

Este trabajo permite concluir lo que sigue

1. El uso de la geometría de los MCTS *permite predecir* los parámetros de radiosensibilidad con exactitud razonable.
2. Para evitar la sobreparametrización, el análisis fue idealizado, pero nuestras simplificaciones están justificadas razonablemente.
3. Los resultados son aceptables considerando que no se realiza ningún ajuste, con excepción hecha del esferoide más pequeño.

REFERENCIAS

- [1] Nirmala, C., Rao J. S., Ruifrok A.C., Langford L. A., Obeyesekere M.; *International Journal of Oncology* 19: 1109-1115, 2001.
- [2] Potmesil M., Goldfeder A.; *Cell Tissue Kinet* 13: 563-570, 1980
- [3] Mueller-Kliesch, W. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36 (2000) 123-139
- [4] W Feller. *Introducción a la teoría de probabilidades*. Editorial Limusa. Mexico. 1978.
- [5] Buffa. F. M., West, C., Byrne, K., Moore, J., Nahum, A. E.; *Int.J. Radiation Oncology Biol. Phys.*; vol 49, No. 4 pp 1109-1118, 2001
- [6] Fowler, J. F. *Br. J. Radiol.* 62:679-694: 1989 - Thames, H.D.; Hendry, J. H. "Fractionation in radiotherapy" London: Taylor and Francis 1987
- [7] Torquato S., *Int. J. Solids Structures* vol. 35, No. 19, pp. 2385-2403, 1998.

TABLA4: PARÁMETROS PARA LOS DISTINTOS MODELOS (VER TEXTO).

Modelos	α_0^{ox}	β_0^{ox}	α_0^h	β_0^h
Lineal	0.164 ± 0.018	0.061 ± 0.003	0.143 ± 0.028	0.002 ± 0.0008
Cuadrático	0.204 ± 0.023	0.078 ± 0.004	0.179 ± 0.034	0.004 ± 0.0005
Saturación	0.292 ± 0.032	0.108 ± 0.005	0.256 ± 0.049	0.004 ± 0.002

TABLA5: PARAMETROS PARA EL MODELO LINEAL USANDO LA PARTE CORRESPONDIENTE DE LA TABLA 3.

$R(\mu m)$	α_{eff}^{ox}	β_{eff}^{ox}	α_{eff}^h	β_{eff}^h
250	0,132	0,008	0,086	0,001
375	0,136	0,006	0,093	0,001
500	0,138	0,005	0,097	0,001
600	0,139	0,005	0,099	0,001

TABLA6: PARAMETROS PARA EL MODELO CUADRÁTICO USANDO LA PARTE CORRESPONDIENTE DE LA TABLA 3.

$R(\mu m)$	α_{eff}^{ox}	β_{eff}^{ox}	α_{eff}^h	β_{eff}^h
250	0.153	0.017	0.069	0.001
375	0.161	0.013	0.081	0.001
500	0.165	0.011	0.087	0.001
600	0.167	0.010	0.090	0.001

TABLA7: PARAMETROS PARA EL MODELO DE SATURACION USANDO LA PARTE CORRESPONDIENTE DE LA TABLA 3.

$R(\mu m)$	α_{eff}^{ox}	β_{eff}^{ox}	α_{eff}^h	β_{eff}^h
250	0.240	0.016	0.226	0.003
375	0.233	0.007	0.220	0.003
500	0.223	0.003	0.209	0.003
600	0.206	0.003	0.189	0.003

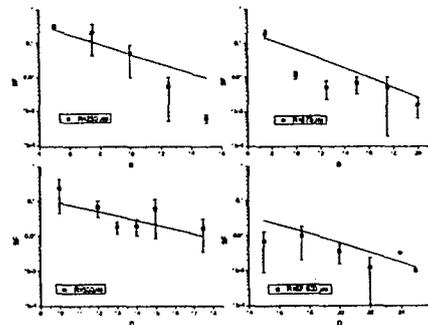


Figura 2: Fracción de Sobrevida (SF) versus dosis para los esferoides de mayor radio. Puntos y barras: Valores experimentales y error. Línea llena: Modelo de Saturación.