

DIFUSIÓN DE OXÍGENO E INFLUENCIA DE LAS CÉLULAS HIPÓXICAS EN LA PROBABILIDAD DE CONTROL TUMORAL

J. A. Horas^(*)(1,2), R. Olgún(1), M. 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 evalúa el impacto de las células hipóxicas en la cura tumoral, a través del cálculo de la fracción de sobrevivencia de células cancerígenas utilizando un modelo que considera la difusión de oxígeno y la distribución de este último en un esferoide celular sometido a radiaciones de baja LET (Transferencia Lineal de Energía). La fracción de sobrevivencia obtenida, considera la dependencia de la densidad de células oxigenadas y de células clonogénicas con la posición en el esferoide, y a partir de allí se obtiene la probabilidad de control tumoral.

The impact of hypoxic cells in the tumoral curve is evaluated, through the calculation of the surviving fraction of cancer cells, using a model which takes into account the oxygen diffusion and the oxygen distribution in a cellular spheroid under radiations of low LET (Linear Energy Transfer). The obtained surviving fraction considers the position dependence of density of oxygenated and clonogenic cells, and then the tumor control probability is obtained.

I. INTRODUCCIÓN

Muchas mejoras para la radioterapia del cáncer se basan en la premisa de que los tumores sólidos contienen células hipóxicas resistentes a la radiación, las cuales limitan la curabilidad de los tumores.

Por ello es importante establecer modelos para la probabilidad de cura tumoral (*tcp*) que consideren la hipoxia, y contrastarlos convenientemente. Mejorar los modelos existentes de *tcp*, a partir de medidas biológicas en células, es deseable también para permitir el diseño de tratamientos terapéuticos y su evaluación, que no estén solamente basados en datos clínicos, cuyo tratamiento y ajuste se ve dificultado por la complejidad del sistema y la heterogeneidad de los datos.

En acuerdo a lo anterior, es importante encontrar sistemas *in vitro* que permitan minimizar la heterogeneidad intertumoral. En este trabajo se utilizan determinaciones experimentales⁽¹⁾ de esferoides multicelulares tridimensionales. Estos proveen un sistema de complejidad intermedia entre los datos de sobrevivencia de una monocapa celular y los datos obtenidos de tumores sólidos *in vivo*.

En este trabajo usamos datos experimentales de la línea celular WiDr del adenocarcinoma del colon humano que se ha hecho crecer como esferoides de distintos diámetros, y se ha mostrado como un buen modelo para describir la respuesta a la radiación de tumores *in vivo* de WiDr⁽²⁾.

El objetivo de este trabajo es probar distintos modelos de fracción de sobrevivencia celular (SF), aplicando diversas

hipótesis sobre el número e influencia de las células hipóxicas y contrastar dichas hipótesis, aplicándolas a datos experimentales que dan la *tcp*. Esto último permite la verificación, a partir de medidas independientes, de los mecanismos biológicos que se hipotetizan.

Partiendo de modelos clásicos tipo lineal cuadrático (LQ) para la radiosensibilidad, se incluye luego un modelo que tiene en cuenta una distribución de células hipóxicas, considerando la presión de oxígeno en función de la posición en el esferoide. Se aplican estos modelos a medidas de *tcp* y se contrastan los mismos comparando el número de células clonogénicas de los esferoides antes de irradiar, convenientemente disociados por tripsinización y conteo celular por "plating".

II. DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS

Los datos experimentales existentes para esferoides de distinto diámetro de la línea tumoral mencionada se dividen en datos de fracción de sobrevivencia (SF), mostrados en la Figura 1, y la probabilidad de control tumoral (*tcp*), Figura 2, ambas versus la dosis de radiación utilizada (D).

Modelos para fracción de sobrevivencia (SF)

Modelo lineal cuadrático: El típico modelo LQ, muy conocido en la bibliografía⁽³⁾, se utilizará para determinar los parámetros de radiosensibilidad

$$(1) \quad SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

Esta expresión incluye al simple modelo lineal si $\beta = 0$. El modelo standard será aplicado a los datos experimentales.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

Sabido es que la presencia de hipoxia celular (células que se encuentran con deficiencia de oxígeno) es un fenómeno siempre presente en los conglomerados de células cancerígenas, en particular para aquellas que se encuentran lejos de la superficie tumoral, pudiendo incluso desarrollarse un carozo necrótico (anoxia), en gran cantidad de tumores sólidos. Es por ello que debe mejorarse, aún en una forma simple, el modelo standard LQ, para tener así en cuenta este fenómeno, que se presenta en nuestro caso en esferoides grandes.

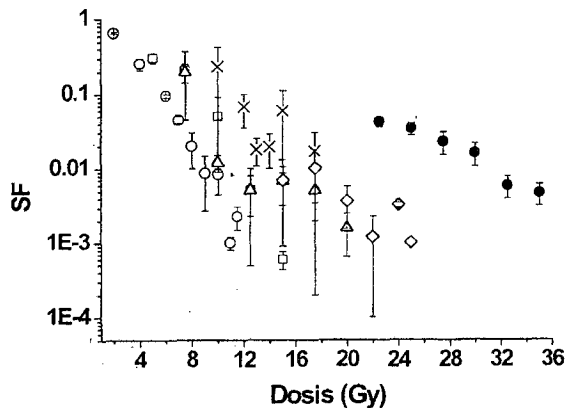


Figura 1. Datos de fracción de supervivencia para diámetros de esferoides de: 100 μm (círculos huecos), 500 μm (cuadrados huecos), 750 μm (triángulos huecos), 1000 μm (cruces), 1200 μm (diamantes huecos) y 100 μm irradiados bajo N_2 (círculos llenos)⁽¹⁾.

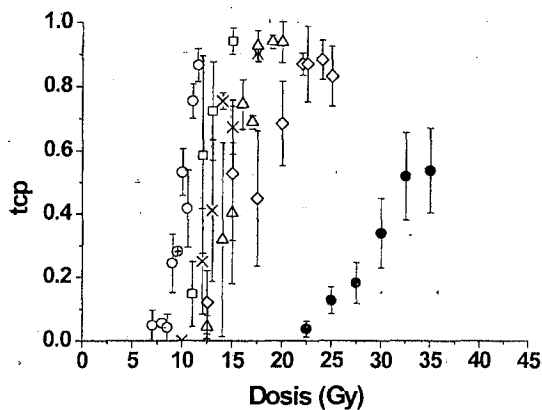


Figura 2. Datos de tcp para diámetros de esferoides de: 100 μm (círculos huecos), 500 μm (cuadrados huecos), 750 μm (triángulos huecos), 1000 μm (cruces), 1200 μm (diamantes huecos) y 100 μm irradiados bajo N_2 (círculos llenos)⁽¹⁾.

Modelo lineal cuadrático de dos compartimentos para células óxicas e hipóxicas: Haciendo la suposición de que las células se encuentran solo en dos estados, óxico o hipóxico, a partir de la ecuación (1) se obtiene

$$(2) \quad SF = (1 - f_h)SF_0 + f_hSF_h$$

donde f_h es la fracción de células hipóxicas y los subíndices o y h implican óxico o hipóxico

respectivamente⁽⁴⁾.

El modelo LQ de dos compartimentos puede expresarse según

$$(3) \quad SF = (1 - f_h) \exp(-\alpha_o D - \beta_o D^2) + f_h \exp(-\alpha_h D - \beta_h D^2)$$

A fin de reducir el número de parámetros ajustables, se utilizan α_h y β_h determinados para el caso de esferoides irradiados en una atmósfera de N_2 y de allí $\alpha_o = \alpha_h OER$ y $\beta_o = \beta_h OER^2$, donde OER es la relación de dosis de radiación en condiciones de hipoxia a la dosis de radiación en aire que se necesita para obtener la misma supervivencia celular, y que en la mayoría de los tumores cancerígenos humanos está alrededor de 2.8⁽¹⁾.

Modelo LQ con difusión de oxígeno: Puesto que la existencia de una distribución en la fracción hipóxica es mucho más realista que la presencia de solo dos estados (óxico e hipóxico), utilizados en el modelo de dos compartimentos, se describe a continuación la forma de obtener tal distribución, considerando la existencia de un gradiente en la concentración de oxígeno a partir de la superficie del esferoide. La difusión de oxígeno en un esferoide se puede aproximar como un problema esféricamente simétrico, siguiendo la ecuación de difusión, usada en el modelo de Krogh⁽⁵⁾.

$$(4) \quad sd \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial}{\partial r} P(r) \right) = M$$

donde $P(r)$ es la tensión de oxígeno a una distancia r del centro del esferoide. M es el consumo de oxígeno en el medio, que se supone constante, s y d son la solubilidad y la difusión de oxígeno, también supuestas constantes. Las condiciones de contorno para esferoides son las siguientes:

- 1) La tensión de oxígeno es constante en la interface esferoide-medio, o sea, $P(R) = P_s$. R es el radio del esferoide.
- 2) En el centro del esferoide el flujo de oxígeno se hace cero, o sea, $dP/dr=0$ en $r=0$.

La solución de la ecuación (4) con estas CC es la que sigue

$$(5) \quad P(r) = \begin{cases} P_s [1 - (R-r)/l]^2 & R-l < r < R \\ 0 & r < R-l \end{cases}$$

donde l está definido como

$$(6) \quad l^2 = 6sdP_s / M$$

y corresponde a la máxima distancia de difusión del oxígeno en el esferoide.

Acordemente, la fracción de supervivencia en el modelo con difusión de oxígeno puede escribirse como sigue

$$(7) \quad SF = \sum_{r=R-l}^R SF(r) f(r)$$

donde $SF(r)$ es la fracción de supervivencia y $f(r)$ es la fracción de células, en la posición r , a una tensión de oxígeno $P(r)$.

Seguendo el modelo LQ, $SF(r)$ puede expresarse según

$$(8) \quad SF(r) = \exp[-\alpha_h OER(r)D - \beta_h OER^2(r)D^2]$$

Ahora obviamente $OER(r)$ depende de la presión de oxígeno en la posición r y puede ser calculada según⁽⁶⁾

$$(9) \quad OER(r) = [k + m \cdot P(r)] / [k + P(r)]$$

donde $k = 6.8$ mmHg y m es el máximo OER , tomado igual a 3⁽⁷⁾.

Si se supone que la densidad de células clonogénicas es constante, se puede estimar $f(r)$ en la ecuación (7) simplemente como la fracción de volumen del esferoide que se encuentra a una tensión de oxígeno $P(r)$

$$(10) \quad f_v(r) = \frac{4\pi r^2 dr}{\int_{R-l}^R 4\pi r^2 dr}$$

Modelo para la probabilidad de control tumoral (tcp):

La probabilidad de control tumoral tcp se obtiene asumiendo que la muerte celular producida por irradiación, sigue la estadística de Poisson:

$$(11) \quad tcp = \exp(-N \cdot SF)$$

donde N es el número inicial de células clonogénicas en el esferoide, medidas por disgregación y "plating", y SF es la correspondiente fracción de supervivencia. Los diferentes modelos para SF que se han descrito previamente son reemplazados en la ecuación (11). A partir de allí puede obtenerse una estimación del número inicial de células clonogénicas y contrastarlo con la determinación experimental.

III. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Datos de supervivencia

Se evalúan primero los distintos modelos para la fracción de supervivencia, siguiendo el orden en que han sido presentados, y por último se contrastan los resultados con los datos de tcp . Las determinaciones experimentales se muestran en las figuras 1 y 2.

Modelo lineal cuadrático: Se determinaron α y β para los distintos tamaños de esferoide, verificándose que hasta un tamaño de 500 micrones, los parámetros dan valores aceptables. Para tamaños crecientes no es así, y la falta de significado físico de los parámetros (signo - para β) se debe fundamentalmente a la creciente aparición de hipoxia cuando crece el tamaño de los esferoides. Todo esto se muestra en la Tabla 1.

Modelo lineal cuadrático de dos compartimentos para células óxicas e hipóxicas: En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos. En ella se da también la fracción hipóxica para cada uno de los tamaños de los esferoides. Si bien el valor de f_h es cero para pequeños esferoides y tiene un valor aceptable para los de mayor diámetro, se trata de valores promediados producto de un ajuste suponiendo solo dos estados de oxigenación, cuando en realidad habrá una distribución de valores.

Tabla 1: Modelo LQ

diámetro (μm)	α	β
100	0.12268 [± 0.01360]	0.04525 [± 0.00215]
100 (N_2)	0.10759 [± 0.02076]	0.00135 [± 0.00074]
500	0.10353 [± 0.04427]	0.02602 [± 0.00346]
750	0.54838 [± 0.05165]	-0.01145 [± 0.00351]
1000	0.45810 [± 0.16866]	-0.01257 [± 0.01194]
1200	0.33361 [± 0.05466]	-0.00332 [± 0.00223]

Valores de α y β obtenidos a partir del ajuste. Entre corchetes se muestra el intervalo de validez de los parámetros con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 2: Modelo LQ de dos compartimentos

diámetro (μm)	f_h
100	0
500	0
750	0.00392 [± 0.00682]
1000	0.09939 [± 0.02925]
1200	0.06582 [± 0.00522]

Valores de f_h obtenidos a partir del ajuste. Aquí se tomó $OER=2.8$, α y β son los valores obtenidos en la Tabla 1 para la irradiación en presencia de N_2 . Entre corchetes se muestra el intervalo de validez de los parámetros con un nivel de confianza del 95%.

Modelo LQ con difusión de oxígeno: En la figura 3 se muestra la fracción de supervivencia para esferoides de 1200 μm , utilizando este modelo. Esta gráfica es ilustrativa también para los otros diámetros, puesto que los ajustes son similares, dentro de los errores experimentales.

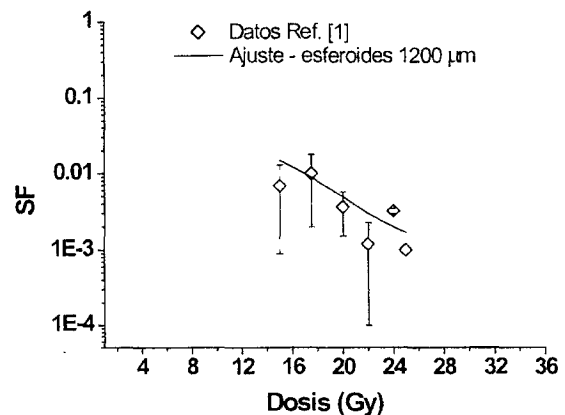


Figura 3. Fracción de supervivencia para esferoides de 1200 μm en función de la dosis de radiación. Diamantes huecos: valores experimentales⁽¹⁾, línea continua: ajuste.

Datos de tcp

Muchos estudios intentan dar conveniente respuesta al problema de cómo incorporar medidas biológicas a nivel celular para predecir y evaluar la terapia radiobiológica sin utilizar datos clínicos. Coincidentemente con esto y para verificar si nuestras hipótesis en los varios modelos de sobrevida son correctos analizamos datos de probabilidad de cura tumoral *tcp*. La existencia de una pendiente constante muestra la validez del modelo de Poisson (dentro de los errores experimentales) para *tcp*. El valor de dicha pendiente y el conteo clonogénico experimental se muestran en la Tabla 3, para los distintos modelos de SF y para los diámetros apropiados.

De esta última puede verse que las coincidencias son aceptables para esferoides de pequeño tamaño, y no para aquellos donde donde la hipoxia está presente.

Para grandes esferoides, a pesar de tener en cuenta la hipoxia, el número de células clonogénicas obtenidas por ajuste es siempre inferior al valor experimental. Esto puede deberse fundamentalmente a dos causas: a) limitaciones en el modelado de la hipoxia, b) impacto de la misma sobre las células clonogénicas.

Tabla 3: Número de células clonogénicas

diámetro (μm)	N experim.	Modelos		
		N LQM	N LQ2C	N Dif. O ₂
100	104 [±68]	241 [±1]		
100(N ₂)	116 [±66]	83 [±9]		
500	2.7E4 [±7.3E3]	120 [±30]		
750	9.1E4 [±5.4E4]		509 [±31]	81 [±14]
1000	9.5E4 [±3.9E4]		206 [±8]	40 [±7]
1200	1.6E5 [±6.5E4]		441 [±35]	84 [±3]

Estimación del número de células clonogénicas, N, obtenido a partir de los datos experimentales y los diferentes modelos, para distintos diámetros de esferoides.

Si bien pueden perfeccionarse los modelos, en particular en lo que hace a la fracción de células hipóxicas, el problema central radica en el punto b) debido a que: 1) se reportan experiencias en otras líneas celulares que dan también valores inferiores para el número estimado de células clonogénicas, usando adenocarcinoma del pulmón humano y fibrosarcoma de ratones⁽⁸⁾; 2) se reportan experiencias en que se ha irradiado, con reoxigenación, el esferoide de 1200 μm y los resultados para células clonogénicas son buenos bajo estas condiciones⁽¹⁾. De aquí se puede deducir que las diferencias observadas en la tabla 3, para grandes esferoides, es debida fundamentalmente a que la hipoxia celular no solo disminuye la radiosensitividad, sino también el número de células clonogénicas que se

desarrollan *in situ*.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten concluir:

- 1) Para pequeños esferoides puede predecirse el control tumoral a partir de medidas celulares de fracción de sobrevida.
- 2) Cuando existe hipoxia debe considerarse, además de su efecto sobre la radiosensitividad, la disminución de células clonogénicas *in situ*.
- 3) El método descrito es aplicable a otras líneas celulares y también a ensayos clínicos.

Agradecimientos: los autores agradecen a la Universidad Nacional de San Luis (UNSL) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por brindar el apoyo económico para la realización de este trabajo.

V. REFERENCIAS

- 1 - F. M. Buffa et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 49 (4), pp. 1109-1118 (2001).
- 2 - West CML, Sutherland RM. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayers, as spheroids, and in nude mice. Radiat Res 1987; 112:105-115.
- 3 - Brenner DJ. A convenient extension of the linear quadratic model to include redistribution and reoxygenation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 32:379-390.
- 4 - Bradly GW, Brown JM. Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the "hypoxic fraction" in determining tumor response to fractionated radiotherapy. Radiat Res 1997; 147:541-550.
- 5 - Sharan M, Gupta S, Popel AS. Parametric analysis of the relationship between end-capillary and mean tissue PO₂ as predicted by a mathematical model. J. Theor. Biol. 1998; 195:439-449.
- 6 - Alper T, Howard-Flanders P. The role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E. coli B. Nature 1956; 178:978-979.
- 7 - Okunieff P, de Bie J, Dunphy EP, et al. Oxygen distributions partly explain the radiation response of human squamous cell carcinomas. Br J Cancer 1996; 74:S185-S190.
- 8 - Sakata K, Okada S, Majima H, et al. Linear quadratic model of radiocurability on multicellular spheroids of human lung adenocarcinoma LCTI and mouse fibrosarcoma FSA. Int. J. Radiat. Biol. 1992; 61:269-274.