

ANÁLISIS DE LOS DOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR POR RADIACIÓN IONIZANTE EN MONOCAPA, ESFEROIDES Y TUMORES TRASPLANTADOS

ANALYZING THE MECHANISMS OF CELL KILLING BY IONIZING RADIATION IN MONOLAYER, SPHEROIDS AND XENOGRAFTED TUMOURS

J. A. Horas, O. R. Olgúin, 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

Recibido: 15/11/16; Aceptado: 29/04/17

Se testea una relación entre la razón de mejora por oxígeno (OER) y los parámetros de radiosensibilidad del modelo Lineal Cuadrático (LQ) en condiciones hipóxicas y aeróbicas de oxigenación, en varias líneas celulares cultivadas en monocapa, esferoides y tumores trasplantados (xenograft). Considerando dicha relación aparecen los dos mecanismos de muerte celular por irradiación. Se comparan ajustes de la Fracción de Sobrevida (SF) en ambas condiciones de oxigenación usando el modelo LQ. Los datos son obtenidos de bibliografía. Se muestra la existencia de dichos mecanismos y su implicancia en los diferentes sistemas estudiados. Se determina la validez de uno u otro mecanismo en cada caso, y la dependencia de OER con la dosis.

Palabras claves: Razón de Mejora por Oxígeno (OER), Modelo Lineal Cuadrático (LQ), Fracción de Sobrevida (SF), Monocapa, Esferoides, Tumores Trasplantados.

A relationship between oxygen enhancement ratio (OER) and parameters of Linear Quadratic (LQ) model in hypoxic and aerobic conditions in several cell lines grown as monolayer, spheroids and transplanted tumors (xenograft) is tested. By considering this relationship, the two mechanisms of cell death by radiation appear. Surviving Fraction (SF) fits are compared in both oxygenation conditions by using the LQ. The data are obtained from literature. The existence of such mechanisms and their implications in the different systems studied is shown. The validity of one or other mechanism in each case is determined and the OER dependence with dose.

Keywords: Oxygen Enhancement Ratio (OER), Linear Quadratic Model (LQ), Surviving Fraction (SF), Monolayer, Spheroids, Xenografted Tumours

I. INTRODUCCIÓN

La hipoxia tumoral es de importancia en la terapia de tumores. Ella es una de las causas principales de las fallas de los tratamientos en muchos cánceres humanos¹. Las células cancerígenas en situación aeróbica (oxigenación normal) o de hipoxia, que en el caso extremo tiene una presión de oxígeno de 0.5 mm Hg, se comportan frente a la radiación ionizante en forma diferente. Las células hipóxicas pueden ser del orden de tres veces más resistentes a la radiación que su contraparte óxica². La radiorresistencia de las células hipóxicas se atribuye a una reducción en el daño de ADN. El daño en el ADN puede ser químicamente restaurado bajo hipoxia, pero es permanente en la presencia de oxígeno^{2,3}.

El parámetro OER (Oxygen Enhancement Ratio) es la razón de la dosis en condiciones aeróbicas e hipóxicas en situación de isosobrevida. Éste puede crecer, decrecer o mantenerse invariante con la dosis aplicada. Este comportamiento es determinado por las relaciones de los parámetros del modelo LQ⁴. El parámetro OER depende de muchos factores, tales como la presión parcial de oxígeno (PO₂), el tipo de tejido, la dosis local aplicada y

la transferencia lineal de energía (LET). La dependencia de OER con la dosis decrece al incrementarse la LET⁴.

Todo el tratamiento y los datos experimentales utilizados en este trabajo, se refieren a irradiación con baja LET (Transferencia Lineal de Energía).

Se estudian los parámetros de radiosensibilidad del modelo LQ. De la relación existente entre ellos y el parámetro OER surgen dos mecanismos de daño celular.

Es importante considerar la existencia de uno u otro de los mecanismos. El Mecanismo 1 implica que OER es independiente de la dosis de radiación. El Mecanismo 2 implica la variación de OER con la dosis⁴. Esto adquiere más importancia en el caso de tratamientos prolongados. En consecuencia, la experimentación previa al tratamiento clínico conviene que se efectúe en esferoides o tumores trasplantados.

En este trabajo se usan datos tomados de bibliografía, que incluyen líneas celulares que crecen como: monocapa^{2,5,6}, esferoides^{7,5,8}, tumores trasplantados^{5,8}.

Los sistemas de cultivo celular en monocapa son un modelo experimental bidimensional (2D).

Los esferoides (multicellular tumor spheroids, MCTS) son cultivos tridimensionales (3D) que adquieren

esa forma esférica. Son modelos celulares más sofisticados. Los esferoides permiten los contactos célula a célula y célula a matriz.

Los tumores transplantados se desarrollan a partir de líneas celulares humanas que crecen en ratones inmuno deprimidos.

El propósito de este trabajo es determinar cuál de los dos mecanismos es válido en los sistemas estudiados. Se muestra también la dependencia del parámetro OER con la dosis de radiación aplicada usando la relación entre los parámetros de radiosensibilidad del modelo LQ y OER.

II. MODELOS Y MÉTODOS

La radiosensibilidad de células de mamíferos es eficientemente descrita por el modelo Lineal Cuadrático (LQ). En dicho modelo⁹, la fracción SF de células que sobreviven luego de absorber una dosis de radiación D puede escribirse como,

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

Esta ecuación consiste de dos funciones de probabilidad de Poisson que describen la muerte de células por el proceso de “única traza” (α) y “doble traza” (β). La pendiente inicial de las curvas de supervivencia y la efectividad a bajas dosis está determinada por α , mientras β representa la contribución del daño acumulado. El modelo LQ provee muy buenos ajustes para alta y baja dosis.

Usando el modelo LQ, para isosupervivencia obtenemos

$$(2) \quad \alpha_A D_A + \beta_A D_A^2 = \alpha_H D_H + \beta_H D_H^2$$

Donde D_A y D_H son las dosis de radiación en condiciones aeróbicas e hipóxicas y α y β son los conocidos parámetros lineal y cuadrático del modelo LQ.

El parámetro OER se define como la relación de dosis que da el mismo nivel de efecto biológico (supervivencia) en condiciones hipóxicas y óxicas

$$(3) \quad OER_i = \frac{D_{Hi}}{D_{Ai}}$$

D_{Hi} y D_{Ai} son las dosis que producen el mismo nivel de supervivencia, i . Esta definición produce un OER que es dependiente de la dosis de radiación aplicada. Puede considerarse la existencia de un OER_α , que es el límite de OER para bajas dosis de radiación y de un OER_β , que es el límite para altas dosis.

Considerando las ecuaciones (2) y (3) se obtiene:

$$(4) \quad \frac{\alpha_H}{\alpha_A} = \frac{1}{OER_\alpha} \quad ; \quad \frac{\beta_H}{\beta_A} = \frac{1}{OER_\beta^2}$$

La ecuación (2) es una expresión algebraica de segundo grado y, como es sabido, puede satisfacerse de dos maneras:

A) Asumiendo que la dosis a la cual la contribución lineal es la misma que la contribución cuadrática para células aeróbicas e hipóxicas.

$$(5) \quad OER_\alpha = OER_\beta; \alpha_H/\alpha_A = (\beta_H/\beta_A)^{1/2} \quad (\text{Mecanismo 1})$$

B) Asumiendo que las componentes lineal y cuadrática contribuyen al daño celular independientemente.

$$(6) \quad OER_\alpha \neq OER_\beta; \alpha_H/\alpha_A \neq (\beta_H/\beta_A)^{1/2} \quad (\text{Mecanismo 2})$$

Las ecuaciones (5) y (6), donde se ha considerado la ecuación (4), expresan diferentes mecanismos de daño biológico, pero ambas resultan en la misma fracción de supervivencia. Es importante mencionar que si se cumple el Mecanismo 1 el OER es independiente de la dosis de radiación⁴. En el otro caso (Mecanismo 2) el OER varía con la dosis⁴. Se comparan los ajustes. Se elige el mejor ajuste usando el test-F y el corrected Akaike Information Criterion (AICc)¹⁰.

Para el test-F, el criterio para aceptar uno de los dos modelos está basado en el valor p . Si el valor de p es menor que (1-el nivel de confianza elegido) se desecha el modelo más simple (Mecanismo 1) y se concluye que el modelo más complejo (Mecanismo 2) ajusta los datos significativamente mejor.

Los pesos del test de Akaike indican la probabilidad que el modelo (Mecanismo) señalado en la Tabla 1 sea el mejor entre los dos modelos considerados.

La validez de uno u otro mecanismo tiene importancia, pues determina el comportamiento del parámetro OER con la dosis aplicada.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

Se han realizado ajustes simultáneos por cuadrados mínimos, todos ellos al 95% de nivel de confianza, para estimar los parámetros de radiosensibilidad del modelo LQ. Se aplicaron los tests F y el criterio de información de Akaike corregido para pequeñas muestras (AICc) para establecer el mejor ajuste¹⁰. Los datos son obtenidos de la bibliografía citada e información sobre el procedimiento experimental y otros aspectos es provista por los autores.

En la Tabla 1 se mencionan todos los sistemas analizados. Se muestran las figuras de cinco de ellos. También se da la bibliografía correspondiente. Se muestra el resultado de los tests F y Akaike. Se utilizaron líneas celulares que crecen como: monocapa (Fig 1a y b), esferoides (Fig 2 a y b) y tumores transplantados (Fig 3a). En todas estas figuras se muestra SF versus la dosis y el ajuste del modelo LQ. Se muestra el valor de los parámetros α_A y β_A y el OER correspondiente. En las figuras el ajuste es aceptable en todo el rango de la dosis sólo en algunas de ellas desmejora para altas dosis pero sin afectar nuestro análisis, dado que el error del ajuste se mantiene, en todos los casos, dentro de los rangos del error experimental mencionado por los autores. La Fig 3b muestra OER versus la dosis. Cada punto está identificado de acuerdo a la forma de crecimiento.

Procedimiento para el ajuste

En todos los sistemas considerados, los datos se agruparon en óxicos e hipóxicos, según se muestra en las figuras. Las líneas llenas son el ajuste y los puntos los datos experimentales. Los parámetros de interés son α_A , β_A , OER_α , OER_β y α_H y β_H . Los primeros cuatro fueron estimados mediante un ajuste simultáneo por cuadrados mínimos. Los parámetros α_H y β_H fueron obtenidos usando la ec. (4). Para establecer si el Mecanismo 1 o el Mecanismo 2 son válidos, se

compararon los ajustes simultáneos aplicando una ecuación diferente para cada caso:

Mecanismo 1: $OER_\alpha = OER_\beta$. La ecuación usada fue.

$$(7) \quad SF = \exp \left[-\frac{\alpha_{oxic}}{OER} D - \frac{\beta_{oxic}}{OER^2} D^2 \right]$$

Cuando se usa esta ecuación para los datos aeróbicos se fija el parámetro OER al valor 1.

Mecanismo 2: $OER_\alpha \neq OER_\beta$. La ecuación usada para el ajuste simultáneo en este caso es

$$(8) \quad SF = \exp \left[-\frac{\alpha_{oxic}}{OER_\alpha} D - \frac{\beta_{oxic}}{OER_\beta^2} D^2 \right]$$

Cuando se usa esta ecuación para los datos aeróbicos se fijan los parámetros OER_α y OER_β al valor 1.

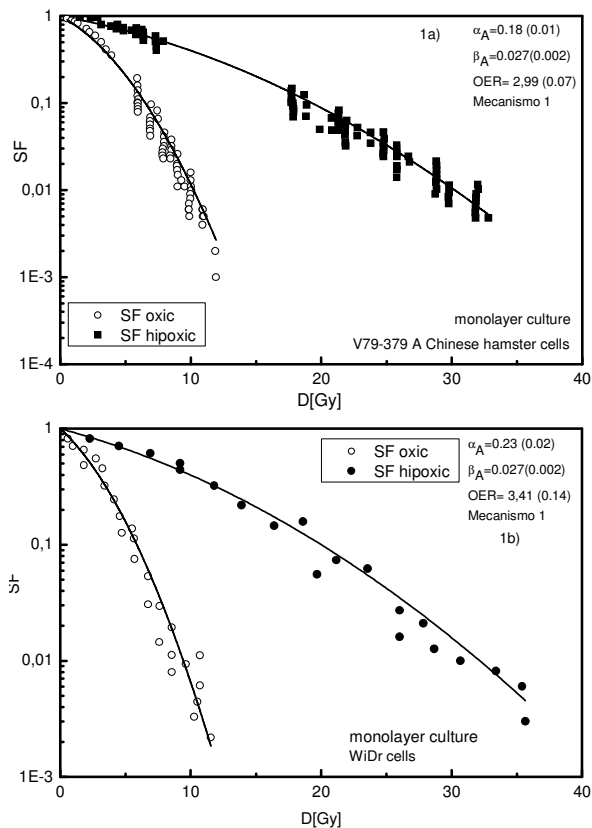


Figura 1. Fracción de Supervivencia (SF) versus la dosis aplicada (D). Ajuste usando ecuaciones (5) y (7).

En estos sistemas se han probado ambos mecanismos y se observa: 1) En todos los sistemas que crecen como monocapa es válido el Mecanismo 1 de daño celular ($OER_\alpha = OER_\beta$). Remarcándose que en este caso, OER es independiente de la dosis aplicada. 2) En todos los cultivos celulares que crecen tanto en esferoides como en tumores trasplantados de diversos volúmenes, es válido el Mecanismo 2 de muerte celular ($OER_\alpha \neq OER_\beta$). Se observa que en estos casos OER varía con la dosis aplicada. En la literatura, OER_α y OER_β son usualmente tratados como factores independientes y muchos autores² asumen la validez del Mecanismo 2 sin profundizar el análisis. Los estudios reportados en este trabajo son los primeros, a nuestro conocimiento, que usan datos de las tres forma de crecimiento de la misma línea celular para testear ambas hipótesis. Es importante notar que factores

relacionados con la estructura 3D y con los contactos célula-célula están presentes en esferoides y en tumores trasplantados pero no en cultivo en monocapa¹¹.

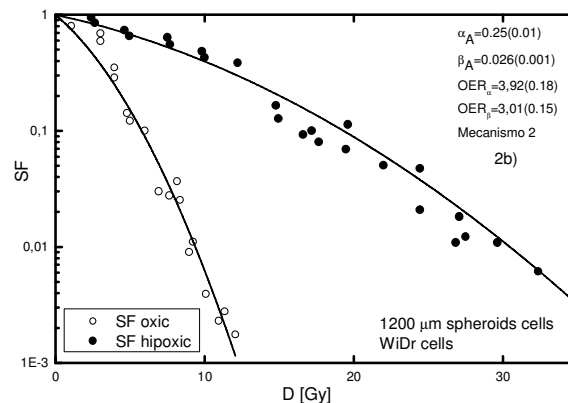
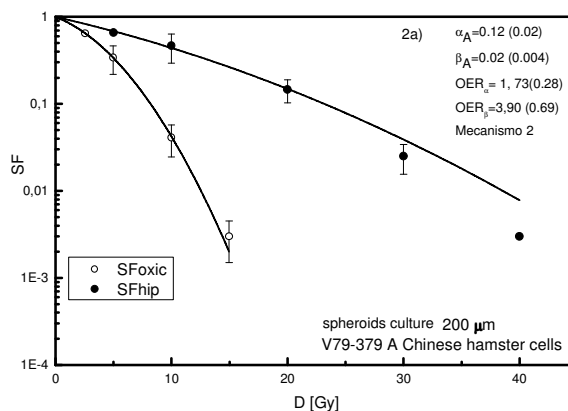


Figura 2. Fracción de Supervivencia (SF) versus la dosis aplicada (D). Ajuste usando ecuaciones (6) y (8).

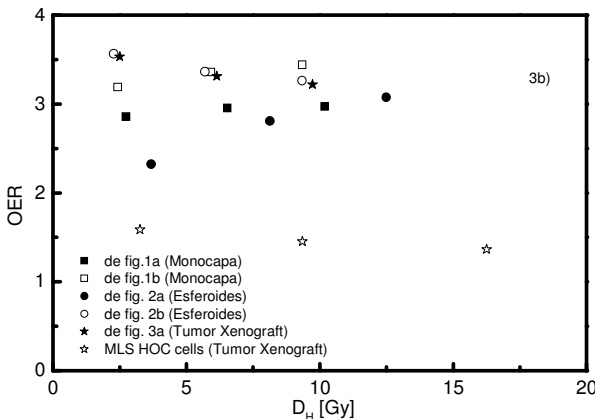
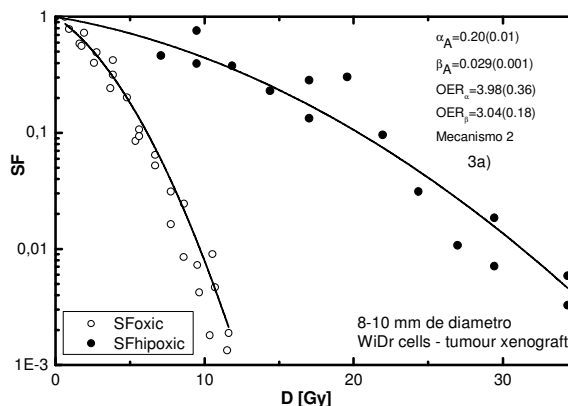


Figura 3. Panel a: SF versus la dosis (D). Ajuste usando ecuaciones (6) y (8). Panel b: OER vs la dosis (D_H) los

signos son los valores correspondientes a $SF=0.5, 0.1$ y 0.01

IV. CONCLUSIONES

Como se ha mencionado, el OER depende de muchos factores tales como la presión parcial de oxígeno, el tipo de tejido, la LET, que siempre es baja en todos los datos considerados, y la dosis de radiación local aplicada. Éste trabajo se enfoca en la dependencia de OER con la dosis. Se analiza como es esta dependencia y si cambia con la forma de crecimiento. En trabajos previos ⁶ se ha

observado que el factor OER depende no sólo de la línea celular y otros aspectos, sino también del modo en el cual se realiza el cultivo in-vitro, observándose mejor acuerdo entre resultados de irradiación in-vitro e in-vivo para el caso de esferoides. En el presente trabajo se analizan datos experimentales de otros sistemas existentes en la literatura. Se utiliza el modelo LQ, obteniéndose otros resultados, esto reafirma la diversidad característica del cáncer. Se estiman también los parámetros de radiosensibilidad que podrían ser de utilidad para la planificación de tratamientos clínicos.

Tabla 1. Se muestran los sistemas utilizados y los valores p para el F-test y los correspondientes pesos para el Akaike Test (AICc). También se informa el mecanismo correspondiente, que es el mismo para ambos tests en todos los casos.

Fig.	Línea Celular	Crecimiento como	Comparación de Ajustes		
			F-test	Pesos de Akaike	Mecanismo
1a	V79-379 A Chinese hamster cells (Carlson et al., 2006)	cultivo en monocapa	0.1782	0.5333	1
1b	WiDr cells (West y Sutherland, 1987)	cultivo en monocapa	0.1576	0.5368	1
	Chinese hamster ovary cells (CHO) (Hirayama et al., 2005)	cultivo en monocapa	0.8395	0.9886	1
2a	V79-379 A Chinese hamster cells (West et al., 1984)	cultivo en esferoides (200 μm diámetro)	0.0006	0.9982	2
2b	WiDr cells (West y Sutherland, 1987)	cultivo en esferoides (1200 μm diámetro)	0.0117	0.9057	2
	MLS Human Ovary Carcinoma cells (Rofstad and Sutherland, 1989)	cultivo en esferoides (1600 μm diámetro)	0.0038	0.9671	2
3a	WiDr cells (West y Sutherland, 1987)	tumor trasplantado (8-10 mm diámetro)	0.0287	0.8005	2
	MLS Human Ovary Carcinoma cells (Rofstad and Sutherland, 1989)	tumor trasplantado (200 mm^3 volumen)	0.0345	0.7716	2
	MLS Human Ovary carcinoma cells (Rofstad and Sutherland, 1989)	tumor trasplantado (2000 mm^3 volumen)	0.0018	0.9853	2

VI. REFERENCIAS

- Vaupel P, Mayer A. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26: 225-239.
- Carlson D. J., Stewart R. D. and Semenenko V. A., 2006. Effects of oxygen on intrinsic radiation sensitivity: A test of the relationship between aerobic and hypoxic linear-quadratic (LQ) model parameters. *Med. Phys.* 33 (9) 3105-3115.
- Alper T, Howard-Flanders P. 1956. Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E. coli B. *Nature* 178: 978-979.
- Wenzl T. and Wilkens J. J., 2011. Theoretical analysis of the dose dependence of the oxygen enhancement ratio and its relevance for clinical application. *Oncology* 6, 171.
- West C. M. L., Sutherland R. M., 1987. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids and in nude mice. *Radiat. Res.* 112, 105-115.
- Hirayama R., Furusawa Y., Fukawa T. and Ando K., 2005. Repair kinetics of DNA-DSB induced by X-rays of carbon ions under oxic and hypoxic conditions. *J. Radiat. Res.* 46, 325-332.
- West C. M. L., Sandhu R. R. and Stratford I. J., 1984. The radiation response of V79 human tumour multicellular spheroids – cell survival and growth delay studies. *Br. J. Cancer* 50, 143-151.
- Rofstad E. K. and Sutherland R. M., 1989. Growth and radiation sensitivity of the MLS human ovarian carcinoma cell line grown as multicellular spheroids and xenografted tumours. *Br. J. Cancer* 59: 28-35.
- Guerrero M, Stewart RD, Wang JZ, Allen Li X. 2002. Equivalence of the linear-quadratic and two-lesion kinetic models. *Phys Med Biol* 47: 3197-3209.
- Glatting G, Kletting P, Reske SN. 2007. Choosing the optimal fit function: Comparison of the Akaike information criterion and the F-test. *Med Phys* 34 (11): 4285-4292.
- Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* 273 (Cell Physiol 42): C1109-C1123.