

Variabilidad en radiobiología

Damián Guirado Llorente

Tesis de doctorado

Departamento de Física Atómica, Molecular y Nuclear
Departamento de Radiología y Medicina Física
Universidad de Granada



Granada, abril de 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Damián Guirado Llorente
D.L.: GR 3108-2012
ISBN: 978-84-9028-234-2

DEPARTAMENTO DE FÍSICA ATÓMICA, MOLECULAR Y NUCLEAR

ANTONIO M. LALLENA

Tel. (34)958243216

FAX (34)958249487

lallena@ugr.es

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GRANADA
E-18071 GRANADA
SPAIN

ANTONIO M. LALLENA ROJO, Catedrático de Física Atómica, Molecular y Nuclear de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación recogido en la presente memoria, titulada “**Variabilidad en radiobiología**” y presentada por D. **Damián Guirado Llorente** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Física Atómica, Molecular y Nuclear de la Universidad de Granada.

Granada, 2 de abril de 2012

El doctorando

Fdo.: Damián Guirado Llorente

DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA
E-18071 GRANADA
SPAIN

MERCEDES VILLALOBOS TORRES, Profesora Titular de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación recogido en la presente memoria, titulada “**Variabilidad en radiobiología**” y presentada por D. **Damián Guirado Llorente** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada, ha sido realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

Granada, 2 de abril de 2012

El doctorando

Fdo.: Damián Guirado Llorente

Agradecimientos

En sus “Meditaciones” Marco Aurelio evoca a sus familiares y a sus maestros agradeciendo con afecto lo que de ellos recibió. Dedicó a esto un libro entero (hoy diríamos capítulo), y muestra que no es nada nuevo extenderse ampliamente en ese menester. La primera vez que leí las “Meditaciones” pasé distraídamente ese capítulo primero; hoy, cuando las releo, siento especial predilección por semejante ejercicio de gratitud, siempre insuficiente.

Si bien el agradecimiento que expresa Marco Aurelio en sus “Meditaciones” se refiere a una situación general que contempla la vida entera, las que aquí se contienen deberían estar orientadas, al menos en principio, a reconocer lo que muchas personas, y la buena fortuna, han hecho para que esta memoria exista. No obstante, es difícil separar una buena parte de mi vida del material que se ha ido conformando en estas páginas; circunstancia debida principalmente a que el proceso que ha llevado a mi doctorado ha sido muy largo y el trabajo que presento aquí ocupa quince años de ejercicio profesional. Por ello, y como sucede tantas veces, hay personas que, sin contribuir a los elementos propiamente científicos de estas páginas, han sido fundamentales para que este trabajo se haya, por fin, completado. Valga esto como agradecimiento a ellas aunque no encuentren sus nombres más abajo.

Agradezco a mis padres su incondicional apoyo y el no haber perdido la esperanza de que esta tesis se completase.

A mis suegros, Pepe y Teresa, que siempre me trataron como a uno más de sus hijos, el haber creído en mí.

Parte del tiempo que correspondía a mi esposa y a mis hijos se ha consumido en este trabajo, les agradezco la paciencia que ha mostrado y sus ánimos.

A mis compañeros de Radiofísica y de Radioterapia del Hospital Clínico de Granada, y en particular a Diego, Toñi y Vicky, les agradezco el facilitarme mi labor y el ambiente de trabajo que contribuyen a crear.

Mónica, Juan Antonio y Luis han hecho parte de lo que, finalmente, ve la luz aquí. Les agradezco su disposición para cuantas veces les pedí algo.

Agradezco a mis amigos y colegas Jose Manuel y Rafael el hacerme fácil la vida, especialmente estos últimos meses; también su apoyo e insistencia para acabar el trabajo comenzado.

A mis residentes agradezco el haber creído, más que yo mismo, que tenía algo que enseñarles; esto ha sido un estímulo constante, también para terminar esta memoria. Ana, Samuel y Fernando han compartido conmigo estos últimos meses, perdonándome algún descuido y aliviándome de muchas tareas.

A mis amigos del Departamento de Física Atómica, Molecular y Nuclear y del Departamento de Radiología y Medicina Física, el haberme acogido siempre con buena disposición. Al profesor Vicente Pedraza le agradezco la confianza que siempre me mostró; a Nicolás Olea el haberme planteado el primer problema que enfrenté en radiobiología.

Agradezco a Ferás su amistad y el trabajo compartido, que está incluido en estas páginas.

A Mariano Ruiz de Almodóvar le agradezco su amistad y su entusiasmo por la ciencia, parte del trabajo que aquí presento es fruto de ese afán común.

A Maribel Gallardo le debo la organización de este material. Su confianza en que podía enseñar algo a sus alumnos me llevó al leitmotiv de esta memoria.

A Mercedes Villalobos y a Manuel Aranda les agradezco el poner a mi disposición todo un sistema experimental, su humanidad, su generosidad y su receptividad a las ideas que han cuajado en estas páginas.

De Manolo, amigo y mentor, he recibido siempre algo más que amistad. Las cosas que hemos hecho juntos han sido mejores de lo que hubiesen sido de otro modo.

A Antonio Lallena le agradezco su amistad, su magisterio y su paciencia. En este agradecimiento está implícito el que debo a mis maestros; Antonio reúne muchas de las cualidades más valiosas de todos ellos.

A Marcela, Pepe, Abraham e Israel

Índice

Prólogo	1
Introducción	3
La esencia de la práctica clínica es la variabilidad	3
El método Monte Carlo	5
Objeto de esta memoria	7
1. Individuación de la radioterapia fraccionada	9
1.1. Antecedentes	10
1.1.1. Calidad y radioterapia	10
1.1.2. Relaciones dosis-respuesta para los tumores	11
1.1.3. Respuesta de los tejidos sanos a la radiación	14
1.1.4. Tolerancia	15
1.1.5. Ensayos predictores de radiosensibilidad	17
1.2. Material y métodos	19
1.2.1. Roturas dobles del ADN	19
1.2.2. Distribución de probabilidad	19
1.2.3. Individuación del tratamiento	22
1.2.4. Procedimiento analítico	24
1.2.5. Simulación Monte Carlo	25
1.3. Resultados y discusión	25
1.3.1. Procedimiento analítico	25
1.3.2. Simulación Monte Carlo	27
1.4. Recapitulación	29

2. Crecimiento tumoral	31
2.1. Antecedentes	32
2.1.1. Los tumores	32
2.1.2. Los esferoides multicelulares como modelo de tumor	34
2.1.3. Modelos de crecimiento tumoral	37
2.1.4. Supervivencia celular	42
2.1.5. Crecimiento tumoral y radiosensibilidad	46
2.2. Material y métodos	47
2.2.1. Esferoides de la línea humana MCF-7 de cáncer de mama	47
2.2.2. Crecimiento de los esferoides de control	48
2.2.3. Crecimiento de los esferoides irradiados	50
2.2.4. Selección de los esferoides y métodos estadísticos	53
2.3. Resultados y discusión	54
2.3.1. Esferoides de control	54
2.3.2. Crecimiento de esferoides irradiados	56
2.3.3. Fracción de supervivencia	59
2.4. Recapitulación	62
3. Hipersensibilidad a bajas dosis	65
3.1. Antecedentes	66
3.2. Material y métodos	68
3.2.1. Cultivo celular	68
3.2.2. Irradiación y dosimetría	68
3.2.3. Selección y seguimiento de los esferoides	69
3.2.4. Modelos de supervivencia	70
3.2.5. Métodos estadísticos e incertidumbres	74
3.3. Resultados y discusión	74
3.4. Recapitulación	80

4. El tiempo en la radioterapia fraccionada	81
4.1. Antecedentes	82
4.1.1. La radioterapia fraccionada	82
4.1.2. Factor tiempo en radioterapia fraccionada	84
4.1.3. Repoblación acelerada	88
4.2. Material y métodos	89
4.2.1. Cinética tumoral	89
4.2.2. Procedimiento de simulación	90
4.2.3. Parámetros de las simulaciones	92
4.3. Resultados	96
4.3.1. Demora en el inicio de la radioterapia	97
4.3.2. Otro estudio retrospectivo	100
4.4. Discusión	102
4.5. Recapitulación	104
5. Conclusiones y perspectivas	107
5.1. Conclusión general	107
5.2. Conclusiones particulares	108
5.3. Perspectivas	109
Bibliografía	113

Prólogo

El trabajo que ha conducido a esta memoria empezó en el otoño de 1996; quizás no sea ese el momento exacto, pero lo tomo como referencia porque “10 de octubre de 1996” es la fecha que indico en mis notas sobre un artículo de Tucker, Thames y Taylor titulado *How well is the probability of tumor cure after fractionated irradiation described by Poisson statistics?*, publicado en la revista *Radiation Research* en 1990 [Tuc90]. En este artículo se compara la probabilidad de control tumoral tras una irradiación fraccionada que se calcula mediante el modelo de Poisson, con la probabilidad de control tumoral obtenida de una simulación en la que se consideran la muerte y la proliferación celulares mediante la estadística binomial. Antes que el resultado, que muestra cómo la estadística de Poisson subestima la probabilidad de control cuando la proliferación es importante, fueron los métodos empleados por los autores los que marcaron decisivamente mi quehacer durante varios años. La simulación numérica realizada por Tucker, Thames y Taylor me mostraba, de una forma en extremo simple, un método de trabajo sencillo y eficaz para tratar el problema del fraccionamiento en la radioterapia del cáncer; particularmente de la que había sido la razón por la cual me había enfrascado en el estudio de la radiobiología: el crecimiento tumoral y su efecto sobre el resultado de los tratamientos. Problema este de grandísima importancia en la clínica; naturalmente porque, en primer lugar, es “el problema” de toda la oncología, y, en segundo, porque se manifiesta en la pérdida de eficacia terapéutica de aquellos tratamientos que se interrumpen durante su desarrollo.

Hasta ese momento, como físico médico, cuando oía las palabras *simulación Monte Carlo* pensaba siempre en el transporte de radiación, en los códigos diseñados para simular la interacción de haces de fotones o partículas en un medio. Una poderosa herramienta que tantos problemas dosimétricos complejos ha solventado. Sin embargo, el problema que Tucker y sus colegas habían resuelto con la aplicación directa de una sencilla herramienta de simulación, me aportó un nuevo punto de vista y me animó a usarla en los asuntos que me preocupaban entonces y que, hoy, constituyen un importante estímulo de mi carrera.

Para facilitar una lectura sinóptica del material que conforma esta memoria, puede leerse el capítulo de introducción junto con las entradas y recapitulaciones de los restantes y las conclusiones.

Si usted tiene pluma mística, escribirá de Dios toda su vida, aunque no crea ni profese. Es el caso de Dostoiewski, de Unamuno y de otros pelmas. Si no tiene usted pluma mística, escribirá de las mozas, aunque sea arcipreste, y ahí está el de Hita. Hay plumas que se encandilan con el tema. La mía no. Hay plumas eróticas, plumas místicas, plumas líricas. Nunca se sabe. La pluma no tiene mucho que ver con el hombre. Eso lo sabe bien cualquiera que haya escrito cinco folios. Otro instrumento es quien tira de la pluma...

Si un tema nos sale, nos va, hay que tirar de él. Qué se le va a hacer. Aunque sea a la fuerza. Y el que se rebela contra su pluma está perdido.

Francisco Umbral.
Mortal y rosa, 1975.

Introducción

La esencia de la práctica clínica es la variabilidad

En una importante medida, el impulso que alienta esta memoria está en el deseo de mejorar la práctica de la radioterapia; mejora a la que han contribuido sobremanera los físicos médicos, no sólo en las cuestiones técnicas que la permiten y afectan, sino en el avance de la radiobiología [Ber04]. Por ello, aunque también atenderemos a cuestiones más teóricas, como la forma de la curva de supervivencia de una población celular tras ser irradiada, nos ocupamos de asuntos que afectan inmediatamente a la práctica clínica, como son el afán de que los esquemas terapéuticos se adapten a cada paciente en particular o la importancia de la demora y la interrupción de la radioterapia fraccionada.

En estas páginas aparecen unidas las palabras *clínica* y *variabilidad*, como si esta unión fuese circunstancial y atañese al objeto de estudio que nos ocupa en esta ocasión por puro azar o conveniencia; sin embargo, la palabra clínica (entendida como práctica clínica) contiene también el sentido de la palabra variabilidad, pues se refiere a una actividad concreta e individual aplicada a cada persona que deviene en un paciente particular. Por consiguiente, la actividad clínica lo es porque los pacientes son distintos entre sí y presentan variabilidad en sus condiciones y respuesta a los tratamientos que, en todo caso, deberían planearse atendiendo a la situación particular de cada individuo.

En muchos problemas que se nos plantean en la práctica clínica o en la investigación básica, la variabilidad parece ser un elemento que contribuye al oscurecimiento de su solución y, por tanto, nos exige el uso de herramientas que la limiten o superen: aumento del tamaño de la muestra experimental, métodos estadísticos de análisis apropiados, pericia en el diseño de los ensayos o experimentos y otras. Si bien lo anterior es cierto de un modo inapelable, al menos desde determinado punto de vista, esta certeza no impide tratar de contemplar la variabilidad con un cambio de perspectiva.

Si la variabilidad es consustancial a un determinado problema, quizás sea mejor considerarla como un elemento más que debe incorporarse a la solución que, sencillamente, como un velo que impide contemplarla con nitidez. Es decir, la solución del problema, o las herramientas que la esclarezcan, pueden incluir la variabilidad junto a otros elementos. Así la variabilidad se hace parte del objeto de estudio y, por tanto, para conocer este objeto, hay que caracterizarla y describirla junto al resto de elementos que lo conforman. No se trata, pues, de superar la variabilidad para dar cuenta de los elementos “fundamentales” del problema que estudiamos mediante herramientas que, una vez aplicadas, la dejen atrás.

Así, en uno de los casos que desarrollamos más adelante, en el que se analiza el efecto de las demoras en el resultado de la radioterapia fraccionada, podemos emplear, sobre una población de pacientes que ha seguido un programa terapéutico, las herramientas estadísticas usuales que nos permitan esclarecer, con el grado de incertidumbre correspondiente, la relación entre el tiempo de espera para comenzar un tratamiento y la pérdida de control tumoral respecto de un tratamiento que ha comenzado sin demora. Aquí asumimos que un aumento del tamaño de la muestra con el uso de herramientas estadísticas adecuadas permitirá obtener esta relación con mayor certidumbre. Hay, no obstante, una alternativa a este punto de vista; si caracterizamos la variabilidad de una población objeto de estudio en los aspectos relevantes para el problema que nos ocupa (y cuya enumeración es también un problema a resolver), por ejemplo, dosis total, dosis por fracción, sensibilidad a la radiación, proliferación tumoral y otras, podremos establecer las distribuciones de probabilidad de las variables importantes y, una vez conocidas, analizar la respuesta de cada paciente individual caracterizado por un valor concreto de ese conjunto de variables. Se hace así de la variabilidad un objeto de estudio, y no un objeto cualquiera, sino un elemento fundamental por sí y para el problema en su conjunto.

En otras situaciones, los resultados del análisis de una serie de datos dependen de que se consideren valores poblacionales o individuales para los parámetros objeto de estudio. Así sucede en la observación del modo en que afecta la radiación al crecimiento de los esferoides multicelulares. Aunque los esferoides estén cultivados en idénticas condiciones y sufran la misma manipulación, las curvas de crecimiento de cada uno de ellos es particular y diferente de la del resto (no en su forma funcional general, sino en los parámetros que la describen en cada caso concreto). La constatación de esta variabilidad nos obliga a realizar el análisis del crecimiento de cada esferoide en particular, pues si hacemos el tratamiento de la media hay aspectos del problema que no podríamos esclarecer. Siguiendo esta idea demostraremos que el modo en que la radiación afecta a la recuperación del ritmo de crecimiento no puede observarse a partir de un tratamiento estadístico de la población promedio, y sí en la consideración individual de cada esferoide. Esto nos indica inmediatamente que la variabilidad observada está en el centro de nuestro objeto de estudio, y no es sólo un producto de la incertidumbre experimental. Así, es importante distinguir entre incertidumbre y variabilidad inherente al proceso estudiado.

Hay casos en los que no es una cuestión de variabilidad estadística lo que media entre los datos y la solución del problema, sino que la variabilidad puede incorporarse directamente en el modelo que describe esos datos; así sucede en el estudio que desarrollamos aquí sobre la hipersensibilidad a baja dosis mediante el ensayo de recrecimiento de esferoides multicelulares. La forma de la curva de supervivencia de las células que componen los esferoides en la región de baja dosis, puede explicarse como una consecuencia de la variabilidad en la dosis absorbida para la que cada célula activa los mecanismos de reparación con que hace frente al daño que la radiación le inflige.

Otras veces, por último, la variabilidad es el problema clínico fundamental; como sucede en la individuación de la radioterapia. Nos gustaría saber la sensibilidad, tumoral y del tejido sano, que corresponde a cada uno de los pacientes que van a seguir un determinado programa terapéutico y, a partir de ese conocimiento, establecer un tratamiento adecuado para cada paciente en particular realizando la máxima aspiración que contienen las palabras práctica clínica.

A modo de resumen puede decirse que, en todos los problemas que se abordan en esta memoria, la clave en la solución planteada consiste en considerar de manera explícita

y fundamental la variabilidad. Procediendo de este modo podemos aspirar a una visión del asunto tratado más completa que la aportada por otros métodos de trabajo, pues se alcanza, además de la relación buscada, un conocimiento sobre las distribuciones de probabilidad de las variables relevantes en el problema. Para no confundir este planteamiento con una idea bien asentada en radiobiología, es preciso en este punto concretar un poco más el sentido de lo afirmado hasta aquí.

Es conocido que la variabilidad juega un papel fundamental en muchos problemas de la radiobiología. Así, la diferencia en la respuesta entre individuos sometidos a tratamientos semejantes produce curvas poblacionales para la probabilidad de control tumoral con menor pendiente, esto es, distribuciones de frecuencia más anchas, que las que corresponderían a individuos concretos o a poblaciones muy homogéneas. Por tanto, no planteamos aquí la proposición bien conocida, y probada, de que la variabilidad es importante en los problemas de la radiobiología (la radiobiología clínica en particular), sino que, partiendo de este conocimiento, enunciamos la tesis de que la variabilidad debe ser considerada explícitamente en las herramientas de análisis o en los modelos empleados para describir el objeto de nuestra investigación, de tal manera que las distribuciones de probabilidad de las variables relevantes en el problema son también objeto y producto de esa investigación.

Hablar de variabilidad nos lleva casi inmediatamente a pensar en el método Monte Carlo, empleado hoy con profusión en las más diversas ramas de la ciencia y la tecnología y origen, en la ya lejana lectura de 1996, de esta memoria; le dedicamos el siguiente apartado.

El método Monte Carlo

Íntimamente asociada a las palabras *método Monte Carlo* está la palabra *simulación*, y en el contexto de la física médica suelen utilizarse de manera conjunta: *simulación Monte Carlo*. Es pertinente comentar algunas sutilezas que, tal vez, no tienen ninguna relevancia práctica, pero que nos permitirán acotar el espacio abarcado por los métodos que emplearemos más tarde.

Empecemos con el método Monte Carlo. Por lo general, suele llamarse así a cualquier procedimiento matemático cuya esencia sea el uso de un generador de números aleatorios. Aunque el método Monte Carlo puede utilizarse para resolver problemas deterministas, su nombre proviene de la naturaleza estocástica del problema original al que fue aplicado por von Neumann y Ulam: la difusión de neutrones en un material fisionable [Rub81] y, claro está, de la famosa localidad del principado de Mónaco. A principios del pasado siglo, y antes de ser llamado así [Met49], el método Monte Carlo ya se utilizó para estudiar la ecuación de Boltzmann y, en 1908, Student (cuyo verdadero nombre fue Gosset) lo usó para determinar el coeficiente de correlación de su famosa distribución *t*. Sin embargo, hasta que aparecieron las calculadoras, primero, y los ordenadores, después, el método no alcanzó una amplia difusión, debido a que es muy laborioso el cálculo a mano de las variables aleatorias necesarias para su aplicación. El método Monte Carlo es así un método numérico (un método estadístico) que permite resolver problemas matemáticos mediante la simulación de variables aleatorias.

Por lo que se refiere a la simulación, podemos adoptar una definición muy general como la de Naylor et al. de 1966 (citado en [Rub81]): “*La simulación es una técnica*

numérica para producir experimentos en un ordenador, lo cual involucra ciertos tipos de modelos matemáticos y lógicos para describir el comportamiento del sistema [sobre el que se realizan los experimentos] en un período de tiempo". En esta definición, una idea clave es la proyección en el tiempo de la capacidad de la simulación para predecir lo que acontecerá en el sistema. Podemos así decir que, en un sentido amplio, la simulación es una técnica para realizar experimentos virtuales sobre el modelo de sistema que se estudia; mientras que, en un sentido restringido, la simulación se define como un experimento con el modelo que incluye el muestreo de variables estocásticas a partir de ciertas distribuciones de probabilidad. A este tipo de simulaciones se las conoce como simulaciones estocásticas. Debido a que el muestreo desde una distribución particular supone el uso de números aleatorios, la simulación estocástica suele llamarse simulación Monte Carlo. La razón de tal nombre no es otra que la asociación entre la bolita que recorre la ruleta hasta detenerse en un determinado número (aquí el azar pasa necesariamente por el juego limpio), y el algoritmo computacional que permite extraer un determinado número a partir de una cierta distribución de probabilidad (aquí el azar pasa necesariamente por una buena rutina de generación de número aleatorios).

En resumen, la simulación Monte Carlo consiste en realizar mediante un ordenador muchos estados posibles para el modelo de un sistema, empleando distribuciones de probabilidad que describan adecuadamente las variables aleatorias relevantes del modelo. Cada realización concreta exige tomar por sorteo un determinado valor para cada variable aleatoria relevante y, a partir del escenario creado por ese conjunto de valores de las variables, el cálculo de la magnitud que nos interesa; la repetición de este cálculo un determinado número de veces nos llevará a un conjunto de realizaciones de la magnitud o magnitudes problema y, naturalmente, a una distribución para ellas.

En el área de la física médica, las palabras método Monte Carlo (o simulación Monte Carlo que, salvando las sutilezas antes apuntadas, consideramos a partir de ahora como equivalentes) suelen estar ligadas al transporte de radiación; así que podría pensarse que, en lo que sigue, se tratará sobre aplicaciones exóticas de esta herramienta. Como si el carácter supuestamente periférico de la radiobiología impusiese al propio método Monte Carlo un ejercicio de adaptación singular. Pero ese no es el caso y, como se verá, en esta memoria se hacen aplicaciones directas del método Monte Carlo que bien pueden tomarse como ejemplos sencillos de una introducción al uso de esta herramienta. Bien que con una atinada formulación del problema que nos ocupa, ya que ésta suele ser la clave para resolverlo, y no, como podría pensarse, la capacidad de que nos dota una herramienta compleja que, como veremos, no es tal.

En esta memoria trataremos varias aplicaciones directas, en el sentido en que no precisan de códigos complejos ya diseñados, del método Monte Carlo a la radiobiología. Unas veces la variabilidad está relacionada inmediatamente con la que puede encontrarse en características bien determinadas de una población celular o un conjunto de pacientes. Otras veces las distribuciones de probabilidad son útiles en el proceso, pero no podemos asegurar de ellas que representen la realidad biológica que subyace a los datos; este es el caso en la simulación de tratamientos fraccionados, donde son posibles varios escenarios para describir el mismo conjunto de datos experimentales. Como sucede tantas veces, aquí el modelo es, aparentemente, sólo un artificio útil para alcanzar una solución que no está vedada a otros procedimientos, pero que con éste permite alcanzar un escenario más completo para la solución. Porque, aunque es posible calcular magnitudes medias mediante expresiones

analíticas en algunos casos, la solución mediante métodos de simulación suele ser sencilla y produce, por añadidura, el conocimiento sobre las distribuciones de probabilidad que buscamos. Así sucede en el problema de la individuación de la radioterapia: podemos conocer la ganancia media que supone la individuación del programa de radioterapia fraccionada, pero sólo si usamos métodos Monte Carlo podemos entender que existen pacientes para los cuales esta ganancia es enorme y conocer su proporción exacta en la población que nos interesa. Vía que nos conduce, una vez más, al íntimo y alentador sentido de las palabras “práctica clínica”.

Objeto de esta memoria

Nuestra tesis es que, en ciertos problemas de la radiobiología, la clave para una solución satisfactoria está en la consideración específica y fundamental de la variabilidad, bien como parte de los métodos de análisis, bien integrada en los modelos biológicos. Esta forma de proceder proporciona, además, información valiosa sobre la distribución de probabilidad de las variables relevantes en esos problemas.

Para probarla trataremos varias cuestiones actuales de interés en radiobiología, particularmente en la radiobiología clínica. Así, en el primer capítulo estudiaremos qué cabe esperar de la individuación de la radioterapia fraccionada mediante un ensayo que, de existir, predijese adecuadamente la respuesta de cada paciente en particular a un cierto esquema terapéutico. En el segundo estudiaremos el crecimiento tumoral aplicado a un modelo *in vitro*: los esferoides multicelulares; y desarrollaremos un método que nos permitirá obtener la fracción de supervivencia mediante un ensayo que produce una perturbación mínima del sistema experimental. En el tercer capítulo emplearemos las herramientas desarrolladas en los precedentes para estudiar la hipersensibilidad a baja dosis en los esferoides multicelulares, y enunciaremos un nuevo modelo para describirla. En el capítulo 4 estudiaremos el efecto del tiempo en el resultado de la radioterapia fraccionada, que se materializa en una pérdida de la efectividad de los tratamientos cuando hay demoras o interrupciones, mediante métodos de simulación Monte Carlo, utilizando muchos de los desarrollos alcanzados en los capítulos precedentes. Finalmente, enunciaremos las conclusiones y perspectivas del trabajo expuesto en los cuatro capítulos que acaban de describirse.

Aunque el nexo de unión entre los diferentes asuntos que tratamos sea la forma en que se considera la variabilidad en los modelos o herramientas de análisis, cada capítulo contiene elementos particulares a los que iremos dando forma y solución en su desarrollo, y que mostrarán muchos matices distintos que van algo más allá de la tesis que los reúne aquí.

...la lógica de la Clínica es la propia de la incertidumbre. Nunca seremos capaces de agotar la riqueza de una realidad concreta, razón por la cual nuestros juicios sobre ella serán como máximo "probables".

Diego Gracia.

La deliberación moral: el método de la ética clínica, 2004.

Capítulo 1

Individuación de la radioterapia fraccionada

Es sabido que el grado de los efectos secundarios padecidos por diferentes pacientes sometidos a un mismo programa de radioterapia puede ser muy distinto, desde indetectable para algunos de ellos hasta muy severo para otros. Aunque en ciertos casos estas diferencias pueden atribuirse a variaciones en factores extrínsecos, como la dosis absorbida o el volumen irradiado, en la mayoría de ocasiones sólo las diferencias de la radiosensibilidad entre pacientes pueden explicarlas [Tuc92, Tur96]. Y esto sin considerar la existencia de personas que muestran peculiaridades genéticas, como la *ataxia telangiectasia*, que las hacen especialmente sensibles a la radiación. Por ello, una de las aspiraciones de la radioterapia consiste en hallar un ensayo, de realización relativamente rápida y sencilla, que permita predecir la radiosensibilidad de los tejidos sanos de cada paciente. De manera que puedan identificarse, en primer lugar, aquellos individuos susceptibles de sufrir efectos secundarios muy severos como consecuencia del tratamiento, y, si es posible, adaptar para el resto sus esquemas terapéuticos a esa predicción.

En este capítulo veremos, primero, que es posible un conocimiento general sobre la forma de la distribución de probabilidad de la radiosensibilidad en una población de pacientes. Lo que supone poder realizar estimaciones de los beneficios que proporcionaría un ensayo clínico para determinarla. Después estudiaremos la diferencia entre la aplicación de un método analítico y el empleo del método Monte Carlo para realizar esa estimación del beneficio. Con el uso del primero pueden obtenerse datos generales sobre la población de pacientes, pero nos perdemos otros de gran interés, porque atañen a lo que cabe esperar para cada individuo en particular. Tenemos así, en este ejemplo importante en la práctica de la radioterapia, la doble vertiente a la que aludíamos antes: por un lado, que la variabilidad, consustancial al problema clínico que nos ocupa, puede expresarse con distribuciones adecuadas que son la esencia del problema mismo; por otro, que el uso de herramientas estadísticas que tengan en cuenta la variabilidad, como el método Monte Carlo, proporciona una valiosa información que no podría obtenerse con los métodos clásicos.

Lo más sustancial de este capítulo ha sido publicado en [Gui01, Rui02, Gui03c, Gui07, Nun08].

1.1. Antecedentes

1.1.1. Calidad y radioterapia

La calidad es hoy un distintivo que se exige en muy diversas parcelas de la actividad humana, naturalmente también en medicina. Es preciso, por tanto, si practicamos la radioterapia, saber cuándo nuestros pacientes han recibido un tratamiento de calidad; para ello hemos de adoptar una definición de calidad y, ciertamente, hay muchas formas de aproximarse a ella. Aquí la entenderemos como “el conjunto de características de un proceso radioterapéutico que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades establecidas y las implícitas del paciente” [RD98]. Así pues, la calidad debe satisfacer las necesidades establecidas por algún tipo de contrato entre el paciente y el departamento de radioterapia. El consentimiento informado puede hacer las veces de tal contrato, y debe expresar tanto las pretensiones del tratamiento como sus riesgos [Gui09]. Por tanto, se refiere en primer lugar a la intención terapéutica, que puede ser *radical* o *paliativa*.

Un tratamiento tiene intención radical cuando pretende disminuir el número de células tumorales hasta un nivel con el que se consiga el control local permanente del tumor. En el caso de un tratamiento con intención paliativa, se persigue disminuir los síntomas, por ejemplo, el dolor cuando existen metástasis óseas. Por tanto, la mejoría del paciente se refiere a la finalidad establecida por el oncólogo radioterápico en el inicio del proceso de tratamiento. Puesto que la irradiación de células tumorales se hace a costa de irradiar también tejidos sanos, esperamos efectos secundarios que, en función de la situación particular de cada paciente, obligan a establecer si el tratamiento es o no aceptable; lo que, a su vez, exigirá la elección de una técnica terapéutica adecuada al caso.

Debemos matizar ahora dos cosas. Primero, que es usual aplicar la radioterapia junto con cirugía o quimioterapia y, por consiguiente, es difícil contemplar el resultado de un tratamiento atendiendo exclusivamente al efecto de la radiación. Segundo, que las definiciones de los volúmenes relevantes para el tratamiento están sujetas a incertidumbres y, en ciertos casos, no podrán incluir todos los tejidos en los que existe enfermedad. Si un tratamiento no se aplica a sabiendas en todo el volumen en el que se sospecha la existencia de enfermedad, no podrá considerarse radical y, por tanto, si no se produce la curación no debemos hablar de fracaso, sino de una falta de previsión al definir los objetivos.

Para comparar el efecto final de un tratamiento con su intención debemos establecer para cada caso particular la forma en que se valora el resultado terapéutico. Esto pasa por el seguimiento del paciente durante años: periódicamente registraremos la evolución de cada individuo en lo que se refiere al tumor, si está controlado o aparecen recidivas; y en lo que respecta a los tejidos sanos, de manera que se observe el desarrollo de los efectos crónicos de la radiación. De este modo se genera la retroactividad en el proceso radioterápico que permite cerrar el bucle de la calidad: el conocimiento de los efectos a largo plazo nos permite diseñar estrategias de tratamiento cuyos resultados sólo se entenderán tras un largo seguimiento de los pacientes. Por tanto, la programación de un tratamiento depende del conocimiento de los resultados de otros tratamientos, lo que supone el análisis de distribuciones estadísticas para conjuntos de pacientes suficientemente grandes para los que se tengan datos de buena calidad, es decir, obtenidos con un control adecuado de los registros y de todas las variables que intervienen en el procedimiento: volúmenes irradiados, distribuciones de dosis en esos volúmenes y otras. Sólo así alcanzaremos un

nivel de conocimientos adecuado que nos permita establecer el objetivo de la terapia con precisión y evaluar, también con precisión, si el resultado se corresponde o no con lo pretendido. Veremos en el siguiente apartado cómo se cuantifican esas relaciones dosis-efecto en la radioterapia del cáncer.

1.1.2. Relaciones dosis-respuesta para los tumores

Una relación dosis-respuesta es la expresión matemática de la variación con la dosis absorbida de un determinado efecto sobre un tejido o un cultivo celular. Así, los primeros ejemplos de relaciones de dosis-respuesta son las curvas de supervivencia que se verán con cierto detalle en el capítulo 2. En ese caso el efecto es la fracción de células supervivientes, que es una función decreciente de la dosis absorbida.

No obstante, cuando hablamos de relación dosis-respuesta, por lo común nos referimos a la relación entre un efecto global sobre el tejido, entendido como un conjunto de síntomas clínicos, y la dosis absorbida en ese tejido; en general, a diferencia de lo que sucede para la supervivencia, estas curvas representan una función creciente con la dosis absorbida: la gravedad o probabilidad del efecto aumentan cuando la dosis absorbida aumenta. Por ejemplo, la descamación seca y la descamación húmeda son dos efectos distintos que se valoran en la piel y cuya incidencia aumenta con la dosis absorbida.

Para los tumores lo que más nos interesa es la probabilidad de control tumoral (*tumor control probability*, TCP), por cuanto el objetivo del tratamiento es la destrucción de todo crecimiento maligno. Para un paciente en particular, después de un programa de radioterapia completo, el control tumoral se producirá o no; es decir, la respuesta a la pregunta ¿hay control local de la enfermedad?, será sí o no. Para cada paciente que recibe un determinado esquema de tratamiento en unas determinadas condiciones (definido por su dosis total, dosis por fracción, tiempo de tratamiento, etc.), y si suponemos que todas las células tumorales son irradiadas hasta la misma dosis absorbida, la función dosis-respuesta será prácticamente un escalón: no hay curación si la dosis está por debajo de cierto valor (la función toma el valor 0) y sí la hay cuando lo supera (la función vale 1). En realidad, la naturaleza probabilística de la muerte celular hace que este escalón no sea perfecto y, más que una dosis concreta que separa la curación de la falta de curación, tenemos un pequeño intervalo de dosis para el que la probabilidad de curación va pasando desde 0 hasta 1. En la figura 1.1a se representa la curva de probabilidad de control tumoral para 5 pacientes diferentes (o grupos de pacientes muy homogéneos en cuanto a las características de su enfermedad y del tratamiento que reciben); están separadas porque cada paciente y cada tratamiento particular tienen características propias: número de células tumorales, sensibilidad de estas células a la radiación, forma de administrar la dosis y otras. Si suponemos ahora que el tratamiento de un paciente en particular puede darse de formas ligeramente distintas, de manera que la distribución de dosis no sea uniforme ni exactamente la misma en todos los casos; este escalón abrupto se suaviza un poco, lo que se traduce en una menor pendiente de la curva de probabilidad de control: los “defectos” en la distribución de dosis inclinan la curva. Estos defectos proceden de las incertidumbres asociadas al cálculo de la propia distribución de dosis, de las incertidumbres en la definición de los volúmenes de interés y de los errores en la administración de los tratamientos. En la figura 1.1a se ha representado el efecto global de todo esto sobre la curva de TCP del paciente número 3 mediante una línea de puntos.

Pero las causas de la mezcla estadística no acaban aquí; además de todo lo anterior, no conocemos la dosis por encima de la cual se produciría la curación para un paciente en particular, y sólo tenemos una idea estadística de la probabilidad de curación a partir del análisis de los resultados de muchos tratamientos semejantes aplicados a grupos extensos de pacientes. Esto supone que la curva de probabilidad de control de la población se obtiene como promedio de las curvas individuales, y que su pendiente se hace todavía más pequeña. En la figura 1.1a se representa en línea de trazos la curva correspondiente a la probabilidad de control tumoral para la población de pacientes en su conjunto.

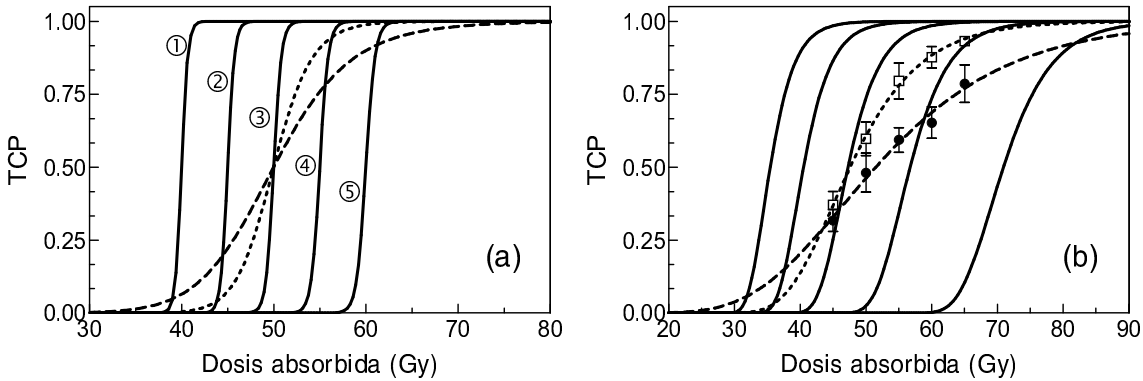


Figura 1.1: (a) Curvas de probabilidad de control tumoral para 5 pacientes individuales o conjuntos de pacientes muy homogéneos (líneas continuas), y para la población en su conjunto (línea de trazos). La variabilidad en la distribución de la dosis absorbida produce curvas de control con menor pendiente aunque el grupo de pacientes sea muy homogéneo, así lo muestra la línea de puntos para el paciente número 3. (b) Curvas de TCP para el modelo de Poisson en diferentes situaciones: las curvas continuas corresponden a grupos de pacientes en los que el número de células tumorales y la radiosensibilidad son constantes; las líneas de puntos y trazos corresponden a los ajustes de la ecuación (1.3) a simulaciones en las que se hacen variar, respectivamente, la radiosensibilidad exclusivamente y la radiosensibilidad y el número de clonógenos de manera conjunta.

Para describir las curvas de probabilidad de control puede emplearse un modelo basado en la biología del problema (es lo que solemos llamar modelo mecanicista, puesto que trata de explicar el fenómeno biológico a partir de leyes mecánicas que cumple el mundo inorgánico): el control local es consecuencia de la muerte de las células que componen el tumor, y todas ellas son idénticas en cuanto a su respuesta a la radiación. Como la naturaleza de la supervivencia celular es probabilística y sigue una distribución binomial, puede describirse aproximadamente mediante el modelo de Poisson. Por tanto, el control tumoral, que se produce si no existen células tumorales tras el tratamiento, tiene una probabilidad expresada por:

$$\text{TCP}(d) = \exp(-N), \quad (1.1)$$

donde N es el número de células tumorales supervivientes tras un cierto esquema de tratamiento con dosis total d . Si ahora tomamos la supervivencia a partir del modelo lineal cuadrático (que se verá con detalle en el capítulo 2), podremos expresar N del modo conocido:

$$\text{TCP}(d) = N_0 \exp(-\alpha d - \beta d^2), \quad (1.2)$$

donde N_0 es el número de células tumorales al inicio del tratamiento. Simplificamos un poco las cosas, y para nuestro análisis es adecuado hacerlo, si tomamos sólo el término lineal de la ecuación anterior para llevarlo a la expresión de la probabilidad de control tumoral:

$$\text{TCP}(d) = N_0 \exp(-\alpha d). \quad (1.3)$$

Esta relación hace depender la probabilidad de control de tres magnitudes: una asociada al tamaño tumoral, N_0 , otra a la sensibilidad de la población celular irradiada, α , y, por último, la que asociamos con la intensidad del tratamiento, la dosis total del esquema terapéutico, d . Las dos primeras dependen del paciente, la tercera del criterio clínico. Volveremos sobre esta cuestión más tarde.

A partir de la ecuación (1.3) analizaremos los efectos de la mezcla estadística sobre nuestro conocimiento de la curva de control tumoral. Fijado un número de clonógenos tumorales (en el ejemplo 10^6), cada una de las líneas continuas de la figura 1.1b representa la probabilidad de control que cabe esperar, a partir de la ecuación de Poisson, para un conjunto de pacientes agrupados por su radiosensibilidad; es decir, cada curva corresponde a un valor de α (que va de 0.2 Gy^{-1} a 0.4 Gy^{-1}). Es más fácil curar los tumores más sensibles (mayor valor de α). Si tomamos ahora una población de pacientes compuesta por individuos de los que desconocemos su radiosensibilidad, y realizamos una simulación en la que α varía de unos a otros según una distribución normal $\mathcal{N}[0.3 \text{ Gy}^{-1}, 0.05 \text{ Gy}^{-1}]$ con un tamaño tumoral idéntico para todos los pacientes (esos 10^6 clonógenos), observamos el efecto de la mezcla de poblaciones en la curva representada por la línea de puntos: la pendiente disminuye. Si, además, el número de clonógenos es también variable, de acuerdo con una distribución uniforme $\mathcal{U}[10^4, 10^9]$, la pendiente disminuye todavía más (línea de trazos). Esto puede traducirse en algo muy importante en todo este asunto: si fuésemos capaces de conocer las características de cada paciente en particular respecto de su tamaño tumoral (expresado como número de clonógenos) y de la radiosensibilidad de las células que integran el tumor, sería más sencillo relacionar la dosis de tratamiento con la probabilidad de control y, por tanto, más fácil la prescripción.

La figura 1.1b se ha confeccionado para poder fijar nuestra atención en otros detalles interesantes además de los ya expuestos. En primer lugar, se ha hecho una representación para las poblaciones con mezcla estadística basada en un conjunto pequeño de puntos con sus incertidumbres (que corresponden a un intervalo de confianza del 95%). Los puntos se han obtenido considerando un grupo de 100 pacientes para cada dosis y realizando un sorteo aleatorio de las características tumorales (tamaño y sensibilidad) de cada uno de ellos para, finalmente, obtener el valor medio de la TCP de la muestra. Este número de pacientes, 500 en total, y el rango de dosis, de 45 a 65 Gy, son mayores de lo habitual en los estudios clínicos.

En el “experimento virtual” que acabamos de realizar están perfectamente controlados los parámetros biológicos (número de clonógenos y radiosensibilidad) y físicos (la dosis absorbida y su distribución); aun así, se aprecia que la incertidumbre asociada a los datos es importante y el rango de dosis para el que se obtienen pequeño. Podemos, por tanto, hacernos una idea de las dificultades que nos encontramos en los estudios clínicos para obtener una relación dosis-respuesta.

Además de la curva de Poisson para la TCP, es habitual utilizar expresiones empíricas para describir las curvas sigmoideas que relacionan la probabilidad de control tumoral

tras un tratamiento con la dosis absorbida. Éstas pueden caracterizarse por un parámetro relacionado con su pendiente en un punto significativo, γ , y por el valor de la dosis que produce un 50 % de probabilidad de control, D_{50} ; dos parámetros conocidos por su relevancia clínica [Kal92]. Así, una expresión matemática que permite describirlas adecuadamente es la del modelo logístico:

$$\text{TCP}(d) = \left[1 + \left(\frac{D_{50}}{d} \right)^{4\gamma} \right]^{-1}. \quad (1.4)$$

D_{50} y γ dependen del esquema de fraccionamiento y de todos los factores indicados antes.

En los tumores humanos los valores de D_{50} varían mucho de unos casos a otros; como se ve en la figura 1.1, esta dosis nos indica la posición de la curva de dosis-respuesta. Para un caso de cáncer de laringe, por ejemplo, en el que la radiosensibilidad de las células tumorales sea alta, el volumen tumoral pequeño y el programa terapéutico adecuado, puede estar en torno a los 50 Gy. Sin embargo, en un caso con volumen tumoral grande (T3 ó T4) y radiosensibilidad intermedia, aunque la técnica de tratamiento sea muy buena, el valor de D_{50} puede llegar a 70 Gy. Con respecto a los valores de γ , podemos afirmar que para los tumores de cabeza y cuello están entre 1.5 y 2.5 [Ben02]; esto quiere decir que la heterogeneidad en la población analizada para establecer la relación dosis-respuesta es grande. Podemos aclarar esto prestando atención de nuevo a la figura 1.1b. Allí, cuando se fijan el número de clonógenos y el parámetro de radiosensibilidad, los valores de γ son todos iguales a 5.1 (líneas continuas); sin embargo, si se tiene en cuenta la variabilidad en el parámetro de radiosensibilidad (línea de puntos), $\gamma = 2.2$; y cuando hay variabilidad en α y en el número de clonógenos, $\gamma = 1.3$. Notemos por último, que el valor de D_{50} también aumenta con la variabilidad: pasa de 47.7 Gy cuando sólo varía α , a 51.5 Gy cuando varían α y N .

Como primera consecuencia puede establecerse que obtenemos ciertas ventajas si separamos los tumores por estadios, esto hará que la curva dosis-respuesta que corresponde a cada grupo se parezca más a un escalón y que su posición esté más localizada. No debe sorprendernos que el modelo teórico reproduzca la práctica habitual, resultado de la experiencia clínica, que consiste en prescribir más dosis para los tumores avanzados y con mayor tamaño. Debe llamarse la atención, sin embargo, sobre el hecho de que aspiramos a que esta aproximación empírica relativamente grosera sea sustituida por un empleo más frecuente de los modelos teóricos, cuando los datos clínicos permitan disponer de parámetros más correctos y podamos confiar en sus predicciones.

1.1.3. Respuesta de los tejidos sanos a la radiación

Si para los tumores lo que más nos interesa es la probabilidad de control tumoral, para los tejidos sanos queremos saber cuál es la incidencia de efectos secundarios, esto es, la probabilidad de que se produzca un determinado efecto adverso. Al igual que la TCP crece cuando aumenta la dosis absorbida, también lo hace el riesgo de que se produzcan efectos adversos. No obstante, mientras que para los tumores el efecto considerado siempre se conoce tras un seguimiento muy largo, para los tejidos sanos tenemos dos tipos de efectos en cuanto al momento de su aparición: *preoces* y *tardíos*. Para estos últimos, que suelen ser los determinantes para limitar las dosis en radioterapia, el tiempo de seguimiento también

es necesariamente muy largo, mientras que para los efectos precoces bastan unas semanas de observación, durante y tras la radioterapia, para conocer completamente su incidencia.

Las consideraciones hechas en el apartado anterior sobre la influencia de la variabilidad estadística entre pacientes, o la incertidumbre en el conocimiento de las distribuciones de dosis en los volúmenes de interés, pueden aplicarse también a los tejidos sanos. Una estratificación de los datos (agrupamiento que limita su heterogeneidad estadística) permite mejorar el conocimiento sobre la posición y la pendiente de la curva dosis-respuesta. En general, puede decirse que el valor de γ para la respuesta crónica de los tejidos sanos puede ser mayor que para los tumores, y oscila entre 1 y 6 [Ben02]. La razón de esto hay que buscarla en una mayor homogeneidad para la respuesta biológica de los tejidos sanos de individuos diferentes, frente a una mayor heterogeneidad de los tumores. Este argumento es consistente con el hecho de que los valores de γ más pequeños aparecen en órganos donde la heterogeneidad en la distribución de dosis fuerza curvas de dosis-respuesta menos abruptas, como es el caso del recto en su respuesta a la braquiterapia [Ben02]; y, por tanto, no cabe atribuir a la variabilidad entre individuos lo que es consecuencia de la variabilidad en la distribución de dosis absorbida.

En lo que respecta a los modelos discutidos anteriormente, si bien la formulación mecanicista de la probabilidad de control tumoral mediante el modelo de Poisson es posible, no está tan claro el modo en que debe interpretarse para los tejidos sanos. Los tumores, en una primera aproximación, pueden suponerse compuestos de un conjunto de células idénticas y que responden de modo independiente a la radiación; si todas se destruyen el tumor se destruye, si quedan algunas el tumor se regenera. Para los tejidos sanos este punto de vista es muy simple; en general la función de los órganos es realizada por estructuras celulares complejas (como las nefronas en los riñones y los alvéolos en los pulmones).

La definición de *subunidades funcionales*, estructuras mínimas que realizan la función del órgano o tejido, o *unidades de rescate*, aquellas células capaces de regenerar el tejido tras un daño producido en una de sus partes, permite, en principio, usar el modelo de Poisson; pero el resultado no es muy satisfactorio y la interpretación de los parámetros no está clara: los ajustes producen muchas veces números de unidades funcionales claramente incorrectos [Gui00]. Por esto, perdida la supuesta ventaja de disponer de un modelo con base biológica, y dadas las posibilidades de mejora de la ecuación logística en muchas situaciones de la práctica clínica, por ejemplo para introducir el efecto de volumen [Vel03], ésta será la que empleemos más tarde cuando sea preciso usar un modelo dosis-respuesta para un tejido (tumoral o sano).

1.1.4. Tolerancia

Es claro en una primera aproximación a la definición de tolerancia que esta palabra, como en su uso común en medicina, se refiere al daño que es capaz de soportar un determinado paciente (como consecuencia de la irradiación de uno o más de sus tejidos). Así, para un tratamiento particular perfectamente definido en todos sus aspectos, un órgano como el riñón tolerará o no la irradiación y, por tanto, no sufrirá un cierto daño o sí lo sufrirá. Por desgracia, para un riñón en particular no es posible saber con certeza qué sucederá tras un tratamiento; sí tenemos acceso, por el contrario, a colecciones de datos clínicos que nos

permiten un conocimiento estadístico de lo que puede suceder si administramos ese tratamiento. Es decir, tenemos una estimación de la frecuencia con que se presentará ese efecto en el riñón cuando se administra el tratamiento en cuestión a un conjunto de personas.

Así pues, cuando nos enfrentamos a la decisión de administrar un determinado tratamiento con radiaciones o a buscar alternativas, nos vemos obligados a prescindir del sentido genuino del término tolerancia, puesto que su conocimiento es, por ahora, inaccesible. Decimos así que la tolerancia se refiere a la probabilidad de complicaciones límite por encima de la cual no es aceptable el tratamiento para ese paciente en particular. Y con este sentido, aunque prescindiendo de la necesaria singularidad de cada caso, se afirma por ejemplo que la tolerancia para la médula espinal es de 50 Gy. Que, en realidad, quiere decir: si irradiamos la médula espinal de nuestros pacientes de cánceres de cabeza y cuello en un esquema de 1.8 a 2 Gy por fracción durante 5 días a la semana hasta 50 Gy, cabe esperar que en 5 de cada 100 de ellos se produzcan efectos neurológicos graves e irreversibles a largo plazo; y este 5% nos parece un compromiso de riesgo admisible para el objetivo que perseguimos, que no es otro que la curación del cáncer de las tres cuartas partes de esos pacientes.

Esta definición puede acotarse todavía más, aunque no es frecuente hacerlo de forma explícita. En primer lugar debemos considerar la singularidad de cada persona que deviene en un paciente que nos preocupa: dependiendo de la intención terapéutica, de la edad o del estado de salud del individuo, podemos admitir un mayor o menor riesgo para el tratamiento. El riesgo ha de entenderse como la probabilidad del efecto considerado, y se refiere, como ya hemos visto, a la proporción que constituyen los pacientes de una población (más o menos estratificada dependiendo de la información previa sobre la enfermedad que tengamos) para los que se espera que tal efecto se produzca si se alcanza una determinada dosis absorbida. Dosis que dependerá del procedimiento terapéutico empleado: esquema de fraccionamiento, conformación, tratamientos concomitantes, etc. Así, para un paciente en particular del que tenemos cierta información sobre su enfermedad (extensión, diferenciación, etc.), su estado general antes del tratamiento, sus posibles sensibilidades o resistencias respecto de lo que es común entre nuestros pacientes, y para el que tenemos una idea aproximada del resultado en términos de curación que puede dar el tratamiento; asumimos un límite superior para el riesgo de que se produzca un determinado efecto sobre cada uno de los órganos o tejidos importantes comprometidos por el tratamiento. A estos límites los llamamos tolerancias. Naturalmente este proceso debe culminar con la información al paciente y, por tanto, la decisión sobre la tolerancia será compartida con él.

De este modo, el justo deseo de establecer para cada paciente en particular un valor adecuado de su tolerancia, nos deja en una insatisfactoria asunción basada en el conocimiento estadístico de la respuesta de muchos pacientes que no son como él. La radioterapia debería aplicarse atendiendo a todas las características de cada paciente en particular, pero esto, por ahora, está lejos de ser así porque nuestro conocimiento es todavía insuficiente. Claramente, en muchos aspectos que tienen que ver con la anatomía, esto es cierto; también lo es en algunos detalles sobre la localización y extensión tumorales, estado general del paciente y otras. Sin embargo, no lo es con respecto a nuestro conocimiento sobre la sensibilidad de los tejidos tumorales y sanos, y sobre la extensión y estructura microscópica y la cinética de proliferación del tumor. La individuación de la radioterapia en estos aspectos básicos es, por ahora, sólo una aspiración que, afortunadamente, tienen muchos científicos activos.

Nos topamos así con situaciones en las que asumimos un riesgo del 5% de complicaciones para un paciente al que no podremos curar con el esquema terapéutico habitual; o casos en los que se administrará una dosis insuficiente a un paciente especialmente resistente, al que hubiésemos curado aumentando un poco la dosis de ese esquema habitual. En lo que sigue vamos a estudiar qué puede esperarse de la individuación de la dosis total, si fuese posible un ensayo que nos permitiese superar ese desconocimiento de la respuesta individual de cada paciente al que varias veces hemos aludido ya.

1.1.5. Ensayos predictores de radiosensibilidad

Admitida la existencia de una distribución de probabilidad para los grados de respuesta de los seres humanos a la radiación, es necesario encontrar el modo práctico de realizar un ensayo que nos permita, en primer lugar, asignar a un individuo particular un determinado valor de radiosensibilidad y, en segundo, mediante dicha distribución, clasificar a ese individuo para distinguirlo del resto de la población a la que pertenece. Todo esto pasa por definir de manera precisa cuál es el parámetro con que se cuantifica la sensibilidad; en la práctica existen varias opciones para elegirlo.

Puesto que la respuesta a la radiación de los tejidos parece tener una componente genética importante [Bro95, Hen11], puede suponerse que la radiosensibilidad de las células en cultivo reflejará la expresión genética del individuo del que proceden. Así, si existen diferencias en la radiosensibilidad de, digamos, los fibroblastos de personas distintas, cabe esperar también una diferencia entre esas personas para otras estirpes celulares. Esta suposición se ha confirmado en los trabajos de varios grupos, que han mostrado que la radiosensibilidad relativa de diferentes tipos celulares procedentes del mismo individuo es semejante [Ram95, Ozs97, Nun98]. Por tanto, un ensayo *in vitro* podría servir para determinar la sensibilidad potencial de cada individuo y predecir la respuesta de sus tejidos sanos a la radiación.

Una primera posibilidad para este ensayo consiste en analizar el daño inicial, en forma de *roturas dobles de cadena*, en el ADN de fibroblastos o linfocitos obtenidos del futuro paciente. Este análisis no está exento de posibles artefactos, ya que es preciso emplear dosis muy altas y el daño inicial está muy lejos del efecto final que la radiación produce sobre el tejido puesto que, tras éste, intervendrán los mecanismos de reparación celular y tisular y efectos que se producen en un plazo más largo, como la inestabilidad genética generada por la radiación [Nun96].

Una segunda opción consiste en la medida del daño residual del ADN, esto es, tras la reparación; lo que supone una mayor complejidad experimental y, por consiguiente, una mayor perturbación del material biológico original. Así los resultados se hacen dependientes de algunos detalles técnicos importantes, como las condiciones del cultivo [Oli98, Dik00], y no está más clara que para el daño inicial su relación con los efectos sobre el tejido, aunque el daño residual del ADN pueda considerarse más cerca de esos efectos que el daño inicial.

Como tercer método puede evaluarse la supervivencia celular, lo que exige la realización de un ensayo clonogénico¹ después de extraer las células del donante y cultivarlas en el laboratorio. Algunos autores han mostrado correlación entre la supervivencia de fibroblastos irradiados y la severidad de las reacciones clínicas a la radioterapia

¹En el capítulo 2 veremos con detalle en qué consiste un ensayo clonogénico.

[Bar00, Car00, Pea00, Wes01]; este proceso precisa varias semanas y puede suponer una gran perturbación del material del donante y, por tanto, de los resultados perseguidos, por lo que tampoco puede hablarse de una relación clara entre la supervivencia y las reacciones precoces o tardías del tejido sano. No debe olvidarse que una cosa es predecir la respuesta excesiva de un paciente afectado por un síndrome como ataxia-telangiectasia, y otra muy distinta detectar la misma relación entre la fracción de supervivencia y la respuesta del tejido sano para un paciente aparentemente normal [Beg93].

Así, todos los métodos descritos adolecen de ciertas desventajas y dificultades; habida cuenta de su relativa sencillez, de la experiencia acumulada por nuestro grupo [Rui94, Nun96, Nun98, Rui02] y de otras razones que enunciaremos en seguida, centraremos nuestra atención en un ensayo predictor que se basa en el análisis de las roturas dobles que produce la radiación en el ADN de linfocitos extraídos de muestras de sangre.

El ensayo con linfocitos es poco molesto para los pacientes, rápido y relativamente sencillo, por lo que reúne algunas de las características para resultar un ensayo predictor adecuado; además, algunos estudios sugieren que son más prometedores que los fibroblastos para predecir la respuesta de los tejidos sanos a la radiación [Bor02]. Por último, gracias a la relación lineal entre el número aparente de roturas dobles en el ADN de linfocitos y la dosis [Nun96, Nun98] el parámetro de radiosensibilidad puede tomarse como la pendiente de dicha relación; que presenta además una variación estadísticamente significativa entre pacientes distintos y podría distinguir los pacientes con reacciones severas del resto [Rui02, Pin07].

Tras analizar los linfocitos procedentes de 226 muestras de sangre de mujeres con cáncer de mama que siguieron un programa de radioterapia, ha podido establecerse con suficiente exactitud la forma de la distribución del número de roturas dobles por unidad de longitud de su ADN [Rui02]. En este capítulo examinaremos la ganancia terapéutica que puede obtenerse a partir del conocimiento de la distribución de radiosensibilidad, siguiendo en cierto modo algunos ejemplos precedentes [Ben97, Mac98], con la hipótesis de que dicha distribución está directamente relacionada con el grado de respuesta del tejido sano a la radiación, y suponiendo que puede realizarse el ensayo predictor para todas las pacientes que siguen un programa de radioterapia. Además, suponemos que no existe correlación entre la radiosensibilidad de los tejidos sanos y la de las células tumorales, como indican algunos autores [Sta99].

En definitiva, asumimos que el parámetro de radiosensibilidad obtenido del ensayo in vivo (en nuestro caso el número de roturas dobles del ADN) está relacionado estrechamente con la respuesta normal del tejido sano tras la radioterapia, y que puede aplicarse a todos los pacientes tratados con radiaciones. Aunque esto no ha podido probarse, los métodos que aquí se presentan no dependen de la demostración de estas hipótesis. De algún modo el daño inicial, tras un conjunto complejo de mecanismos que no son totalmente conocidos, da lugar a una respuesta del tejido que será diferente para pacientes distintos y, por tanto, podrá cuantificarse mediante algún parámetro de radiosensibilidad para el que tendremos una cierta distribución de probabilidad. A partir del conocimiento de esta distribución podrían utilizarse los métodos que aquí proponemos; el ensayo basado en el daño en el ADN, como se ha visto, es sólo uno de entre los posibles, y las herramientas que emplearemos a continuación no dependen necesariamente de este tipo particular de ensayo.

1.2. Material y métodos

1.2.1. Roturas dobles del ADN

La radiación ionizante produce roturas en las moléculas de ADN contenidas en el núcleo celular. Si las células se mantienen por debajo de 4°C tras la irradiación los mecanismos de reparación no actúan y, por tanto, los fragmentos del ADN no se unen de nuevo y pueden separarse por tamaños mediante un experimento de electroforesis en gel de agar, usando la técnica de campo pulsante (*pulsed field gel electrophoresis*) [Sch84], que produce una traza de fragmentos más alejados del pocillo que contiene el material celular cuanto más liviano sea su peso (o, equivalentemente, menor sea su longitud), y que facilita la separación de los fragmentos más grandes respecto de la técnica usual de campo estático. En este tipo de experimentos puede realizarse una calibración midiendo las distancias recorridas por fragmentos de tamaño conocido, usualmente cromosomas de levaduras (*Saccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*); de este modo, pueden clasificarse los tamaños de los fragmentos de ADN extraídos para una determinada dosis de radiación.

Analizando la imagen resultante de iluminar la muestra de electroforesis con luz ultravioleta, después de que esta muestra haya sido teñida convenientemente con un colorante fluorescente, se obtiene una distribución del tamaño de los fragmentos del ADN. A partir de esta distribución puede calcularse el número de roturas dobles para cada dosis y, representando este número frente a la dosis absorbida, el número de roturas dobles por unidad de dosis [Nun08], que es el parámetro de radiosensibilidad empleado aquí.

Los linfocitos a partir de los cuales se establecieron los valores de radiosensibilidad que emplearemos como punto de partida, se obtuvieron de la extracción de una muestra de sangre de 5 ml de cada una de las 226 pacientes que, previamente, habían dado su consentimiento para ello y participaban en el estudio al que ya se ha hecho referencia [Rui02]. El procedimiento para obtener los linfocitos de la sangre y la manipulación a la que son sometidos también se describen en el trabajo de Ruiz de Almodóvar et al. [Rui02].

1.2.2. Distribución de probabilidad

El número de roturas dobles en el ADN sigue una relación lineal con la dosis [Nun96, Nun98] y, por tanto, puede caracterizarse mediante un único parámetro, la pendiente de dicha relación; matemáticamente:

$$R = xd, \quad (1.5)$$

donde R es el número de roturas dobles de cadena (*double-strand breaks*, dsb) por unidad de ADN y d la dosis absorbida. Usualmente se toman 200 millones de pares de bases (Mbp) como unidad de ADN.

En un ensayo predictor de radiosensibilidad, la relación lineal (1.5) es la forma más simple entre la variable de radiosensibilidad y la dosis absorbida; por tanto, los argumentos que expondremos aquí para evaluar el alcance de un programa de individuación de las dosis en radioterapia son generales, y no dependen críticamente del uso del ensayo de roturas del ADN.

Como se ha dicho, estudiamos previamente a 226 mujeres con cáncer de mama que siguieron un programa de radioterapia. El conjunto de 226 valores de x correspondientes

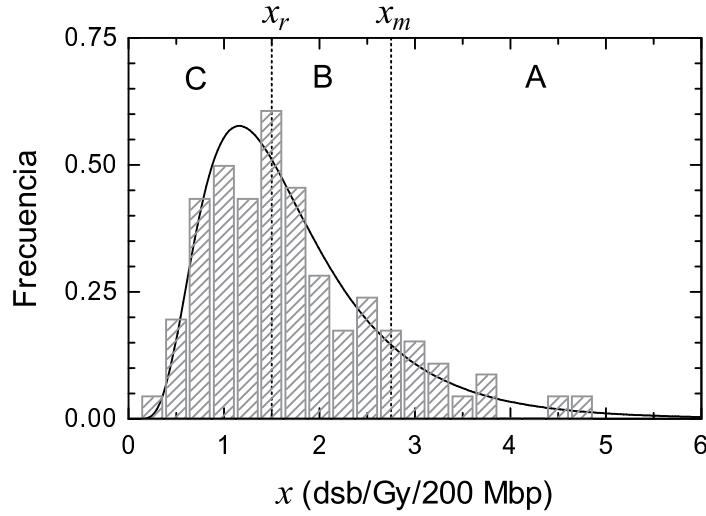


Figura 1.2: Distribución del parámetro de radiosensibilidad; se presentan los datos experimentales y su ajuste a una distribución de probabilidad lognormal de parámetros $\mu = 0.42$ y $\sigma = 0.52$. También se muestran las tres regiones en las que se divide la distribución con el propósito de clasificar a los pacientes en el procedimiento de individuación de las dosis.

a los linfocitos de estas mujeres, obtenidos antes de la terapia, obedece a una distribución de probabilidad lognormal [Rui02] (véase la figura 1.2), aunque pueden emplearse otros modelos de probabilidad como las distribuciones gamma y de Weibull [Gui98, Gui01]. Empezaremos por describir brevemente la distribución lognormal [Joh94].

Si existe un número θ tal que $z = \ln(x - \theta)$ se distribuye normalmente, la distribución de x se dice lognormal. Para esto es preciso que la probabilidad de hallar un valor de x menor o igual que θ sea 0. Como θ sólo afecta a la localización de la distribución, tomaremos $\theta = 0$.

La distribución de x puede definirse por la ecuación:

$$u = \frac{\ln x - \mu}{\sigma}, \quad (1.6)$$

donde u es la variable normal estándar $\mathcal{N}[0, 1]$, μ el valor esperado de $z = \ln x$ y σ su desviación típica, de manera que:

$$P(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right\}, \quad x > 0. \quad (1.7)$$

La distribución lognormal se llama a veces *antilognormal*, ya que no se trata de la distribución del logaritmo de una variable normal, sino de la distribución de la exponencial de dicha variable. La media de la distribución lognormal es:

$$\bar{x} = \exp\left(\mu + \frac{\sigma^2}{2}\right). \quad (1.8)$$

En muchas situaciones, la distribución lognormal proporciona una representación más adecuada que la normal debido a que las variables del problema no pueden tomar valores

negativos (como sucede en el caso que tratamos aquí), toda vez que puede obtenerse una muy buena aproximación de la distribución normal haciendo σ suficientemente pequeña.

Los resultados de ajustar la distribución lognormal a los datos de radiosensibilidad de las 226 pacientes son los siguientes [Rui02]: $\mu = 0.42 \pm 0.03$, $\sigma = 0.52 \pm 0.02$ con un valor de $R^2 = 0.9475$. El valor medio de la distribución puede calcularse de la ecuación (1.8), y resulta $\bar{x} = 1.74 \pm 0.06$ dsb/Gy/200 Mbp. Las incertidumbres corresponden en todos los casos a un factor de cobertura $k = 1$. El ajuste se muestra en la figura 1.2 con línea continua.

Según el modelo comúnmente aceptado, el efecto final de la irradiación sobre los tejidos sanos se produce por una cascada de eventos que comienzan en el daño inicial del ADN. Entre los mecanismos más importantes que tienen lugar en este proceso están la reparación del ADN, la recuperación celular, la muerte celular por apoptosis o necrosis, la repoblación tisular, la migración celular y los fenómenos inflamatorios. Su importancia relativa puede ser la responsable de la gran variabilidad que existe entre la respuesta de diferentes pacientes.

En el caso que nos ocupa, es sencillo ver que, bajo unas ciertas hipótesis, una distribución lognormal del daño inicial sobre el ADN lleva a una distribución lognormal para el daño sobre el tejido, es decir, para el grado de la respuesta precoz o tardía de los tejidos sanos de los individuos. Seguimos para ello un razonamiento general propuesto por Koch [Koc66].

Para un determinado paciente, y tras la generación de las lesiones iniciales, los diferentes pasos en el proceso de formación del daño final pueden escribirse mediante las cantidades x_j , que representan el daño remanente tras cada etapa en la que podemos dividir el proceso; puede así escribirse:

$$x_j = x_{j-1} - e_j x_{j-1} = x_{j-1}(1 - e_j), \quad (1.9)$$

donde los factores de reparación e_j son cantidades positivas y muy pequeñas; lo cual se cumplirá si el número de etapas es suficientemente grande. Así:

$$x_n = x_0 \prod_{i=1}^n (1 - e_i). \quad (1.10)$$

Tomando logaritmos,

$$\ln x_n = \ln x_0 + \sum_{i=1}^n \ln(1 - e_i) \approx \ln x_0 - \sum_{i=1}^n e_i, \quad (1.11)$$

donde nos hemos quedado con el primer término del desarrollo en serie. Si $\ln x_0$ se distribuye normalmente, y este es el caso porque x_0 representa el daño inicial y se distribuye según una lognormal, aplicando el teorema del límite central, $\ln x_n$ se distribuye normalmente y, por tanto, x_n se distribuye según una lognormal. Esta es una situación que suele darse en biología [Koc66, Koc69] y que, en particular, se verifica para el parámetro de radiosensibilidad determinado por la pendiente de la ecuación (1.5).

1.2.3. Individuación del tratamiento

Partiendo de lo anterior, podemos asumir que la respuesta del tejido sano muestra una distribución que puede ser descrita por la función densidad de probabilidad lognormal. En lo que sigue supondremos, aunque todavía no ha sido probado, que el daño inicial en el ADN está correlacionado con el daño final sobre el tejido sano. Como puede verse en la figura 1.2, la distribución de los valores de radiosensibilidad es asimétrica, y la larga cola hacia la derecha indica la existencia de individuos con valores extremos de radiosensibilidad. Si estos pacientes sufrirán o no efectos secundarios severos es una cuestión que debe dilucidarse.

El proceso de reparación puede producir una mezcla en los valores de radiosensibilidad, debido a que pacientes con un alto nivel de daño en el ADN pueden no mostrar una respuesta final severa si sus mecanismos de reparación son muy eficientes. Además, no podemos asegurar que exista una relación clara entre el daño residual tras la reparación del ADN y la respuesta final de los tejidos [Kil99, Dic02]. En estas circunstancias, la distribución de las roturas dobles en el ADN puede considerarse un punto de partida para estimar las ventajas de un programa de individuación de las dosis, habida cuenta de que su forma es general, pero no un procedimiento definitivo que pueda llevarse a la práctica clínica.

Supongamos ahora un programa terapéutico concreto en el que, mediante un esquema de fraccionamiento determinado, se imparte una dosis total d_T ; distinguimos con el subíndice T, frente a una dosis total genérica d , la dosis total del esquema de tratamiento concreto objeto de nuestro estudio. Para este tratamiento establecemos un nivel de daño sobre el tejido sano como referencia (después veremos cómo), con lo que existe un valor de la pendiente, x_T , para el cual la dosis de este esquema terapéutico produce exactamente el número de roturas dobles en el ADN de los linfocitos equivalente al daño tomado como nivel de referencia (véase la figura 1.3).

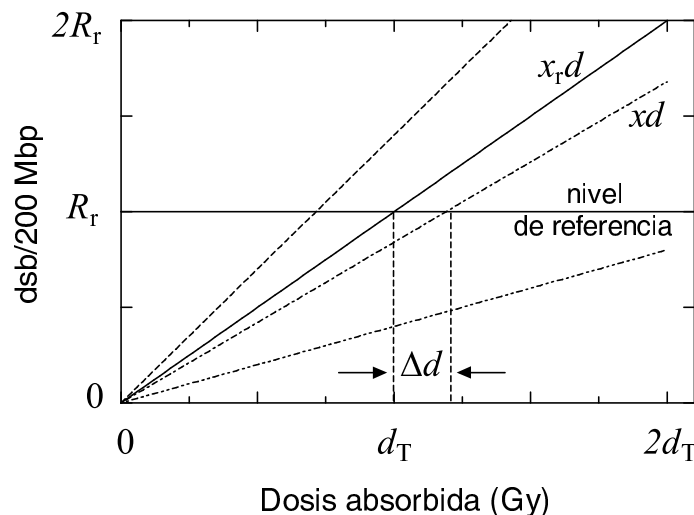


Figura 1.3: Daño molecular producido por la radiación en el ADN de los linfocitos en función de la dosis absorbida. Las pendientes de las rectas corresponden a las medidas del parámetro de radiosensibilidad, x . La línea horizontal indica el nivel de daño de referencia, R_T .

Supongamos que se ha realizado un ensayo de radiosensibilidad en un paciente para el que queremos establecer una dosis total adecuada a su particular respuesta a la radiación. Si el resultado de este ensayo da lugar a un valor de la pendiente $x_p < x_r$, el nivel de efectos sobre el tejido sano, si sigue el programa previsto, será menor para este paciente que el considerado como referencia. En este caso podemos plantearnos aumentar la dosis del esquema terapéutico de manera que, alcanzando el grado de referencia para los efectos secundarios sobre el tejido sano, aumentemos la probabilidad de control local de la enfermedad para ese paciente. El aumento de dosis será:

$$\Delta d = d_T \left(\frac{x_r}{x_p} - 1 \right). \quad (1.12)$$

Si, por el contrario, el resultado del ensayo da lugar a un valor de la pendiente $x_p > x_r$, mantener una dosis total igual a la establecida inicialmente producirá un nivel de daños mayor que el que hemos tomado como referencia. En particular, existirá un valor x_m a partir del cual el paciente presentará una respuesta a la radiación muy importante (*over-reaction*), y será conveniente buscar alternativas al tratamiento previsto.

Estas modificaciones en la dosis total se sustentan en la hipótesis de que existe una relación lineal entre el número de roturas dobles en el ADN de los linfocitos y el nivel de efectos secundarios que produce un determinado esquema terapéutico. Es, por tanto, arriesgado, realizar correcciones excesivas en la dosis total, pues cabe esperar que la hipótesis de linealidad sea adecuada en un entorno reducido del valor de roturas dobles de referencia (por ejemplo el valor medio) pero que no lo sea si x es muy diferente de x_r . Por otra parte, la incertidumbre en la determinación de x nos exige cierta cautela al prescribir un aumento de la dosis total para una paciente en la que hemos encontrado un valor muy bajo de este parámetro. Tendremos todo esto en cuenta al diseñar la individuación de tratamientos a partir del conocimiento de la distribución del parámetro de radiosensibilidad.

En la figura 1.2 la distribución de roturas en el ADN se ha dividido en tres regiones definidas por los parámetros de radiosensibilidad x_r y x_m :

- (A) Si el valor del parámetro de radiosensibilidad es mayor o igual que x_m , existe un riesgo importante de efectos severos sobre el tejido sano. Para estas pacientes es necesario realizar un seguimiento estrecho, buscar un programa de tratamiento alternativo distinto a la radioterapia o realizar cambios en el esquema terapéutico (por ejemplo, en el fraccionamiento).
- (B) Si el valor del parámetro de radiosensibilidad está entre x_r y x_m , la paciente sigue el programa previsto. En el caso que nos ocupa, 50 Gy administrados en fracciones diarias de 2 Gy, 5 días por semana.
- (C) Finalmente, si el valor del parámetro de radiosensibilidad es menor que x_r , puede hacerse un aumento de la dosis total calculado según la ecuación (1.12).

Por ahora no es posible establecer una clasificación de la reacción de las pacientes a la radioterapia basada en los criterios anteriores, mediante la elección de unos determinados valores de x_r y x_m . Aquí los seleccionaremos imponiendo diferentes valores de las áreas definidas bajo la curva de distribución en las regiones A, B y C (figura 1.2). Esto nos

permitirá investigar los efectos de varias formas de discriminación en el programa de individuación de las dosis absorbidas.

Por último, en algunos casos la ecuación (1.12) puede dar lugar a un aumento muy alto de la dosis. Por tanto, hemos elegido un límite arbitrario pero razonable del 20 % para este aumento. Así, en el caso de las pacientes de cáncer de mama que consideramos aquí, la dosis total usualmente empleada, 50 Gy, puede llegar a un máximo de 60 Gy.

1.2.4. Procedimiento analítico

Si suponemos que la curva de probabilidad de control tumoral es idéntica para todas las pacientes (lo cual, obviamente, es una simplificación excesiva aunque útil) puede estimarse el efecto promedio sobre el resultado del tratamiento de un programa de individuación como el anterior. Sea $P(x)$ la función densidad de probabilidad para los datos de radiosensibilidad, y $TCP(d)$ la curva dosis-respuesta del tumor. La probabilidad media de control tumoral para una dosis d es:

$$\overline{TCP}(d) = \left[\int_0^\infty P(x) TCP(d) dx \right] \times \left[\int_0^\infty P(x) dx \right]^{-1}. \quad (1.13)$$

La función de probabilidad de control, $TCP(d)$, puede elegirse de diversas formas; aquí emplearemos la que proporciona el modelo logístico de la ecuación (1.4) que se introdujo al principio del capítulo.

Los modelos de probabilidad de control tumoral pueden incluir aspectos como la heterogeneidad en la distribución de dosis o en las poblaciones celulares del tumor, así como los efectos del fraccionamiento. Aquí hemos optado por un modelo simple que no tiene en cuenta factores biológicos de manera explícita. Como se discutió antes, la elección de un modelo como el de Poisson para describir la probabilidad de control tumoral exige la proposición de ciertas hipótesis biológicas que oscurecen, más que aclaran, nuestros resultados. Además, usando un modelo empírico como el logístico, la suma de todos los factores que afectan a la respuesta de un paciente en particular se tiene en cuenta de manera indirecta. Esto se debe a que una curva de TCP obtenida mediante una elección aleatoria de los parámetros del modelo que la describa, representa adecuadamente la respuesta de un paciente con una cierta sensibilidad tumoral que ha sido irradiado con una distribución de dosis heterogénea. Esta es la razón de la sencillez de nuestra propuesta para el análisis que efectuaremos más tarde.

Ahora podemos hacer las modificaciones en el tratamiento que exige el programa de individuación considerando $x_1 < x_T$ como el parámetro de radiosensibilidad para el cual se permite el máximo valor de Δd , que es $0.2d_T$. A partir de nuestra discusión previa, el tratamiento se modifica en $\Delta d = 0.2d_T$ para los pacientes con radiosensibilidad entre 0 y x_1 ; y en Δd , como muestra la ecuación (1.12), en los pacientes con radiosensibilidad entre x_1 y x_T ; de manera que permanece sin cambios en el resto de pacientes (excluimos los pacientes con radiosensibilidad por encima de x_m). Así, el valor medio de la probabilidad de control tumoral es:

$$\begin{aligned} \overline{\text{TCP}}(d_T) = & \left(\int_0^{x_1} P(x) \text{TCP} \left(d_T \frac{x_r}{x_1} \right) dx + \int_{x_1}^{x_r} P(x) \text{TCP} \left(d_T \frac{x_r}{x} \right) dx \right. \\ & \left. + \int_{x_r}^{x_m} P(x) \text{TCP}(d_T) dx \right) \times \left(\int_0^{x_m} P(x) dx \right)^{-1}. \end{aligned} \quad (1.14)$$

Nótese que si $x_m \rightarrow +\infty$ no se excluyen pacientes del programa terapéutico, posibilidad que tendremos en cuenta más tarde.

1.2.5. Simulación Monte Carlo

El método analítico descrito en la sección anterior no tiene en cuenta que los parámetros que describen la relación dosis-respuesta de un paciente en particular son desconocidos. La información disponible concierne a los valores medios y las incertidumbres de D_{50} y γ .

Para estudiar el modo en que las diferencias entre los pacientes afectan al control tumoral, hemos realizado simulaciones Monte Carlo del proceso de individuación de la dosis. En este procedimiento se sortean aleatoriamente los valores de x , D_{50} y γ para cada paciente. El primero se obtiene de la distribución lognormal ajustada a los valores experimentales de la figura 1.2, los de D_{50} y γ de acuerdo con distribuciones normales. Una vez que se obtiene un determinado valor de x puede establecerse si se hará o no modificación de la dosis; si ese es el caso, la nueva dosis total $d_T + \Delta d$ se calcula mediante la expresión (1.12), y la nueva probabilidad de control se obtiene de (1.4). El resultado se compara con la probabilidad de control del tratamiento usual. La simulación se realiza para 10 series de 5000 pacientes cada una (aumentar el número de series no mejora los resultados), de manera que podamos obtener una estimación de la incertidumbre del procedimiento.

1.3. Resultados y discusión

1.3.1. Procedimiento analítico

Para obtener el valor medio de la probabilidad de control tumoral es necesario definir los parámetros de radiosensibilidad que se utilizan como límites de integración en la ecuación (1.14). Un valor razonable para x_r puede ser el valor medio de la distribución. No obstante, debido a la incertidumbre inherente a este valor, y siguiendo un criterio conservador, consideramos $x_r = \bar{x} - 3\sigma_{\bar{x}} = (1.74 - 3 \times 0.06) \text{ dsb/Gy}/200 \text{ Mpb} = 1.56 \text{ dsb/Gy}/200 \text{ Mpb}$. El valor correspondiente para x_1 , limitando el aumento de la dosis a un 20% de la inicial, es $1.3 \text{ dsb/Gy}/200 \text{ Mpb}$.

Por otra parte, no conocemos el valor de radiosensibilidad x_m por encima del cual las pacientes deben considerarse especialmente sensibles. Aquí hemos estudiado cuatro situaciones distintas; en las tres primeras se espera que el 5, 10 y 15% de las pacientes desarrollen efectos secundarios severos tras el tratamiento. Para estos tres casos x_m es 3.6, 2.96 y 2.6 $\text{ dsb/Gy}/200 \text{ Mpb}$, respectivamente. También se ha considerado un cuarto caso en el que $x_m \rightarrow +\infty$; esto es, ninguna paciente, independientemente del resultado del ensayo de radiosensibilidad, se excluye del programa terapéutico previsto.

Para investigar cómo los valores particulares de los parámetros D_{50} y γ afectan a los resultados, consideramos tres valores para el primero 40, 45 y 50 Gy, y para γ valores que van desde 0 hasta 6. Los resultados obtenidos para la ecuación (1.14) se muestran en la figura 1.4, donde se representa la variación absoluta en la probabilidad de control tumoral que produce el programa de individuación frente al programa usual:

$$\Delta\text{TCP}(\%) = 100 (\overline{\text{TCP}}(d_T) - \text{TCP}(d_T)). \quad (1.15)$$

En cada conjunto de curvas de la figura 1.4 la superior corresponde a $x_m = 2.6$ dsb/Gy/200 Mbp, la del centro a $x_m = 3.6$ dsb/Gy/200 Mbp y la inferior a $x_m \rightarrow +\infty$. Las diferencias entre ellas muestran, como se esperaba, que la ganancia en la probabilidad de control es mayor cuanto mayor es la proporción de pacientes que se excluyen del programa terapéutico.

Debido a la heterogeneidad de la población de células tumorales, los valores clínicos apropiados para γ están entre 2 y 5 [Kal92]. En esta región, el aumento de la TCP está entre el 0.6% ($D_{50} = 40$ Gy) y el 26.4% ($D_{50} = 50$ Gy).

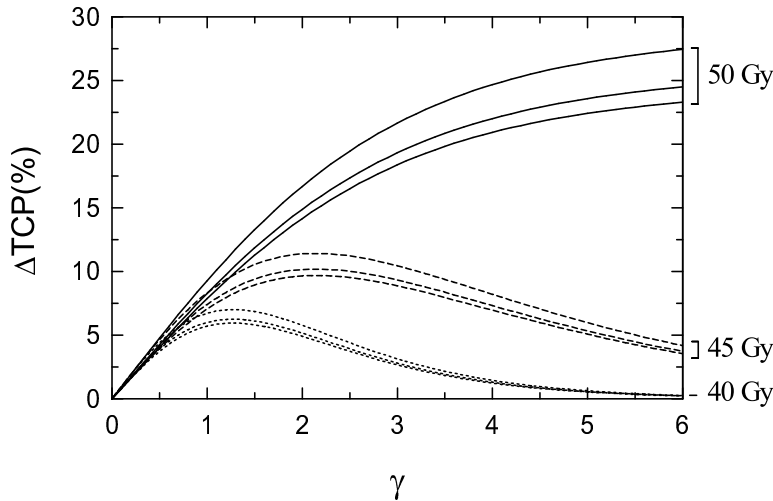


Figura 1.4: Incremento de la probabilidad de control tumoral resultante del esquema de individuación del tratamiento en función del valor de γ y tres valores de D_{50} : $D_{50} = 50$ Gy (líneas continuas), $D_{50} = 45$ Gy (líneas de trazos), $D_{50} = 40$ Gy (líneas de puntos). En cada caso las tres curvas corresponden a tres valores diferentes de x_m : 2.6 (línea superior), 3.6 (línea media) y $+\infty$ dsb/Gy/200 Mbp (línea inferior).

Es importante notar que el valor relativo de D_{50} respecto del valor de d_T es el responsable del comportamiento observado para ΔTCP . Cuando $d_T > D_{50}$ (y este es el caso para $D_{50} = 40$ y 45 Gy), la dosis de referencia del programa usual ($d_T = 50$ Gy) ya produce un valor bastante alto de la TCP y, por consiguiente, el aumento de la dosis para los pacientes incluidos en el grupo tiene un efecto pequeño. En este caso, el valor máximo de ΔTCP se obtiene para los valores pequeños de γ , es decir, para curvas de probabilidad de control tumoral de menor pendiente, que indican una mayor variabilidad para la respuesta de la población de pacientes (lo que equivale a una distribución de probabilidad más ancha). Por otra parte, cuando $d_T \leq D_{50}$, el valor de ΔTCP aumenta continuamente con γ .

Estos resultados muestran la importancia de los parámetros D_{50} y γ en la eficacia del tratamiento. Para estudiar cómo la variación de estos parámetros afectan a los hallazgos expuestos realizamos la simulación Monte Carlo descrita en la sección anterior.

1.3.2. Simulación Monte Carlo

Para realizar las simulaciones consideramos dos valores de D_{50} (40 y 50 Gy) con una desviación típica $\sigma_{D_{50}} = 5$ Gy en ambos casos. Para γ usamos los valores 3 y 5, con $\sigma_{\gamma} = 1$, y $x_m = 2.96$ dsb/Gy/200 Mbp. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.5, que representa la proporción acumulada de pacientes para los cuales se produce un determinado aumento de la probabilidad de control, Δ TCP, como consecuencia del programa individualizado. Como puede verse, el resultado depende en extremo de la combinación de los parámetros empleados en la simulación. La tabla 1.1 resume los resultados más importantes.

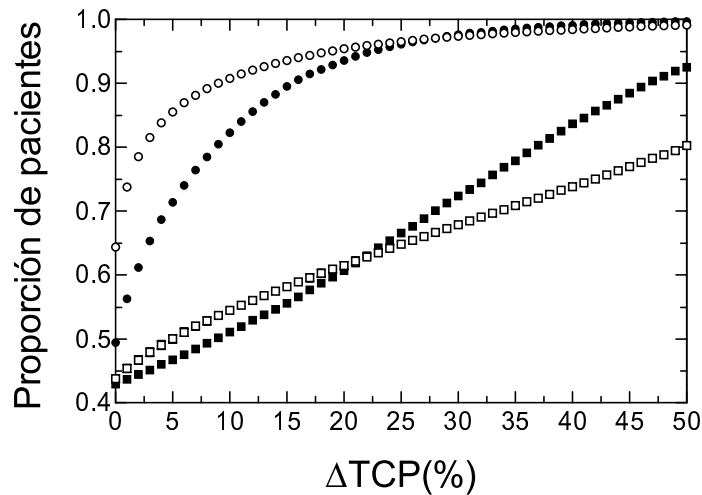


Figura 1.5: Proporción acumulada de pacientes que alcanzan un determinado valor para el aumento de la probabilidad de control tumoral como consecuencia de la individuación del tratamiento. Los cálculos se han realizado mediante simulación Monte Carlo. Los valores de los parámetros de radiosensibilidad se sortean de la distribución lognormal ajustada a los datos experimentales (figura 1.2). Los valores de D_{50} y γ se sortean de acuerdo con una distribución normal caracterizada por su valor medio y su desviación típica en los siguientes casos: $D_{50} = 40 \pm 5$ Gy y $\gamma = 5 \pm 1$ (\circ), $D_{50} = 40 \pm 5$ Gy y $\gamma = 3 \pm 1$ (\bullet), $D_{50} = 50 \pm 5$ Gy y $\gamma = 5 \pm 1$ (\square), $D_{50} = 50 \pm 5$ Gy y $\gamma = 3 \pm 1$ (\blacksquare). Las incertidumbres corresponden a un nivel de confianza del 95% y son menores que el símbolo utilizado para representar el punto correspondiente.

Los valores de γ entre 3 y 5 son razonables, y nuestros cálculos indican que la individuación puede mejorar los resultados para las pacientes con cáncer de mama en al menos un 3% y, posiblemente, hasta un 22%. En el caso de $D_{50} = 50$ Gy y $\gamma = 3$, alrededor del 8% alcanzan una probabilidad de curación dos veces mayor con el programa individualizado que con el programa usual. Para $D_{50} = 50$ Gy y $\gamma = 5$, un 4% de las pacientes tienen una TCP diez veces mayor que la que se obtiene antes de la individuación (este resultado no se

Tabla 1.1: Resultados obtenidos mediante simulaciones Monte Carlo del procedimiento de individuación de la prescripción de la dosis absorbida para diferentes valores medios y desviaciones típicas de D_{50} y γ . Las incertidumbres corresponden a un intervalo de confianza del 95 %.

D_{50} (Gy)	γ	Δ TCP(%) Valor medio	% de pacientes con Δ TCP > 0%	% de pacientes con Δ TCP > 10%	% de pacientes con Δ TCP > 50%
40 ± 5	3 ± 1	5.0 ± 0.1	50.6 ± 0.2	17.7 ± 0.1	0.30 ± 0.03
40 ± 5	5 ± 1	3.4 ± 0.1	35.6 ± 0.2	9.2 ± 0.1	0.88 ± 0.04
50 ± 5	3 ± 1	17.0 ± 0.3	57.1 ± 0.2	48.9 ± 0.2	7.47 ± 0.08
50 ± 5	5 ± 1	21.7 ± 0.4	56.2 ± 0.3	45.5 ± 0.3	19.7 ± 0.20

muestra en la tabla 1.1). Si nuestras hipótesis pudieran ser demostradas mediante estudios clínicos, estos cambios implicarían la curación del cáncer en muchas de estas pacientes.

Aunque la información global que proporciona la simulación es semejante a la que se obtiene del cálculo analítico, los resultados de la simulación son más fidedignos debido a que la variabilidad en los parámetros refleja la variabilidad que cabe esperar en una población real de pacientes. Además, la simulación proporciona información de cada paciente en particular, y no sólo del valor medio de lo que podemos ganar con el proceso de individuación. Esto es importante, por cuanto resulta consistente con el propósito de la propia individuación.

Por ahora no disponemos de un ensayo predictor fiable para establecer la radiosensibilidad propia de cada paciente, no obstante, podemos estimar qué ganaremos cuando lo tengamos. Para ello hemos asumido la existencia de una componente determinista de la reacción del paciente a la radioterapia, que se basa en la existencia de diferencias genéticas y epigenéticas de la radiosensibilidad entre individuos [Saf02]. Hemos considerado también una relación lineal entre el parámetro de radiosensibilidad y el efecto final; y una ecuación como la propuesta en (1.12) nos permite prescribir una dosis total individuada que se basa en el conocimiento de la radiosensibilidad de los tejidos sanos.

Es preciso, sin embargo, tener en cuenta dos detalles importantes. Primero, que no está claro que la probabilidad de control tumoral, para la que hemos empleado en nuestros cálculos la ecuación (1.4), sea independiente de la radiosensibilidad de los tejidos normales [Wes98]. Segundo, que la probabilidad de control tumoral depende fundamentalmente de d , pero los parámetros D_{50} y γ también la condicionan fuertemente.

Todo lo dicho hasta aquí muestra la necesidad de seguir investigando con ahínco para encontrar ensayos predictores adecuados y precisos, tanto para la radiosensibilidad de los tejidos sanos, como para la respuesta de los tumores a la radiación. Las dosis en radioterapia están limitadas en una buena medida por la tolerancia de los tejidos sanos; un mejor conocimiento de las variaciones individuales permitirá mejorar también nuestros resultados usando tratamientos en los que la dosis para cada paciente se determine desde una perspectiva biológica. Esto, en la práctica clínica actual, está lejos de ser así.

1.4. Recapitulación

Existe una importante variabilidad en el daño que genera la radiación en el ADN de los linfocitos de diferentes individuos; esta variabilidad puede caracterizarse mediante una distribución lognormal. Si admitimos la hipótesis común de que los efectos que manifiestan los tejidos irradiados proceden del daño inicial al ADN de sus células, se demuestra, mediante la aplicación del teorema del límite central, que la forma final de la distribución de la respuesta de diferentes pacientes a la radioterapia es también lognormal.

El conocimiento de la forma de la distribución de este daño inicial permite realizar estimaciones sobre los beneficios que cabe esperar de un programa de individuación de las dosis en la radioterapia del cáncer, que consiste en un aumento de las dosis para aquellos pacientes cuya respuesta a la radiación, en lo que respecta a los efectos secundarios sobre el tejido sano, sea menos intensa. Aunque pueden calcularse las magnitudes promedio que cuantifican el resultado del tratamiento mediante los métodos usuales del análisis, el uso de métodos Monte Carlo permite, además del cálculo de estas magnitudes medias, la estimación del beneficio particular que cabe esperar para cada paciente virtual que sigue el programa de individuación, y esto es coherente con la esencia de la propia individuación de la radioterapia.

No obstante, hay dos dificultades importantes que debemos considerar: no puede probarse por ahora que exista una relación entre los efectos secundarios de la radioterapia y el daño inicial al ADN; y debe estudiarse la posible correlación entre la respuesta del tejido sano y tumoral de un mismo paciente, ya que, de existir, limitaría el alcance de la individuación de la dosis absorbida.

Cuando dispongamos de un ensayo predictor preciso para estudiar la radiosensibilidad de los tumores y los tejidos sanos, la radioterapia será una disciplina médica más “exacta”, que nos permitirá una verdadera optimización individual y una predicción correcta de las reacciones adversas, de manera que el paciente pueda disponer de mayor información para otorgar su consentimiento al tratamiento. Esto nos propociona la posibilidad de acceder a programas individuados con una ganancia predecible.

Concluimos así que el conocimiento de la variabilidad en la respuesta de diferentes pacientes a la radioterapia permitirá la mejora de la práctica clínica, y que esta mejora se determina de modo conveniente mediante herramientas basadas en esa propia variabilidad.

Capítulo 2

Crecimiento tumoral

El crecimiento tumoral es un fenómeno complejo que puede abordarse desde diversos puntos de vista; así, la proliferación y diferenciación celulares en el cáncer o la imagen radiológica del tamaño de un tumor mamario, son aspectos diferentes, a diferentes niveles de organización, de un mismo fenómeno básico común: el crecimiento indefinido y desorganizado de un conjunto de células en el seno de un tejido. Nosotros haremos un estudio del crecimiento tumoral atendiendo a la observación del modo global en que evolucionan los tumores, es decir, sin preocuparnos de sus aspectos moleculares. Esta perspectiva permite enfrentar problemas básicos de la radiobiología, como la radiosensibilidad celular, y cuestiones más prácticas de la radioterapia, como el fraccionamiento.

Muchos de los aspectos relacionados con el tratamiento del cáncer han sido estudiados mediante cultivos en monocapa. En ellos, las células proliferan adheridas a la superficie de un recipiente apropiado que contiene los nutrientes necesarios. Sin embargo, el ambiente en el que se desenvuelven las células tumorales de un individuo es muy diferente del que se produce en los cultivos en monocapa. Basta mencionar para mostrarlo el carácter tridimensional de los tumores reales, que permite un contacto entre células esencialmente distinto al de estos cultivos y que afecta, por ejemplo, al empaquetamiento del ADN y a las interacciones ADN-enzimas; aspectos que tienen un papel relevante en la respuesta de las células a la radiación [Oli92]. Es deseable, por tanto, disponer de un modelo experimental que reproduzca mejor las condiciones de la proliferación celular en los tumores reales; los esferoides tumorales multicelulares son un modelo con esta propiedad [Sut88], que permite una extensa variedad de estudios sobre la evolución de los tumores en sus primeros estadios de crecimiento y la acción de distintos agentes citotóxicos sobre las células que los integran [Vil90, Ara03].

En este capítulo, tras describir con brevedad los modelos matemáticos de crecimiento tumoral existentes y definir la supervivencia celular, estudiaremos el crecimiento de los esferoides multicelulares de la línea humana MCF-7 de cáncer de mama y el modo en que la radiación afecta a este crecimiento. También desarrollaremos un nuevo método para calcular la supervivencia de las células de los esferoides tras la irradiación, que se basa en el seguimiento de cada esferoide de la población por separado y, consecuentemente, en la asunción de la variabilidad en la evolución de los tumores como un aspecto fundamental del problema del crecimiento tumoral.

El contenido de este capítulo ha sido publicado en parte en [Gui01, San03, Gui03b].

2.1. Antecedentes

2.1.1. Los tumores

Una *neoplasia* es una masa de tejido cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales de que procede, crecimiento que persiste una vez que han dejado de actuar las causas que desencadenaron el cambio que lo produjo. Cuando esta es la única característica anormal de las células neoplásicas, el resultado es un tumor benigno. Los tumores benignos no son invasivos, es decir, sus células no atraviesan los límites de los tejidos circundantes ni originan metástasis a distancia.

En los tumores malignos la proliferación descontrolada de las células se ve acompañada de anomalías en la coordinación de la división celular y la diferenciación. Los tumores malignos son invasivos, ya que se propagan más allá de los límites del tejido en que se originaron, infiltrando los tejidos vecinos y alterando o destruyendo su arquitectura. También son capaces de producir *metástasis*: hay células que abandonan el tumor por vía hemática o linfática y originan nuevos tumores en otro lugar del organismo distante del tumor primitivo. Los tumores malignos son llamados usualmente cánceres. En resumen, una masa de células neoplásicas se llama tumor; el término cáncer es frecuente en el lenguaje común y equivale a cualquier neoplasia maligna.

Tras la división celular a partir de un precursor o *célula madre*, las células normales asumen una función específica que implica el desarrollo de estructuras especializadas, esto se conoce como *diferenciación*. Las células madre son indiferenciadas, mientras que las células completamente maduras están altamente diferenciadas. En general, las células de las neoplasias benignas están diferenciadas hasta un punto que se corresponde estrechamente con el de las células de las que se derivan. En el caso de las neoplasias malignas se observan grandes variaciones de diferenciación: si las células se parecen mucho al tejido de origen se dicen bien diferenciadas; si poco, poco diferenciadas, y si no es posible identificar las células de origen, anaplásicas. El grado de diferenciación suele asociarse al comportamiento del cáncer, de modo que una neoplasia poco diferenciada tiende a ser más agresiva que una bien diferenciada. Junto con la falta de diferenciación suele existir un aumento en la variedad de la forma y el tamaño de las células.

Los tumores pueden desarrollar un sistema vascular, es decir, vasos sanguíneos, mediante la secreción de factores de angiogénesis. La capacidad de un tumor para inducir y mantener un aporte vascular representa un factor fundamental para su crecimiento.

El patrón vascular puede cambiar de una región a otra dentro de un tumor, y esto marca la llegada de nutrientes a las distintas zonas. La denominación *nódulo tumoral* se emplean para referirnos a una unidad tumoral que manifiesta cierto patrón morfológico básico: una zona proliferante, una zona de hipoxia y una zona de necrosis. Estas zonas muestran, respectivamente, las regiones con un aporte suficiente de oxígeno y nutrientes, en las que las células están dentro del ciclo de proliferación; aquellas con déficit de oxígeno y nutrientes, con células en fase quiescente y degenerativa; y las zonas donde se acumulan desechos y células muertas. El tumor completo está formado por un conjunto de estos nódulos cuya forma dependerá de la estructura del sistema vascular en las diferentes regiones que lo conforman (figura 2.1). De este modo, aun para pequeños volúmenes (por debajo del tamaño que puede detectarse clínicamente), existe heterogeneidad en la población celular que compone un tumor; heterogeneidad que consiste en diferentes patrones

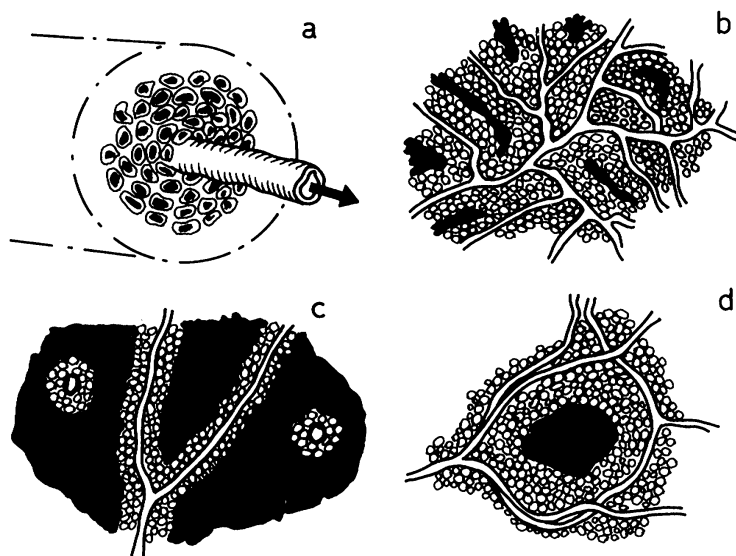


Figura 2.1: Patrones esquemáticos de la estructura vascular de un tumor. (a) Capilar rodeado por células viables; (b), (c) y (d), regiones con diferentes modos de vascularización en las que se observan las células viables y, en negro, la región de necrosis. Figura tomada de [Car84].

de proliferación, diferentes grados de oxigenación y distinta respuesta a la terapia. La influencia del medio ambiente es tan importante que la tradicional visión que explica la progresión tumoral en términos genéticos está siendo sustituida por otra, en la que se cree también fundamental el ambiente en el que dicha progresión tiene lugar [Sut88].

En la figura 2.2 puede verse un dibujo esquemático de nódulo tumoral, semejante a las pequeñas metástasis aisladas o a ciertas regiones de los grandes tumores. Esta estructura se reproduce muy bien en el sistema experimental de esferoides multicelulares tumorales [Sut88, Vil90, Ara03], que describiremos en el siguiente apartado, y en ella podemos apreciar algunos de los diferentes compartimentos que suelen contener los tumores reales con heterogeneidad celular desde etapas tempranas del crecimiento.

El movimiento entre compartimentos es frecuente. El paso de la quiescencia a la proliferación, que puede acontecer como consecuencia de un tratamiento, se llama *reclutamiento*. También puede producirse el abandono de células viables de la masa tumoral, lo que podría originar metástasis. La pérdida celular también se produce por diferenciación o muerte de las células que componen el tumor, y puede suponer hasta un 90% de las células de una nueva generación. El radio de la zona proliferante en un tumor, por ejemplo entre un vaso sanguíneo y el área de necrosis, oscila entre 50 y 250 μm .

El punto de vista clásico sobre la formación de los tumores consiste en suponer que, tanto su heterogeneidad celular como la forma en que progresan, son el resultado de la variación del microambiente y la genética de las células que lo componen, que suponen una selección de aquéllas que se adaptan mejor para generar el crecimiento ulterior del tumor. Una forma alternativa de explicar el comportamiento de los tumores es suponer la existencia de células madre tumorales: las células cancerosas se generan y mantienen de una forma similar a la de los tejidos normales jerárquicos, de manera que existe un conjunto de células madre que dan lugar a otros tipos celulares diferenciados [Gar11]. Este modelo amplía el modelo clásico proponiendo que la selección clonal opera en el

nivel de las células madre, cuya identificación podría mejorar la eficacia de las terapias contra el cáncer. Los conceptos de célula clonogénica y de célula madre cancerosa no son, en principio, sinónimos [Bau08]; no obstante, dado el alcance de este trabajo, los consideraremos así en lo que sigue.

La idea de célula clonogénica es fundamental en el estudio del cáncer y su tratamiento. Cuando un tumor vuelve a crecer tras algún tipo de terapia que no ha tenido éxito, lo hace porque existen células madre neoplásicas que no han sido destruidas. ¿Cómo pueden identificarse estas células? El procedimiento experimental consiste en la realización de un ensayo de formación de colonias, o *ensayo clonogénico*, en ciertas condiciones de cultivo; así, aquellas células del tumor que pueden dar lugar a una colonia de más de 50 células (5 ó 6 generaciones) se identifican con las células clonogénicas. Con este número se eliminan del cómputo a las células que han iniciado el camino de la diferenciación o a las que han sido dañadas por algún tipo de tratamiento. El concepto de célula clonogénica proporciona una base conceptual para la comprensión de las características de la evolución temporal de la respuesta de un tumor al tratamiento. La proporción de células clonogénicas en los tumores humanos es variable y depende del tipo de tumor y de su tamaño, para el cáncer de mama, por ejemplo, podría estar entre el 0.1 y el 5 % [Gar11].

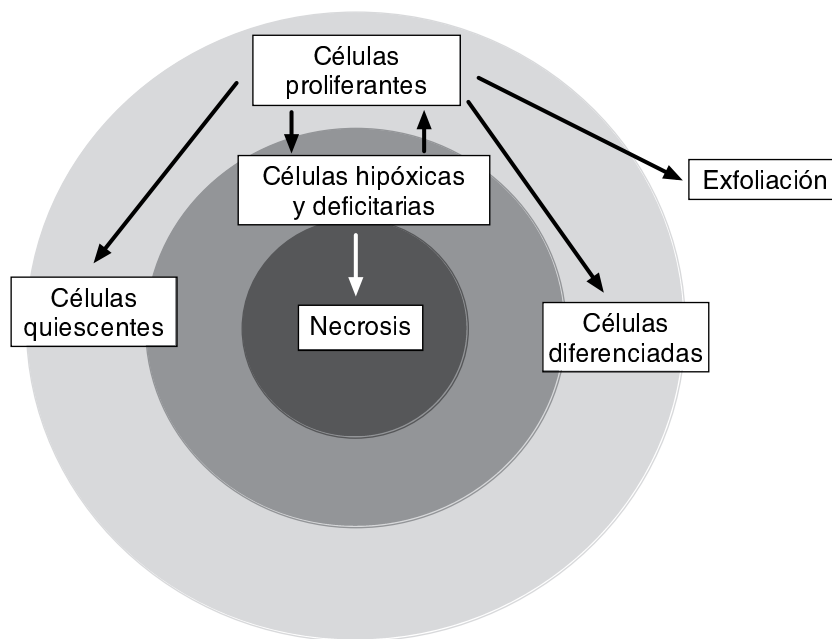


Figura 2.2: Dibujo esquemático de un nódulo tumoral. Se muestran los distintos compartimentos definidos por su actividad proliferante. Esta estructura reproduce muy bien los nódulos de algunos grandes tumores y las micrometástasis aisladas, así como los esferoides tumorales multicelulares. En este estadio del crecimiento no hay estroma. Tomado de [Vil90].

2.1.2. Los esferoides multicelulares como modelo de tumor

Los esferoides tumorales multicelulares (MTS) son agregados celulares que no pierden su cohesión durante el proceso de división celular, y que pueden generarse para algunos tipos de células en cultivos *in vitro*. La estructura de los MTS remeda las metástasis

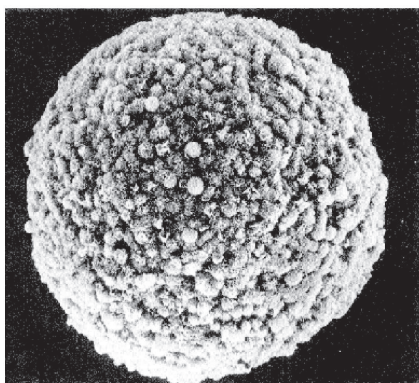


Figura 2.3: Fotografía de un esferoide de $800 \mu\text{m}$ de diámetro con 8×10^4 células. Tomado de [Hal06].

en sus primeras etapas de desarrollo y las regiones microscópicas intervasculares de los grandes tumores, en las cuales se producen ambientes heterogéneos que dan lugar a una microecología especial que influye en la respuesta del tumor a los agentes terapéuticos [Sut88, Vil90]. En la figura 2.3 se muestra una fotografía de un esferoide de $800 \mu\text{m}$ de diámetro. El modelo permite estudiar las características de estas regiones microscópicas y las relaciones de las células entre sí y con su medio ambiente. Además, el tamaño de los esferoides empleados en un cierto experimento puede elegirse de manera que se modifiquen los gradientes de concentración interior de oxígeno, glucosa, aminoácidos, lactato y otras sustancias, y puede estudiarse así la influencia de estos factores en el tratamiento con radiaciones, hormonas y citotóxicos. En esferoides suficientemente pequeños puede eliminarse la influencia de gradientes de concentración y analizarse los efectos de los contactos celulares exclusivamente.

Morfología y gradiente de proliferación

Respecto de la organización de los distintos compartimentos en el interior de los esferoides (figura 2.2), la mayoría de las células proliferantes se localizan en las capas más externas (de 3 a 10 capas celulares que suponen menos de $250 \mu\text{m}$ de espesor). Si progresamos hacia el interior del esferoide muchas de las células con que nos encontramos están en estado quiescente, aunque bastantes de entre ellas pueden ser viables si las condiciones ambientales cambian. Para esferoides de suficiente tamaño (más de $500 \mu\text{m}$ de diámetro) el centro está ocupado por un núcleo de células muertas y restos celulares, a este conjunto lo conocemos como necrosis. El análisis mediante autorradiografías tras la incorporación de timidina tritiada ($^3\text{HTdR}$) en esferoides¹, permite evaluar qué células se encuentran dentro del ciclo de proliferación en función de la distancia a la superficie. En la figura 2.4 se muestran autorradiografías para esferoides de diferentes tamaños que fueron mantenidos durante 24 h en un medio de cultivo en el que se incorporó $^3\text{HTdR}$, embebidos en parafina y seccionados para obtener cortes de $5 \mu\text{m}$ de espesor [Ole92]. En la figura 2.5a se muestra cómo el gradiente de proliferación disminuye con la profundidad, mientras que en la figura 2.5b se ve la relación entre el radio de un esferoide de la línea celular MCF-7 y el radio de su necrosis central [Vil90].

La compactación celular en esferoides produce volúmenes extracelulares del 35 al 55 % del volumen total, similares a los que pueden observarse en tumores humanos reales. Lo más

¹La timidina es un nucleósido que forma parte del ADN; si está presente en el medio de cultivo durante la fase de síntesis del ADN, antes de la división celular, las células la incorporarán y quedarán marcadas.

usual es que las uniones entre células sean más ligeras en la periferia, que la zona intermedia en el centro del anillo proliferante muestre mayor compactación y que existan grandes espacios alrededor de las células cercanas al núcleo necrótico. Los esferoides mantienen su estructura mediante microproyecciones de la superficie de las membranas celulares, matriz extracelular y diferentes uniones célula-célula [Sut88].

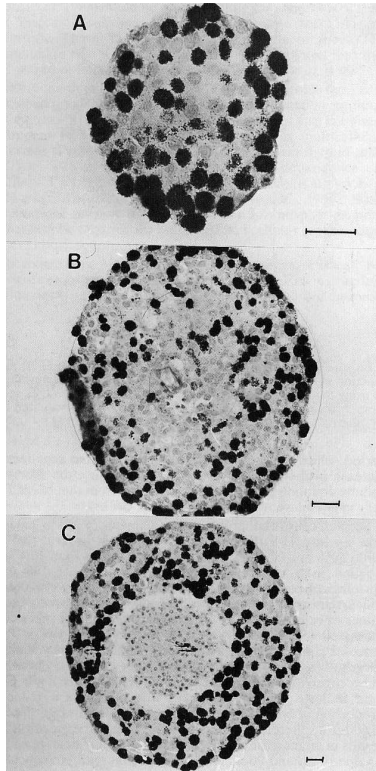


Figura 2.4: Autorradiografías de esferoides de la línea celular humana MCF-7. (A) Esferoide de 200 μm de diámetro; (B) esferoide de 500 μm de diámetro que muestra el gradiente de proliferación, la capa de células viables (de 150 μm) y el núcleo necrótico; (C) esferoide de 800 μm de diámetro, aquí el tamaño ha producido un artefacto que consiste en la entrada de medio de cultivo al interior del esferoide y la eliminación del gradiente de proliferación en la corteza externa. La barra de escala corresponde a 50 μm . Tomado de [Ole92].

Distribución de oxígeno y respuesta a la radiación

Las limitaciones de O_2 han sido consideradas por muchos como el factor más importante en la creación de un microambiente heterogéneo en el seno de los esferoides. Esto se basa en la observación de que, para algunos tipos de esferoides, el espesor del anillo viable que rodea al núcleo necrótico está relacionado con la distancia de penetración del O_2 . Sin embargo, otras experiencias muestran que la reducción de oxígeno en el medio externo no produce variación en el espesor del anillo viable, con lo que existen otros nutrientes fundamentales, como la glucosa, que determinan este espesor [Sut84].

El primer factor que influye en la respuesta de un tumor a la radiación es la propia naturaleza de las células que lo forman. Esto se conoce como *radiosensibilidad intrínseca* y ha sido comprobado por la comparación entre las respuestas de ciertos tipos tumorales a la radiación y los resultados de ensayos clonogénicos in vitro mediante células obtenidas de esos tipos tumorales [Fer81, Dea84]. La radiosensibilidad también está condicionada por factores extrínsecos físicos, químicos o biológicos.

De entre los agentes químicos que influyen en la acción de la radiación, el oxígeno es el más importante. Las células irradiadas en condiciones de oxigenación normal son tres veces

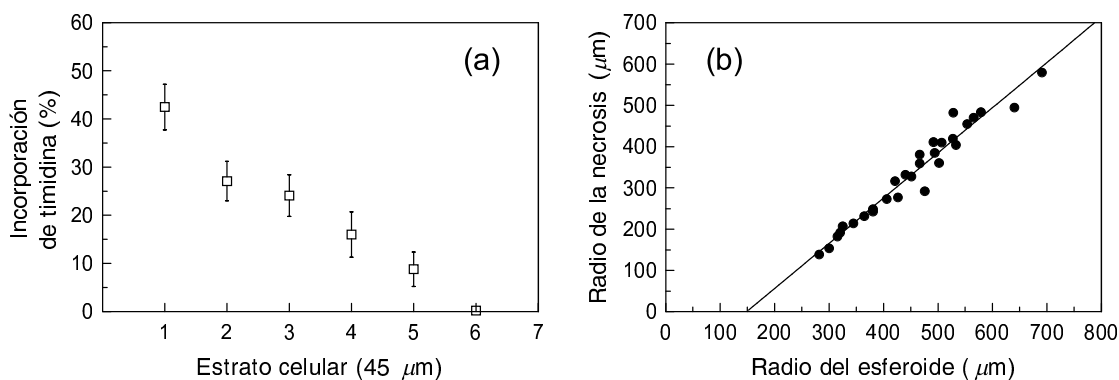


Figura 2.5: (a) Porcentaje de células dentro del ciclo en función de la distancia a la superficie de los esferoides formados con la línea celular MCF-7. Los datos se obtienen para un conjunto de 20 esferoides de entre 550 y 600 μm de diámetro. Cada estrato corresponde a 3 capas celulares, y supone unos 45 μm de espesor. (b) Relación entre el radio del esferoide y el radio de su núcleo necrótico; la recta ajustada a los datos indica la aparición del núcleo necrótico cuando el esferoide alcanza un radio de 150 ± 28 μm para un intervalo de confianza del 95%. Tomadas de Villalobos, 1990 [Vil90].

más sensibles que aquellas irradiadas en condiciones de hipoxia. La influencia del oxígeno en el resultado de la radioterapia es considerable puesto que muchos tumores poseen una proporción significativa de células hipóxicas. Si existen células quiescentes viables en condiciones de muy baja presión parcial de oxígeno cerca de los cordones necróticos, éstas condicionarán mucho la respuesta tumoral a la radiación, puesto que resultan más resistentes a la radiación que las células bien oxigenadas. La fracción de células hipóxicas en tumores animales de experimentación puede llegar al 50 %, con un valor promedio de un 15 % [Hal06].

Durante la irradiación puede producirse la oxigenación de células que se encontraban mal oxigenadas al comenzar la terapia. En algunos tumores la reoxigenación es completa y rápida (menos de 24 horas), mientras que en otros es incompleta y lenta (varios días) [Hal06].

La penetración de otras sustancias, como los citotóxicos empleados en quimioterapia, puede estar limitada por la pobre red vascular de los tumores. Los estudios de la forma de penetración de diferentes drogas en esferoides puede explicar, al menos en parte, por qué las drogas que tienen una acción semejante sobre distintos tipos celulares, actúan de modo diferente cuando las células se encuentran formando parte de un tumor.

2.1.3. Modelos de crecimiento tumoral

Los modelos matemáticos de crecimiento tumoral más simples proporcionan una expresión de la variación del tamaño del tumor a lo largo del tiempo. Los tumores humanos que han podido medirse experimentalmente (tumores de pulmón primarios y metastásicos) manifiestan un patrón exponencial en su crecimiento [Ste77], aunque los tiempos de seguimiento parten de un instante en el que ya pueden detectarse radiológicamente y, por tanto, poseen un tamaño relativamente grande, por lo que las primeras fases del crecimiento no han sido observadas. Por otra parte, el crecimiento exponencial no es común en

tumores de experimentación, ya sean animales o in vitro, de tal manera que, en general, el aumento de volumen de un tumor se lentifica a medida que el tumor crece [Lai64] (véase la figura 2.6).

De acuerdo con la visión simplificadora de que un modelo teórico de crecimiento tumoral es una relación matemática que expresa la variación del tamaño del tumor con el tiempo, muchos modelos pueden clasificarse en una de las siguientes categorías [Mar94]:

- *Empíricos*: Están basados en la hipótesis de que el crecimiento resulta de un aumento de tamaño concomitante con un proceso que lo limita. Entre ellos cabe destacar los modelos de Gompertz [Nor88], logístico o de Verhulst-Pearl [Pea24] y el de Bertalanffy [Ber60].
- *Funcionales*: Introducen características de la cinética celular incorporando parámetros como el *tiempo de duplicación*, que es el tiempo necesario para que la población celular doble el número de sus componentes; la *fracción de crecimiento*, o fracción de células mitóticamente activas; y el proceso de pérdida celular. Entre ellos pueden destacarse el modelo de Piantadosi, el modelo de autoestimulación y el modelo de inhibición [Mar94].
- *Estructurales*: Describen el crecimiento en términos estructurales, suponiendo simetría esférica para los procesos de proliferación, necrosis y difusión de nutrientes. Así, el crecimiento tumoral se expresa por la variación del radio en función del tiempo. Entre estos modelos cabe citar el de Conger y Ziskin [Con83] (figura 2.6).

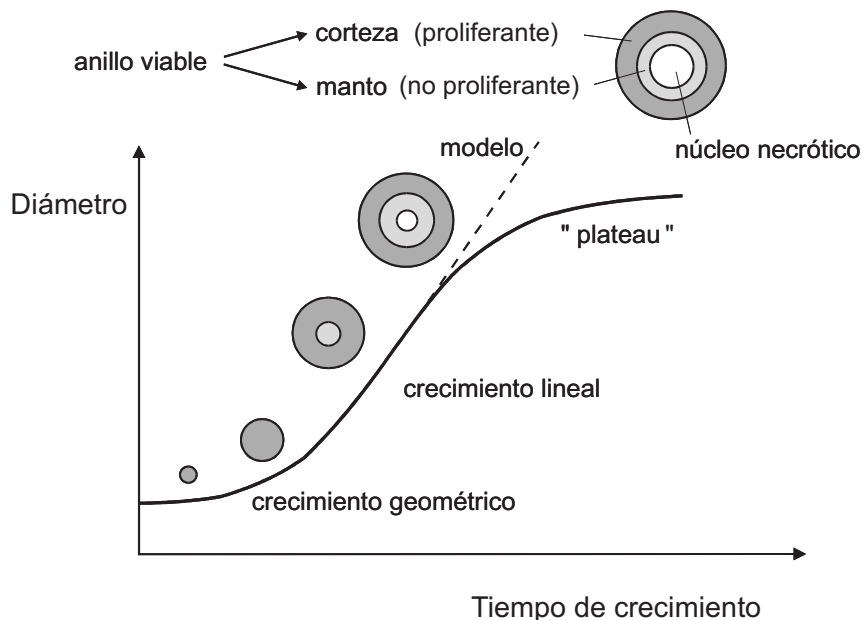


Figura 2.6: Modelo de "corteza constante" de Conger y Ziskin [Con83]. En este modelo se supone que las células proliferan con ritmo constante en el anillo externo del esferoide, de un espesor que no cambia salvo en las fases iniciales. El modelo no es capaz de reproducir la zona de "plateau" de la curva sigmoidea de crecimiento, y predice un aumento de volumen indefinido.

Pese a la anterior clasificación, realizada por Marušič et al. [Mar94], existen formas de enfrentarse al problema del crecimiento tumoral que proporcionan algo más que una relación del tamaño del tumor y el tiempo. No creemos que exista un modo único de clasificar los modelos de crecimiento, por lo que realizaremos nuestra propia clasificación, diferente de la anterior, basada en el propósito de situar nuestro trabajo en el contexto adecuado. Por ello hablaremos de modelos empíricos (categoría que coincide con la primera de las anteriores) y de base biológica. Entre los segundos podemos hacer una subdivisión basada en los diferentes métodos para considerar el problema, con un primer grupo formado por los modelos que consisten en el planteamiento de un conjunto de ecuaciones diferenciales, y un segundo grupo que emplea procedimientos de simulación computarizada.

Modelos exponencial y de Gompertz

Los modelos de crecimiento más sencillos son los empíricos. De entre ellos, el más sencillo es el modelo exponencial; su expresión matemática es la siguiente:

$$V(t_1) = V(t_0) \exp \left[\frac{\ln 2}{T_D} (t_1 - t_0) \right], \quad (2.1)$$

que relaciona el volumen del tumor en un instante t_1 con el que tenía en un instante anterior t_0 . T_D es el tiempo de duplicación, o tiempo necesario para que se doble el volumen, y es el único parámetro del modelo.

De entre los modelos que describen el comportamiento sigmoideo del que se hablaba antes, el de Gompertz es adecuado para ajustar las curvas de crecimiento de tumores in vivo [Lai64, Nor88], y el más adecuado para describir el crecimiento de esferoides multicelulares in vitro [Mar94, Ole94]. La expresión matemática del modelo de Gompertz es la siguiente:

$$V(t_1) = V(t_0) \exp\{A[1 - e^{-a(t_1-t_0)}]\}, \quad (2.2)$$

donde A y a son los parámetros libres del modelo.

En la figura 2.7 se muestra la representación gráfica de la ecuación (2.2) para diferentes valores de sus parámetros. La gráfica 2.7A muestra el efecto sobre el volumen de la variación del parámetro a para $A = 7.5$ constante; mientras que la figura 2.7B muestra el aspecto de las curvas de crecimiento cuando $a = 0.06 \text{ días}^{-1}$ es constante y A varía. Como vemos, el valor de A determina el volumen máximo asintótico, mientras que el de a gobierna el ritmo al que se alcanza este valor máximo, que viene dado por:

$$V_{\max} = \lim_{t \rightarrow \infty} V(t) = V_0 \exp(A). \quad (2.3)$$

Así, este valor máximo puede alcanzarse con ritmos de crecimiento muy diferentes. Al contrario de lo que sucede para el modelo exponencial, el tiempo de duplicación del volumen, T_D , no es constante. Su expresión puede obtenerse de forma sencilla a partir de la ecuación (2.2):

$$T_D = -\frac{1}{a} \ln \left\{ 1 + \frac{\ln 2}{\ln[V(t)/V_{\max}]} \right\}. \quad (2.4)$$

Es importante señalar que T_D crece al crecer el tamaño del tumor, de manera que la proliferación es mayor en las primeras fases de crecimiento.

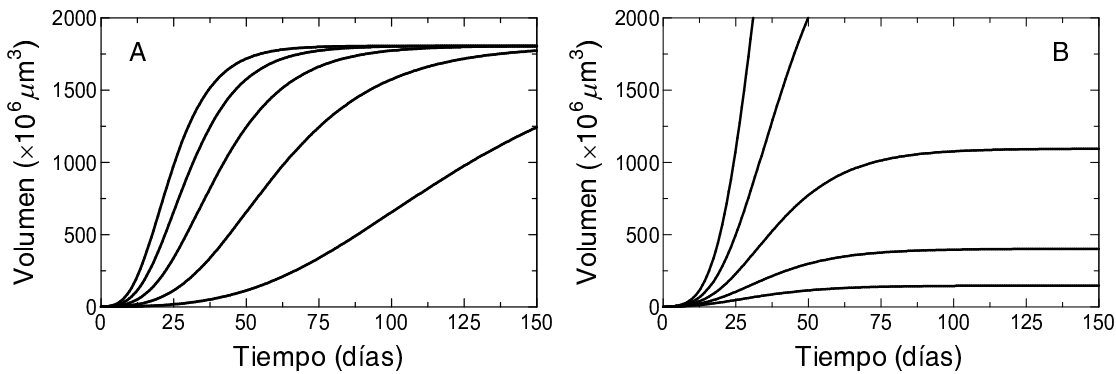


Figura 2.7: Curvas de crecimiento del modelo de Gompertz. (A) $A = 7.5$ y a variando entre 0.02 y 0.1 días^{-1} ; (B) $a = 0.06 \text{ días}^{-1}$ y A variando entre 5 y 9 .

Modelos de base biológica planteados mediante ecuaciones diferenciales

Gran parte del trabajo que ha servido como base para el desarrollo de los modelos de este tipo lo realizó Greenspan en la década de los 70 [Gre72, Gre74, Gre76] tomando como referencia el crecimiento avascular de los esferoides multicelulares.

En el primer trabajo de Greenspan se asume que los estadios iniciales del desarrollo tumoral están regulados por la difusión de nutrientes [Gre72], de manera que su concentración disminuye hacia el centro del tumor. Así, cuando se alcanza un valor crítico en la concentración de nutrientes para el que ya no es posible la vida, se produce un núcleo necrótico. Las hipótesis para la construcción del modelo son las siguientes:

1. El tumor es una esfera.
2. Las células son idénticas, incompresibles y de volumen fijo.
3. Las células cancerosas mueren si la concentración de nutrientes es baja.
4. Los nutrientes sólo son consumidos por células vivas.
5. Existe una tensión superficial del tumor que domina sobre la presión interna y permite mantener una masa sólida compacta.
6. Los restos necróticos son degradados continuamente a compuestos simples que pueden atravesar libremente las membranas celulares. El volumen perdido por la necrosis se reemplaza por células empujadas al interior por la tensión superficial.
7. Cuando se alcanza una cierta concentración crítica de los nutrientes se inhiben las mitosis, pero no se produce inmediatamente la muerte de las células.
8. La división celular es instantánea comparada con el tiempo de crecimiento. Las células hijas ocupan el mismo volumen que las células madre.

Las hipótesis 4 y 5 dan lugar a la conservación de la masa, que puede establecerse mediante una analogía con los fluidos incompresibles: las células son incompresibles y se unen mediante fuerzas adhesivas, la proliferación es una fuente del fluido y la necrosis

un sumidero. El tamaño del tumor varía por el balance neto entre producción y pérdida celulares. Así, el volumen total de células vivas en un instante t se obtiene restando a la suma de volumen inicial de células vivas y volumen de células producidas en $t \geq 0$, los volúmenes de la necrosis y el volumen de células perdidas en el núcleo necrótico para $t \geq 0$.

La ralentización del crecimiento en los tumores cuando el volumen crece puede explicarse suponiendo que el núcleo necrótico genera inhibidores del crecimiento bajo las siguientes hipótesis:

1. Los inhibidores se producen en el núcleo necrótico con una tasa constante.
2. La difusión de los inhibidores es constante y uniforme en el seno del tumor.
3. La tasa de proliferación es constante en la región de crecimiento (donde existen bastantes nutrientes y pocos inhibidores).
4. El medio externo es de composición fija.

Por definición, la concentración de nutrientes en la interfase necrosis/quiescencia es igual al valor crítico, mientras que en la interfase quiescencia/proliferación el nivel crítico corresponde a la concentración del inhibidor.

La lentificación del crecimiento cuando el tumor aumenta su tamaño puede explicarse también suponiendo que los inhibidores del crecimiento son generados por las células viables como consecuencia de su actividad vital. Aunque la evolución del sistema depende de la forma en que se generen los inhibidores, el resultado final es un estado estacionario que coincide para ambos planteamientos.

A partir de este conjunto de hipótesis pueden escribirse las ecuaciones diferenciales que, una vez resueltas, nos llevarán a la expresión del modelo. Para ello es preciso suponer determinados casos particulares que permitan soluciones analíticas, o bien proceder a su resolución numérica. No mostraremos las matemáticas de este asunto aquí, que pueden seguirse en los trabajos de Greenspan citados.

El modelo puede extenderse para describir el crecimiento asimétrico, más realista, de los tumores. Así aparecen aspectos como la velocidad de las células, la presión en el seno del tumor y el efecto de la tensión superficial: los nacimientos y muertes generan diferencias de presión, de tal modo que las células se desplazan de regiones de alta proliferación a regiones de muerte celular; la fuerza cohesiva que mantiene al tumor compacto puede verse como una tensión superficial que actúa sobre la frontera, de manera que la tasa de crecimiento del tumor depende del balance entre la fuerza expansiva causada por la proliferación y por la fuerza de retención de la tensión superficial [Gre72, Byr95]. También pueden desarrollarse modelos de este tipo para incluir varias poblaciones celulares y la presencia de vasos sanguíneos [Sta07].

Baste lo dicho como ejemplo del modo en que se trabaja con estos modelos, también como anuncio del gran nivel de complejidad a que puede llevarnos un estudio semejante del crecimiento tumoral.

Modelos desarrollados mediante simulación

Como acaba de verse, los métodos clásicos de la matemática para abordar el problema del crecimiento tumoral, o bien son en extremo simples, adoptando un punto de vista empírico, o bien suponen una complejidad importante que no produce a cambio escenarios teóricos que permitan mejorar la práctica clínica (que es nuestra motivación fundamental). En este contexto, aparece de modo natural la idea de considerar los métodos de simulación computarizada como una alternativa interesante para estudiar el problema del crecimiento de los tumores.

Los trabajos de Düchting y sus colaboradores [Duc85, Duc89] sentaron las bases para el desarrollo de modelos computacionales basados en autómatas celulares [Gar70]. En la concepción más sencilla de un modelo computacional se establece un proceso de división celular que puede tener en cuenta la duración de las diferentes fases del ciclo de proliferación, formas de relación entre células que influyen en la probabilidad de división y muerte y que dependen de la distancia entre ellas, y algunos mecanismos de transporte para simular el movimiento de las células en el seno del tumor. Pero este punto de partida puede complicarse considerablemente introduciendo aspectos interesantes como la posibilidad de generar vasos sanguíneos (y la topología que suponen para la distribución de nutrientes), la respuesta a diferentes formas de terapia, la capacidad de producir metástasis o la interacción con un medio externo agresivo, entre otros [Sta02].

Naturalmente, esta vía de trabajo puede llevarnos a plantear simulaciones con un grado de complejidad aún mayor que la de los modelos escritos mediante ecuaciones diferenciales, al menos en lo que a ingredientes se refiere. Sin embargo, los modelos computacionales son más flexibles y pueden ser modificados de manera más sencilla tras el esfuerzo de su desarrollo inicial, con lo que cabe esperar que puedan llevarse a la práctica clínica con más facilidad.

Actualmente, y en consonancia con las ideas expresadas en esta memoria, la capacidad para integrar la variabilidad en un modelo computacional del crecimiento tumoral nos ha llevado a desarrollar una línea de trabajo en esta dirección con una premisa fundamental: buscar los ingredientes esenciales que de modo más sencillo reproduzcan lo observado en los tumores humanos y de experimentación. El objetivo es, una vez más, poder aplicar el modelo a la práctica clínica y estudiar, en primer lugar, los mismos aspectos que desarrollamos ahora utilizando como punto de partida un modelo empírico del crecimiento. En la figura 2.8 mostramos un resultado para la simulación de esferoides multicelulares.

No trataremos con más extensión este asunto, por no ser el objeto del trabajo que nos ocupa; consideramos suficiente lo dicho hasta ahora para situar esta memoria en el contexto adecuado dentro del estudio del crecimiento tumoral.

2.1.4. Supervivencia celular

Es usual cuantificar la muerte celular mediante una *curva de supervivencia*, que es la representación gráfica de la fracción de células supervivientes en función de la dosis administrada. La *fracción de supervivencia*, s , viene dada por:

$$s = \frac{N(d)}{N_0}, \quad (2.5)$$

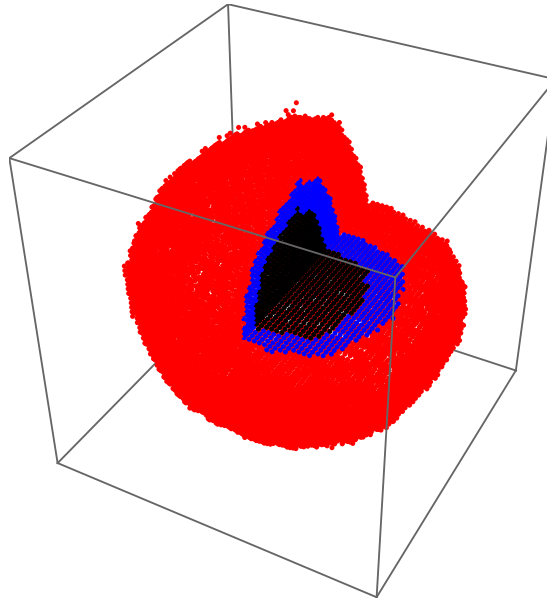


Figura 2.8: Tumor semejante a los esferoides multicelulares generado mediante simulación. Se muestra un corte en el que pueden apreciarse, del exterior al interior, las capas de células proliferantes e hipóxicas y el núcleo necrótico.

donde $N(d)$ es el número de células supervivientes tras la dosis d y N_0 el número de células inicial antes de la irradiación. Dado que un tumor macroscópico de unos 2 cm de diámetro puede albergar de 10^9 a 10^{10} células, resulta interesante observar la curva hasta supervivencias del orden de 10^{-10} . Por esta razón, la fracción de supervivencia suele representarse gráficamente en forma semilogarítmica.

La manera habitual de obtener la curva de supervivencia de una población celular es el ensayo clonogénico (figura 2.9), sobre el que ya se habló antes. El modo en que este ensayo se emplea para determinar la supervivencia consiste en la siembra de un número determinado de células en cajas de cultivo; tras conservar una muestra de control, que no se irradia pero sufre idéntica manipulación que las demás, e irradiar el resto con diferentes dosis, se cultivan durante varias semanas. Después de esto, las células se fijan al sustrato plástico de las cajas de cultivo, se tiñen, y se procede a contar las colonias formadas. Una colonia está integrada por un mínimo de 50 elementos formados a partir de una sola célula. Si definimos la *eficacia de siembra* como el número de colonias formadas dividido por el número de células sembradas, la supervivencia para una dosis d se obtiene dividiendo la eficacia de siembra de la muestra irradiada por la eficacia de siembra del control, esto es:

$$s = \frac{C(d)/M(d)}{C_0/M_0}, \quad (2.6)$$

donde $C(d)$ y C_0 son el número de colonias formadas tras la dosis d y para el control respectivamente, $M(d)$ es el número de células sembradas en la muestra que se irradia con una dosis d y M_0 es el número de células sembradas en la muestra empleada como control.

Para una población de células irradiadas en condiciones tales que la muerte por radiación supere a la proliferación, las curvas de supervivencia serán monótonas decrecientes.

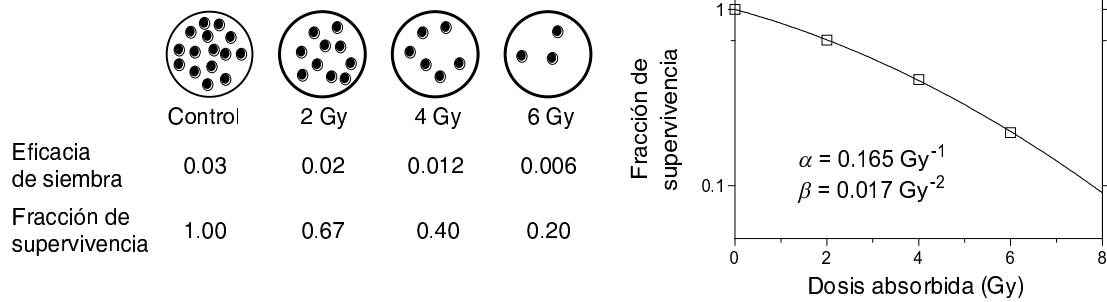


Figura 2.9: Esquema de un ensayo clonogénico. Para una determinada dosis, la fracción de supervivencia se calcula dividiendo la eficacia de siembra para esa dosis por la eficacia de siembra para el control. Los datos se ajustan al modelo LQ y los parámetros resultantes se muestran en la figura.

Es necesario destacar que la estructura del agregado celular en el momento de la irradiación tiene una gran influencia en la forma en que éste responderá más tarde. Cabe esperar que la supervivencia dependa de las características de los agregados y, consecuentemente, que los llamados cultivos en *monocapa* presenten una respuesta a la radiación diferente de los cultivos organizados con una estructura tridimensional, más próximos a la forma tumoral real. Profundizaremos en esta cuestión más tarde.

El modelo lineal-cuadrático

Una vez descritas las curvas de supervivencia es conveniente su modelado teórico. Los modelos empleados para describir las curvas de supervivencia han de considerar ciertos aspectos aceptados en la actualidad. El primero de ellos se refiere a la existencia de dos componentes fundamentales del daño celular: *daño letal* y *daño subletal*. El daño letal produce la muerte directa de la célula; el daño subletal puede, o bien ser reparado, o bien producir la muerte de la célula por acumulación tras una dosis de radiación adicional [Elk60]. Según esto, la tasa de reparación del daño subletal jugará un importante papel. Los resultados experimentales muestran que pueden existir diferentes tipos de daño subletal con tasas de reparación diferentes, y que éstas pueden aproximarse convenientemente por un proceso exponencial [Tha89], aunque este proceso no ha de tener necesariamente una sola componente [Nun95]. Por otra parte, hay resultados que apoyan la existencia de procesos de reparación múltiple [Veg85, Fow89a, Ang92]. Además, se ha sugerido que los procesos de reparación exhiben efectos de saturación [Goo85]. Igualmente se ha mostrado que la tasa de reparación aparente del daño subletal depende de la dosis [Tra87, Par88, Fow89a, Roj89].

Otro hecho a tener en cuenta es que el efecto final de una dosis de radiación depende del tipo de radiación y del ritmo con que ésta se administre. Por tanto, los parámetros que caractericen la respuesta de la población celular irradiada dependerán de la calidad de la radiación. Por otra parte, el modo en que una población celular responde a la radiación depende de la forma en que sus constituyentes se distribuyen en el ciclo reproductivo cuando se administra la dosis. Además, si las condiciones de la irradiación son tales que la proliferación es importante habrá que tenerla en cuenta.

Por último, los factores físicos y químicos que dependen de la disposición celular, entre los cuales destacamos la distribución de oxígeno y nutrientes, influirán en la supervivencia. El medio ambiente y la estructura tridimensional de un agregado tumoral producirán compartimentación celular, esto implica la existencia de poblaciones celulares con distinta respuesta a la radiación dentro del agregado.

Existe un buen número de modelos que tienen en cuenta algunos de los presupuestos anteriores, y que pueden aplicarse, con mayor o menor éxito, en el análisis de la supervivencia celular en función de las condiciones en que se produce la irradiación. Estos modelos suelen ser formulaciones deterministas [Kel72, Cha81, Tha85, Cur86, Ciu87, San92, Mil93, Zai96], aunque también los hay basados en aproximaciones estocásticas [Alb89, Kru92, Hla94].

Un modelo analítico que tenga como hipótesis un buen número de los presupuestos anteriores, si tiene solución, resultará lo bastante complicado como para que no resulte atractivo a quienes deben llevarlo a la práctica clínica. Esto supondrá que no se disponga de una colección suficiente de parámetros experimentales para el modelo y que, cerrando el círculo, no pueda aplicarse en la radioterapia.

El modelo de supervivencia que mejor suerte ha corrido en las últimas décadas es el denominado lineal-cuadrático (LQ), basado en la siguiente forma funcional:

$$-\ln s = \alpha d + \beta d^2, \quad (2.7)$$

donde s es la fracción de supervivencia, d la dosis y α y β son constantes características de la población celular estudiada para unas determinadas condiciones de irradiación.

El modelo LQ ha sido ampliamente utilizado en los últimos años, tanto en su forma convencional [Kel72, Cha81], como en la que adopta para la radioterapia fraccionada [Dou76, Bar82]. Las razones se encuentran en que, a pesar de su simplicidad, proporciona una descripción satisfactoria de la curva de supervivencia de una población celular homogénea y, en su origen, se lo dotó de una sencilla interpretación biológica, si bien hoy día es considerado por la mayoría un modelo puramente empírico [Zai98]. Su aplicación extensiva nos ha proporcionado una importante colección de datos experimentales para los parámetros α y β (en particular del valor del cociente α/β) de diferentes tejidos tumorales y sanos. Las condiciones en que puede aplicarse este modelo son cuatro:

1. La dosis se administra en un tiempo mucho menor que el tiempo medio de reparación del daño subletal.
2. Durante la irradiación la repoblación celular es despreciable.
3. Si la dosis se administra en fracciones, el intervalo de tiempo entre dos irradiaciones consecutivas es suficientemente largo como para que la reparación de todo el daño subletal sea completa.
4. Dos fracciones iguales de dosis separadas un tiempo suficientemente largo reducen el número de células en idéntica proporción.

Bajo estos presupuestos, la forma del modelo para una aplicación fraccionada de la dosis es:

$$-\ln s = \alpha \sum_{k=1}^n d_k + \beta \sum_{k=1}^n d_k^2 = d \left[\alpha + \frac{\beta}{d} \sum_{k=1}^n d_k^2 \right], \quad (2.8)$$

donde d es la dosis total impartida en una secuencia de n fracciones y d_k es la dosis de la fracción k -ésima.

Uno de los aspectos interesantes que pueden analizarse con sencillez mediante este modelo es la diferencia entre los tratamientos fraccionados y no fraccionados. Como puede verse en la figura 2.10, para una misma dosis total cuando el intervalo entre fracciones es suficientemente largo como para que se produzca la reparación completa del daño subletal, el fraccionamiento de la dosis produce un aumento de la supervivencia con respecto a la irradiación única.

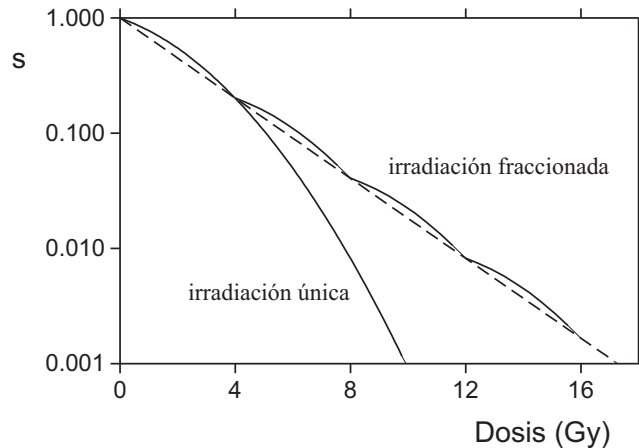


Figura 2.10: Efecto del fraccionamiento en la supervivencia celular según el modelo LQ. Cuando la dosis se administra en fracciones, en este caso de 4 Gy, la curva resultante es una línea recta producto de la “repetición” del tramo inicial de la curva para irradiación única.

2.1.5. Crecimiento tumoral y radiosensibilidad

Como venimos diciendo, los MTS han despertado una considerable atención en las últimas décadas [Sut88, San99, Dur01], fundamentalmente porque reproducen in vitro las micrometástasis y el crecimiento de los tumores reales. Los MTS están compuestos por una mezcla heterogénea de células (en lo que se refiere a sus condiciones de oxigenación, progresión en el ciclo celular, etc.) y permiten la descripción del crecimiento tumoral cuando no está influido todavía por la generación de vasos sanguíneos. Así, los MTS se consideran un buen escenario para investigar la biología de los tumores y evaluar el efecto de diferentes formas de terapia del cáncer.

Buena parte del trabajo en esta área se ha centrado en la determinación de la radiosensibilidad celular, expresada como fracción de supervivencia celular. Éste es uno de los parámetros básicos en la estimación de la posible respuesta de las células de un tumor a la radiación, debido a que la radiosensibilidad de las células tumorales humanas en cultivo [Fer81, Dea84, Buf01] y la respuesta de los MTS [Wei84] han sido correlacionadas con la posibilidad de curar mediante radiación el tipo de tumor correspondiente.

No obstante, el uso de los esferoides irradiados para obtener la fracción de supervivencia ha resultado controvertido. La suposición usual de la mayor parte de los estudios con MTS

es que, tras la irradiación, los esferoides vuelven a crecer, tras un determinado período de tiempo, del mismo modo en que lo hubiesen hecho de no haber sido irradiados. Este período, denominado *tiempo de retraso* (GD), puede definirse como la diferencia entre los tiempos que precisan un esferoide irradiado y uno sin irradiar para alcanzar un cierto volumen; cinco veces el inicial [Hil89] u ocho veces el inicial [Sch90], dependiendo de los autores. Además, algunos estudios muestran que el GD puede no ser apropiado para comparar la radiosensibilidad de tumores de diferentes tamaños [Hil89].

Otros métodos obtienen la fracción de supervivencia como la relación entre la intersección de la extrapolación del tramo lineal de la curva de crecimiento (en escala logarítmica) con el eje de ordenadas (tiempo igual a cero) y el volumen inicial del tumor [Whe85]. Sin embargo, no está claro qué significa “parte lineal” en la curva de crecimiento. Además, los volúmenes de los diferentes MTS de la muestra experimental no se someten a ningún tipo de normalización, lo cual hace que las comparaciones entre ellos puedan producir resultados inadecuados.

En este capítulo examinaremos la hipótesis de recuperación del crecimiento tras irradiación de esferoides multicelulares mediante un nuevo método. Los esferoides de la muestra experimental serán considerados individualmente, de manera que podamos determinar la curva de crecimiento de cada MTS en particular y normalizarla para un volumen inicial común para todos los MTS. Además, suponiendo compuesta la población celular de cada MTS tras irradiación por células muertas y células supervivientes, estableceremos un modo para calcular la fracción de supervivencia directamente de la curva de crecimiento.

Una cuestión fundamental de nuestro planteamiento es que los métodos desarrollados, al contrario de lo que sucede en la determinación de la supervivencia celular mediante un ensayo clonogénico, no precisan de la disgregación de los esferoides y, por tanto, la manipulación del material biológico es mínima, pues los datos que precisamos se obtienen mediante la observación de los agregados con un microscopio. Esto hace muy atractivo el procedimiento para estudiar el efecto de la radiación en este modelo.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Esferoides de la línea humana MCF-7 de cáncer de mama

Cultivo celular

Se ha empleado la línea celular humana hormonodependiente MCF-7, clon BB, procedente de un derrame pleural metastásico de una enferma que padecía adenocarcinoma mamario. Esta línea celular fue establecida por Soule y sus colaboradores en 1973 [Sou73]. Las células se hacen crecer en medio esencial mínimo, complementado con un 10 % de suero fetal bovino. Los cultivos en monocapa se mantienen a una temperatura de 37°C en una atmósfera húmeda con el 95 % de aire y el 5 % de CO₂. Las células que se emplean en el desarrollo de los esferoides se obtienen separando los agregados en monocapa mediante la enzima tripsina.

Iniciación de los esferoides

Para la iniciación de esferoides multicelulares de la línea MCF-7, a partir de las células cultivadas en monocapa, es necesaria la presencia de estradiol en el medio de cultivo, lo que indica una dependencia hormonal en el proceso de organización tridimensional; un número mínimo de células, y su siembra en una superficie apropiada que impida la adherencia al sustrato de cultivo [Ole92, Ole94, Vil95a].

El procedimiento se concreta como sigue. Se depositan entre 1000 y 1500 células en cada uno de los pocillos de una caja de 48. Previamente, sobre el fondo de cada uno de ellos, se ha colocado una capa de agar para evitar la adherencia de las células al sustrato plástico (como sucede en los cultivos en monocapa). La siembra se completa añadiendo medio de cultivo a cada pocillo. Las cajas así constituidas se someten a agitación continua durante un tiempo que va de 18 a 20 horas para favorecer la formación del agregado celular. Transcurrido este tiempo, las cajas se mantienen en una estufa de 24 a 48 h, hasta que los agregados adoptan la conformación esférica propia de los esferoides multicelulares. De este modo se obtiene un esferoide de unos 100 μm de diámetro en cada pocillo. El medio de cultivo de cada pocillo es sustituido por medio fresco cada 3 días, asegurándose así el aporte adecuado de nutrientes a las células.

Los MTS que constituyen el conjunto estudiado, tenían en el momento de la irradiación un diámetro entre 220 y 280 μm . Esto asegura la ausencia de un núcleo necrótico y evita un gradiente de nutrientes en el interior de los esferoides, de manera que se establecen las condiciones para que se cumpla la hipótesis de proporcionalidad, que usaremos más tarde, entre el volumen y el número de células .

Irradiación

El conjunto total de muestras lo forman inicialmente seis cajas de 48 pocillos cada una. De estas seis, una se toma como control y sufre la misma manipulación que el resto, pero no es irradiada. Las restantes cajas se tratan con dosis de 1, 2, 3, 4 y 5 Gy, administradas en forma de rayos X de 18 MV. La unidad generadora de radiación es un acelerador lineal de electrones de la marca *Siemens*, modelo *Mevatron KDS*, instalado en el Hospital Universitario "San Cecilio" de Granada. Las muestras se colocan en el seno de un maniquí de láminas de agua sólida (RW3 de PTW, Friburgo), con 3 cm y 20 cm de este material sobre y bajo las muestras respectivamente; de este modo producimos una distribución de dosis homogénea en las muestras que puede determinarse de manera más precisa.

Tras la irradiación se procede a medir individualmente el diámetro de los esferoides. Esto se hace mediante un microscopio óptico invertido de contraste de fases, al que se acopla una escala graduada en uno de sus oculares. El volumen del agregado celular se estima suponiendo simetría esférica, de manera que $V = \pi\delta^3/6$, donde δ es el diámetro.

2.2.2. Crecimiento de los esferoides de control

Para caracterizar la forma en que crecen los esferoides multicelulares de la línea MCF-7 en las condiciones de cultivo descritas emplearemos el modelo de Gompertz dado por la ecuación (2.2), con lo que esta caracterización consistirá en la determinación de los

parámetros A y a para el crecimiento de los agregados. El procedimiento usual, que consiste en la siembra de células en un frasco de cultivo para dar lugar a varios esferoides que crecen en el mismo lugar, requiere dos pasos [Whe85, Sch89].

En el primero de estos pasos el volumen medio de una muestra de esferoides en el instante t_j se calcula como:

$$\bar{V}(t_j) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n V_i(t_j) \quad j = 1, \dots, k \quad (2.9)$$

donde n es el número de esferoides incluido en la muestra, $V_i(t_j)$ es el volumen medido para el esferoide i -ésimo en el instante t_j , y k es el número de veces que se mide el volumen a lo largo del período de seguimiento. El segundo paso es ajustar estos valores medios a la función sigmoidea definida por la ecuación de Gompertz (2.2).

Esta forma de proceder tiene dos inconvenientes. El primero de ellos es que oculta información de gran interés: la variabilidad en las formas de crecimiento de diferentes esferoides, que puede ser importante; el segundo es que mezcla esferoides de volúmenes iniciales diferentes y, por tanto, en etapas de crecimiento diferentes, cabe esperar que esto produzca una mayor incertidumbre en los resultados.

Para evitar estos dos inconvenientes procederemos de una manera distinta. Primero, en lugar de calcular la media para cada instante de un conjunto de volúmenes, seguiremos el volumen de cada esferoide particular, y calcularemos los parámetros que le corresponden según el modelo de Gompertz ajustado a su curva individual de crecimiento. Seguidamente se normalizan las curvas de crecimiento de los esferoides individuales a un volumen inicial común, de manera que puedan compararse correctamente. Por último, calculamos los valores medios de los parámetros determinados para el conjunto de esferoides, y éstos serán los que caractericen el proceso de crecimiento de los esferoides de la línea celular MCF-7.

La normalización a un volumen inicial común (que abreviamos con VIC y que notaremos en las expresiones matemáticas con V_{IC}) se basa en la suposición de que el crecimiento para cada esferoide puede dividirse en dos etapas: en la primera de ellas, que dura un tiempo T y que no observamos, el esferoide evoluciona desde el VIC hasta el volumen inicial determinado en la primera medida en $t = 0$, V_0 . Así:

$$\begin{aligned} V(t+T) &= V_{IC} \exp \{A [1 - \exp(-a(t+T))]\} \\ &= V_{IC} \exp \{A [1 - \exp(-aT)]\} \exp \{A \exp(-aT) [1 - \exp(-at)]\} \\ &= V_0 \exp \{[A - \ln(V_0/V_{IC})] [1 - \exp(-at)]\} \\ &= V_0 \exp \{A' [1 - \exp(-at)]\}. \end{aligned} \quad (2.10)$$

Por tanto, la normalización consiste en un cambio del parámetro A dado por la siguiente expresión:

$$A' = A - \ln \left(\frac{V_0}{V_{IC}} \right). \quad (2.11)$$

Como puede observarse, el parámetro a no se ve afectado por la normalización. Por conveniencia, se emplea un valor para el volumen de normalización $V_{IC} = 10^6 \mu\text{m}^3$, que es menor que cualquiera de los volúmenes medidos para los esferoides de la muestra; cualquier otra elección para este valor de normalización produce resultados equivalentes.

2.2.3. Crecimiento de los esferoides irradiados

Las curvas de recrecimiento para esferoides tratados con diversas dosis de radiación presentan características particulares, que han de incorporarse en el modelo teórico que utilicemos para describirlas:

1. Tras la irradiación los esferoides se estancan en un volumen aproximadamente constante o disminuyen su tamaño para, a continuación, recrecer en algunos casos o fracasar en el recrecimiento. El número de fracasos aumenta con la dosis [Whe85, Sch89, Ole94].
2. Una vez superada la fase de regresión o estancamiento, las pendientes de las curvas que representan $\ln V$ frente al tiempo son semejantes para los esferoides de control y tratados en un rango de dosis variable según la línea celular considerada [Whe86, Sch89, Ole94] (véase la figura 2.11). No obstante, esta aparente semejanza precisa ser estudiada.

Estas dos características justifican la definición de un tiempo de retraso en el crecimiento de los esferoides irradiados, que es la diferencia entre los tiempos que precisan un esferoide irradiado y uno sin irradiar para alcanzar cierto volumen. Como se dijo antes, esta definición tiene la desventaja de ser dependiente del volumen elegido como referencia.

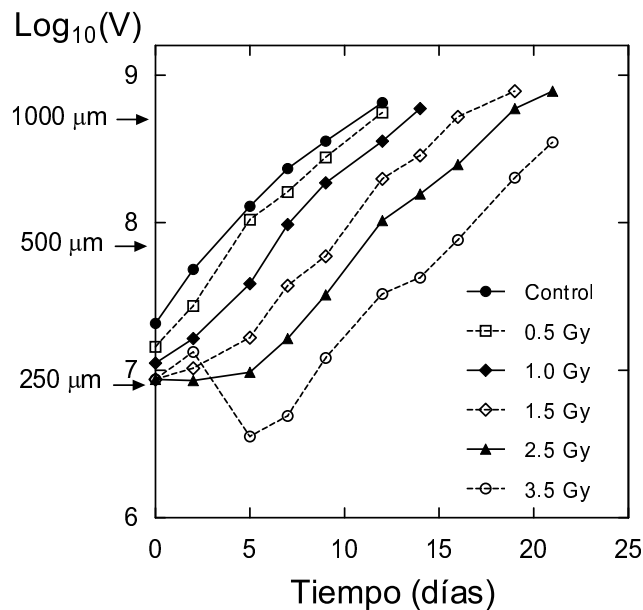


Figura 2.11: Recrecimiento de esferoides multicelulares de neuroblastoma tras ser irradiados con un haz de rayos X de 4 MV a diferentes dosis. Se representa el logaritmo del volumen medio en μm^3 frente al tiempo tras la irradiación. También se indican los volúmenes correspondientes a esferoides de diámetros de 250, 500 y 1000 μm . Tomada de [Whe86].

Nosotros abordamos el problema de otra manera. En primer lugar suponemos que, tras la irradiación, coexisten dos conjuntos de células. El primero de ellos está constituido por las células supervivientes, que van a ser responsables del recrecimiento del sistema;

mientras que el segundo corresponde a la población “esterilizada”, que incluye tanto a las células muertas efectivamente, como a las que han perdido su capacidad para dividirse [Odo97]. Por lo tanto, el volumen total del sistema puede expresarse como la suma de los volúmenes de cada uno de estos subsistemas y, consecuentemente, la forma en que el volumen total varía en el tiempo dependerá de la forma en que lo hagan los volúmenes de cada uno de los subsistemas.

$$V(t) = V^{\text{sup}}(t) + V^{\text{est}}(t), \quad (2.12)$$

donde V^{sup} es el volumen de las células supervivientes y V^{est} el de las células esterilizadas.

Una hipótesis adicional, dado el segundo hecho experimental mencionado, será que la población superviviente crece según el modelo gompertziano:

$$V^{\text{sup}}(t) = V_0^{\text{sup}} \exp[A(1 - \exp(-at))], \quad (2.13)$$

donde $V_0^{\text{sup}} \equiv V^{\text{sup}}(t = 0)$ es el volumen de células supervivientes justo después de la irradiación.

Por último, hemos de establecer la evolución de la población esterilizada. Esta población no crecerá, por lo que, o bien se estanca y ocupa un volumen constante mientras el sistema exista, o bien disminuye con un ritmo más o menos rápido. Adoptamos una forma funcional empírica que permite describir de manera sencilla ritmos de pérdida de elementos muy distintos para esta subpoblación. La expresión propuesta para el volumen de los esferoides irradiados es:

$$V(t) = \frac{M}{1 + \exp[k(t - T)]} + V_0^{\text{sup}} \exp \{A[1 - \exp(-at)]\}, \quad (2.14)$$

como antes, V_0^{sup} es el volumen de la población superviviente que produce el recrecimiento del sistema, A y a son los parámetros del modelo de Gompertz para el crecimiento de dicha población y M , k y T son constantes que indican la evolución de la población esterilizada.

Si llamamos V_0 al volumen en el momento de la irradiación, ha de cumplirse que $V(t = 0) = V_0$, esto es:

$$V(t) = (V_0 - V_0^{\text{sup}}) \frac{1 + \exp(-kT)}{1 + \exp[k(t - T)]} + V_0^{\text{sup}} \exp \{A[1 - \exp(-at)]\}. \quad (2.15)$$

El modelo expresado mediante la ecuación (2.15) da cuenta de varias situaciones distintas, como puede verse en la figura 2.12. En (A), (B) y (C) se muestra, con línea de puntos, la evolución de la población esterilizada, con línea de trazos, la evolución de la población en crecimiento y, con línea continua, la evolución de la población global en varios casos distintos. Como vemos, los ritmos de pérdida celular para la población esterilizada pueden ser muy diferentes, con lo que el resultado para la evolución de la población completa cambia de unas situaciones a otras. En (A) la población crece justo después de la irradiación para decrecer seguidamente y, tras un cierto tiempo, recuperarse el crecimiento neto. En (B) la población en su conjunto crece en todo momento, aunque lentamente al principio. En (C) la población decrece desde el momento de la irradiación para recuperar después un crecimiento neto positivo.

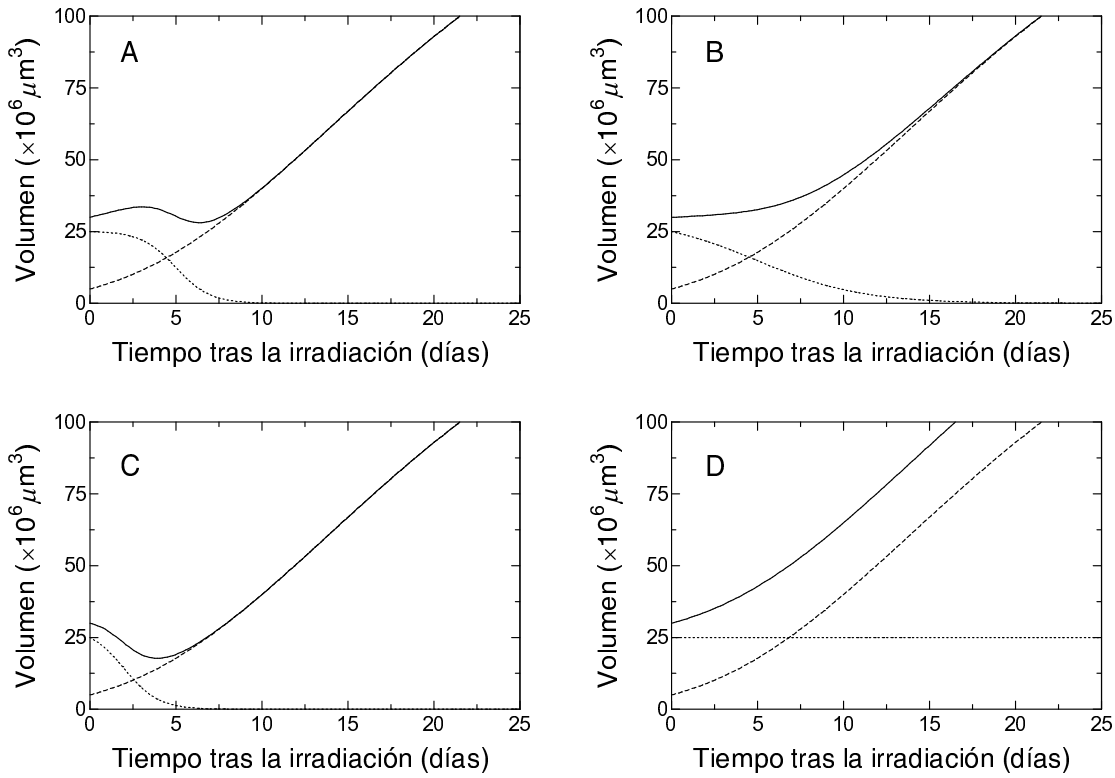


Figura 2.12: Modelo de recrecimiento en cuatro situaciones distintas. La línea de puntos representa la evolución de la población esterilizada, la línea de trazos la evolución de la población superviviente y la línea continua la evolución de la población conjunta. En todos los casos $V_0^{\text{sup}} = 5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, $V_0 = 30 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, $A = 3.5$ y $a = 0.09 \text{ días}^{-1}$. (A) $k = 1 \text{ días}^{-1}$, $T = 5$ días; (B) $k = 0.33 \text{ días}^{-1}$, $T = 5$ días; (C) $k = 1 \text{ días}^{-1}$, $T = 2$ días. En (D) se muestra el modelo de recrecimiento simplificado para el cual el volumen de la población esterilizada permanece constante.

Un caso particular de la ecuación (2.15) consiste en suponer que el volumen de la población esterilizada no cambia con el tiempo; esto es, $T \rightarrow \infty$. Esta aproximación es adecuada en el caso de los esferoides de la línea MCF-7 que hemos estudiado, porque la pérdida de elementos celulares observada tras la irradiación es muy pequeña. Por otra parte, los ensayos de ajuste de nuestros datos experimentales con el modelo dado por la expresión (2.15) producen valores para k y T compatibles con la hipótesis anterior. Así pues, el modelo simplificado que emplearemos en nuestro análisis se escribe como sigue:

$$V(t) = (V_0 - V_0^{\text{sup}}) + V_0^{\text{sup}} \exp \{ (A - \ln(V_0^{\text{sup}}/V_{\text{IC}})) [1 - \exp(-at)] \}, \quad (2.16)$$

donde se ha incluido también la normalización al volumen inicial común.

En la figura 2.12D se muestra un ejemplo del modelo dado por (2.16). Como puede apreciarse, la población esterilizada posee un volumen constante en el tiempo que se suma al de la población proliferante.

Como se ha dicho antes, el tamaño de los esferoides en el momento de la irradiación permite suponer que sus volúmenes son proporcionales al número de células clonogénicas

que contienen y, por tanto, el volumen de la población proliferante no es más que un reflejo del número de clonógenos supervivientes tras la irradiación. Esto es, el esferoide recrece de manera que los responsables del aumento de volumen son los clonógenos supervivientes [Whe85]. Esta hipótesis requiere una discusión algo más detallada.

Para esferoides de pequeño tamaño (diámetro inferior a unos 300 μm), las células clonogénicas se distribuyen homogéneamente en todo su volumen. No se aprecian signos de hipoxia ni gradiente de unidades proliferantes con la profundidad (véanse las figuras 2.4 y 2.5). Sin embargo, para tamaños mayores de 300 μm los signos de un gradiente de proliferación se hacen manifiestos tras el marcaje con timidina tritiada [Ole92], de modo que aparece un núcleo necrótico. De aquí se concluye inmediatamente que, en general, el número de células proliferantes no es proporcional al volumen². Esta dificultad se supera si los radios de los esferoides en el momento de la irradiación son menores o iguales al espesor del anillo de proliferación. En nuestro estudio experimental garantizamos esta situación eligiendo el tamaño apropiado de los esferoides.

Tras lo discutido, la fracción de supervivencia puede escribirse así:

$$s = \frac{V_0^{\text{sup}}}{V_0}. \quad (2.17)$$

Ajustando los resultados obtenidos para la fracción de supervivencia al modelo LQ, obtendremos los parámetros de radiosensibilidad de la población celular estudiada.

2.2.4. Selección de los esferoides y métodos estadísticos

La radiosensibilidad depende del método empleado en su determinación. Por ello sólo podemos aspirar a una correlación entre diferentes ensayos. Ahora bien, dentro de un ensayo concreto es fundamental que exista homogeneidad para todas las muestras que lo integran. La homogeneidad se consigue eliminando de las muestras todos aquellos elementos sobre los que no se puedan aplicar los procedimientos definidos previamente con suficientes garantías. En nuestro caso un esferoide será considerado como elemento válido si cumple todas y cada una de las siguientes condiciones:

1. No es resultado de la fusión de varios esferoides, originados por separado en la siembra inicial del material celular.
2. No engloba en su interior ninguna fibra de agar u otro elemento extraño.
3. El pocillo en el que se desarrolla no ha sido contaminado por un hongo o bacteria.
4. Es muy aproximadamente esférico³.

²Aunque las células no se encuentren dentro del ciclo reproductivo, pueden entrar en él si las condiciones ambientales cambian. Por otra parte, un aumento de tamaño producirá compartimentación celular y subpoblaciones con radiosensibilidad distinta. Todas estas situaciones complican la interpretación de los datos resultantes del ensayo.

³Aunque en otros trabajos se estima el volumen suponiendo esferoides elipsoidales y midiendo dos diámetros perpendiculares [Ole92], nosotros descartamos todos aquellos que posean una marcada asimetría. Por ello también se fija un límite en el tiempo de seguimiento de un esferoide particular, ya que, al aumentar el tamaño de forma considerable, se presenta asimetría en muchos casos, con lo que una extensión del tiempo de seguimiento produciría muestras con un pequeño número de esferoides válidos para el análisis y, consecuentemente, una mayor incertidumbre estadística.

5. Recupera, al menos en apariencia, su ritmo de crecimiento inicial pasado un cierto tiempo⁴.

Entre las fuentes de incertidumbre no cuantificables que afectan a nuestro experimento podemos destacar las siguientes: la falta de esfericidad de los agregados celulares, los efectos del cambio periódico del medio de cultivo y la manipulación necesaria para ello, el halo de restos celulares que, en algunos casos, se forma en torno a la superficie de los esferoides tratados, que puede producir una indeterminación de las fronteras del agregado, y los efectos del sistema óptico empleado en la medida. La única fuente de incertidumbre cuantificable en la determinación del volumen es la producida por la escala de medida acoplada al ocular del microscopio.

La evaluación de incertidumbres y la expresión final de los resultados se hace utilizando como referencia el documento ISO/TAG 4/WG [ISO92].

Como se ha dicho, el volumen de los MTS se calcula suponiendo simetría esférica. Si δ es el diámetro del esferoide, que se determina mediante una escala cuya división más pequeña corresponde a $10 \mu\text{m}$, la incertidumbre que puede cuantificarse en la medida del volumen es de tipo B⁵. Suponiendo una distribución uniforme para la incertidumbre del diámetro la desviación típica correspondiente es [ISO92]:

$$u(V) = \psi\pi\delta^2, \quad (2.18)$$

con $\psi = 5\sqrt{2/3} \mu\text{m}$.

Como ya hemos señalado, la variación en el tiempo del volumen de los esferoides sin irradiar se describe mediante el modelo de Gompertz dado por la ecuación (2.10). Por otra parte, el modelo de la ecuación (2.16) se utiliza para los datos correspondientes a los esferoides irradiados.

Los ajustes de los modelos a los datos experimentales se han hecho mediante el método de Levenberg-Marquardt [Pre95] que minimiza el valor de la función ji-cuadrado, χ^2 . Si tratamos de describir un conjunto de datos experimentales $\{(x_i, y_i), i = 1, 2, \dots, n\}$, con incertidumbres σ_i , usando un modelo que viene dado por $f(x; \alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_k)$ con k parámetros libres, tenemos:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{|y_i - f(x_i; \alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_k)|^2}{\sigma_i^2}. \quad (2.19)$$

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Esferoides de control

En la figura 2.13 se presentan las curvas de crecimiento gompertzianas para los 18 esferoides de control estudiados aquí. En la gráfica (A) se muestran las curvas antes de la

⁴Un esferoide irradiado puede fracasar en su recrecimiento, es decir, la radiación destruye un número tan elevado de sus componentes que el sistema no recupera su ritmo de crecimiento inicial o, sencillamente, deja de crecer. Todos aquellos que presenten este comportamiento se eliminan de la muestra.

⁵La evaluación de tipo A de la incertidumbre se basa en distribuciones de frecuencia, mientras que la evaluación de tipo B se basa en distribuciones a priori.

normalización y en la gráfica (B) después de normalizarlas a un volumen inicial común. Aunque las condiciones de cultivo hayan sido las mismas para todos los agregados celulares, se observa variabilidad en el crecimiento de los distintos esferoides de la muestra. Es importante notar que la normalización no elimina esa variabilidad, aunque la reduce: las distribuciones de A y A' pasan los test de normalidad, pero los coeficientes de variación para el parámetro en la muestra son 0.074 y 0.046 antes y después de la normalización respectivamente. Esto nos indica que la falta de normalización añade incertidumbre en el proceso para determinar el “crecimiento patrón” de los esferoides estudiados.

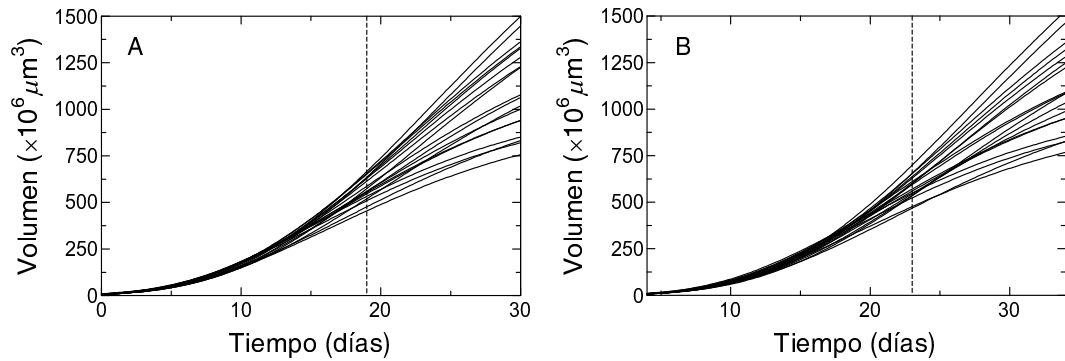


Figura 2.13: Curvas de crecimiento ajustadas al modelo de Gompertz para los 18 esferoides tomados como control en este trabajo. El tiempo de seguimiento desde la siembra es de 19 días. En (A) se muestran las curvas ajustadas directamente a los datos medidos, y la línea de puntos indica el tiempo máximo de seguimiento, mientras que en (B) se representan las curvas tras normalizarlas a un volumen inicial común $V_{IC} = 10^6 \mu\text{m}^3$. Nótese que el intervalo temporal de las dos gráficas es diferente, esto se hace para que puedan compararse visualmente las curvas normalizadas y sin normalizar en el mismo rango de tamaños de los esferoides. Por ello la línea de puntos que indica el final del seguimiento de los esferoides se ha desplazado 4 días, un intervalo de tiempo equivalente al de crecimiento entre V_{IC} y el volumen inicial medio antes de la normalización.

En la tabla 2.1 se indican los parámetros del modelo de crecimiento de los esferoides obtenidos de los ajustes mediante diversos procedimientos. En el método desarrollado en este trabajo consideramos los esferoides individualmente y normalizamos sus curvas de crecimiento a un volumen inicial común. También se han hecho ajustes considerando los esferoides individualmente pero sin normalizar. Por último, se hacen los ajustes de acuerdo con el método clásico, que considera la media de los volúmenes de una muestra de esferoides en cada instante y no hace normalización del volumen inicial. La última columna corresponde al valor del parámetro A tras la normalización a volumen inicial común en los métodos que no la han considerado previamente.

La normalización a un VIC es uno de los elementos más importantes del método desarrollado aquí, y por ello hemos comparado nuestros resultados con los que se obtienen mediante los procedimientos usuales. El análisis con nuestro método sin emplear normalización produce un valor de A muy similar al determinado ajustando los volúmenes medios de toda la muestra dados por la ecuación (2.9). Como vemos, la inclusión de la normalización en el procedimiento tiene un gran impacto sobre el valor de A , debido a

la consideración de volúmenes iniciales diferentes, pero ninguno sobre el de a . Si, finalmente, empleamos la ecuación (2.11) para obtener el valor de A' correspondiente a los procedimientos que no introducen la normalización, obtenemos resultados comparables al que proporciona el nuestro.

Tabla 2.1: Valores de los parámetros de interés para los esferoides de control obtenidos tanto del procedimiento desarrollado aquí, que considera individualmente cada esferoide, con y sin normalización a volumen inicial común; como del empleado usualmente, que utiliza la media de los volúmenes de un conjunto de ellos y no realiza normalización alguna. La última columna corresponde al valor del parámetro A tras la normalización a volumen inicial común en los métodos que no la consideran de partida. Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=1$.

	A	a [días ⁻¹]	A'
Este trabajo	7.41 ± 0.08	0.086 ± 0.002	—
Sin normalizar	5.37 ± 0.09	0.086 ± 0.002	7.38 ± 0.09
Volúmenes medios	5.31 ± 0.01	0.0864 ± 0.0001	7.40 ± 0.10

2.3.2. Crecimiento de esferoides irradiados

La primera pregunta que nos hacemos sobre los esferoides irradiados es si recuperan, algún tiempo después de la irradiación, el ritmo de crecimiento que poseían antes ésta. Para ello hemos tratado de realizar un ajuste en el que los parámetros A y a del modelo de Gompertz para los esferoides irradiados se fijasen a los obtenidos para los esferoides de control. Los resultados son inadecuados y producen valores de ji-cuadrado por grado de libertad, χ^2/m , que van desde 4.5 ± 0.5 para 1 Gy a 27 ± 1 para 5 Gy (la incertidumbre se refiere a un factor de cobertura $k=1$). Esto muestra la necesidad de reconsiderar la hipótesis de recuperación del ritmo de crecimiento después de la irradiación.

Tabla 2.2: Resultados del ajuste del modelo a los datos de crecimiento de los esferoides de acuerdo con el procedimiento explicado en el texto. Los valores de ji-cuadrado por grado de libertad, χ^2/m , corresponden a la media de los obtenidos para el conjunto de esferoides en cada caso. Las incertidumbres se refieren a un factor de cobertura $k=1$.

	Número de esferoides	A'	a [días ⁻¹]	s	χ^2/m
Control	18	7.41 ± 0.08	0.086 ± 0.002	—	1.3 ± 0.2
1 Gy	15	7.34 ± 0.04	0.086	0.78 ± 0.06	1.9 ± 0.4
2 Gy	28	7.21 ± 0.04	0.086	0.76 ± 0.03	1.2 ± 0.1
3 Gy	22	7.12 ± 0.06	0.086	0.62 ± 0.06	1.8 ± 0.2
4 Gy	20	6.88 ± 0.06	0.086	0.45 ± 0.04	2.0 ± 0.4
5 Gy	14	6.78 ± 0.07	0.086	0.34 ± 0.05	3.9 ± 0.5

Tras este intento fallido, hemos realizado los ajustes dejando A y a libres en la ecuación (2.16), lo que significa 4 parámetros libres frente a los 3 de la ecuación de Gompertz

(2.10) usada para los esferoides de control; pero esto complica sobremanera los ajustes sin producir, a cambio, un buen resultado. Por ello, hemos concluido que la forma más adecuada de proceder consiste en fijar el valor de $a = 0.086 \text{ días}^{-1}$, de manera que sea igual al obtenido para los esferoides de control (véase la tabla 2.1), mientras que el de A se ha dejado libre (nótese que a no cambia con la normalización). Ahora χ^2/m va desde 1.9 ± 0.4 para 1 Gy hasta 3.9 ± 0.5 para 5 Gy (véase la tabla 2.2); valores que son considerablemente mejores que los anteriores. En la figura 2.14 se muestran los volúmenes medidos en el laboratorio y los ajustes de la ecuación (2.16) para esferoides representativos de cada una de las dosis aplicadas empleando el procedimiento final descrito.

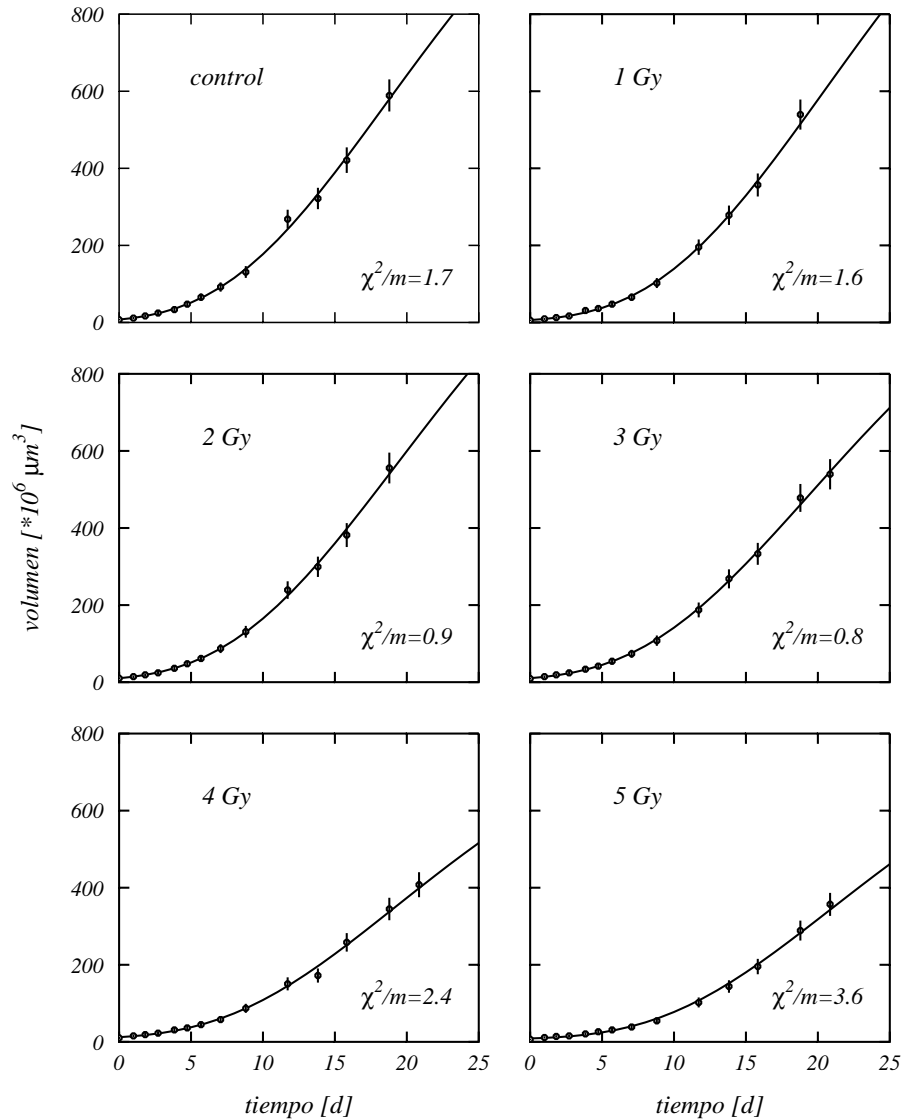


Figura 2.14: Ejemplos representativos del resultado de los ajustes de la ecuación (2.2) al crecimiento de un esferoide de control y de la ecuación (2.16) a cinco esferoides irradiados a diferentes dosis absorbidas. Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=2$. En cada gráfica se indica el valor de ji-cuadrado por grado de libertad, χ^2/m .

Para evaluar el modo en que la radiación afecta al crecimiento de los esferoides se ha estudiado cómo varía el valor de A con la dosis absorbida. El resultado puede verse en la

figura 2.15a, que muestra una dependencia lineal cuyos parámetros se consignan en la tabla 2.3. Puede concluirse así que la forma de crecimiento de los esferoides se ve perturbada por la radiación y no se recupera completamente, al menos tras un período de observación de tres semanas.

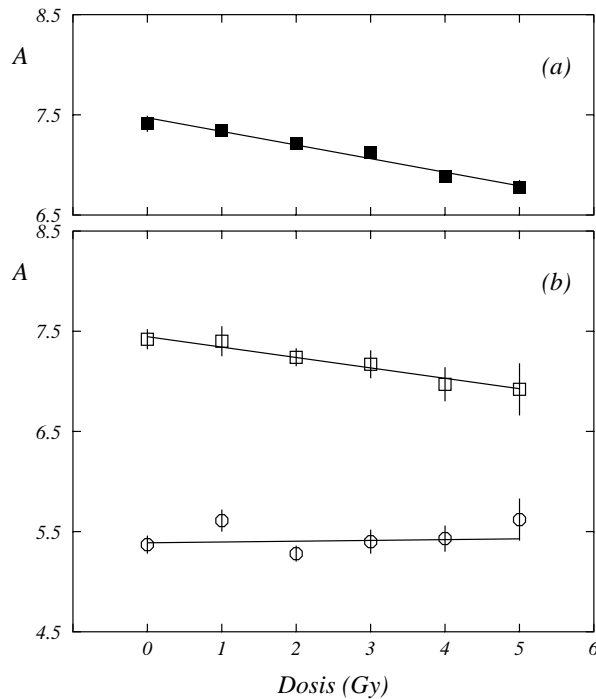


Figura 2.15: Variación del parámetro A con la dosis absorbida. (a) Ajuste lineal a los datos resultantes del método desarrollado en este trabajo. (b) Ajustes lineales a los resultados obtenidos de un análisis que emplea los volúmenes medios del conjunto de esferoides sin normalización (\circ), y ajustes a esos mismos resultados tras normalizarlos (\square). Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=1$.

Tabla 2.3: Resultados de la regresión lineal $A(d) = vd + w$ con o sin normalización a volumen inicial común. También se muestra el coeficiente de correlación r . Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=1$.

	v [Gy^{-1}]	w	r
Este trabajo	-0.14 ± 0.01	7.51 ± 0.05	-0.982
Sin normalizar	0.02 ± 0.02	5.38 ± 0.06	0.359
Volúmenes medios	-0.09 ± 0.03	7.45 ± 0.08	-0.971

Como en el caso de los esferoides de control, examinaremos también la influencia de la normalización en los resultados del análisis de recrecimiento. Con este propósito se han seguido, en primer lugar, los valores medios del volumen de un conjunto de esferoides para cada valor de la dosis absorbida, sin realizar una normalización a un VIC. El resultado se representa mediante círculos en la figura 2.15b, y nos muestra, además de unas incer-

incertidumbres considerablemente mayores, un valor de A independiente de la dosis absorbida (véase la tabla 2.3). Esto es una consecuencia de la mezcla de esferoides en diferentes fases de crecimiento, inherente a esta forma de proceder. Sin embargo, si ahora realizamos la normalización empleando los valores obtenidos para el volumen inicial, alcanzamos el resultado que se representa mediante cuadrados en la figura 2.15b. Como sucedía para los esferoides de control, recuperamos la información que se obtiene de nuestro procedimiento, aunque las incertidumbres son ahora mayores y hacen menos evidente la variación de A con la dosis absorbida.

2.3.3. Fracción de supervivencia

La figura 2.16 muestra los valores de la fracción de supervivencia obtenidos en nuestro ensayo de recrecimiento empleando la ecuación (2.17). También el ajuste del modelo LQ (2.7), con un buen resultado excepto para la dosis de 1 Gy, lo que nos indica la necesidad de una investigación más detallada de la región de bajas dosis. A ella dedicaremos el próximo capítulo.

Los parámetros obtenidos en los ajustes del modelo LQ para el ensayo de recrecimiento se muestran en la tabla 2.4, en la que se comparan los que arroja nuestro procedimiento con los que aportan otros autores para la misma línea celular MCF-7 en monocapa [Nun95], y con los resultados previos de nuestro grupo en esferoides [Vil95b]; en ambos casos mediante ensayo clonogénico (EC). También se muestran los valores de la fracción de supervivencia a 2 Gy, $s(2\text{ Gy})$, para todos los métodos.

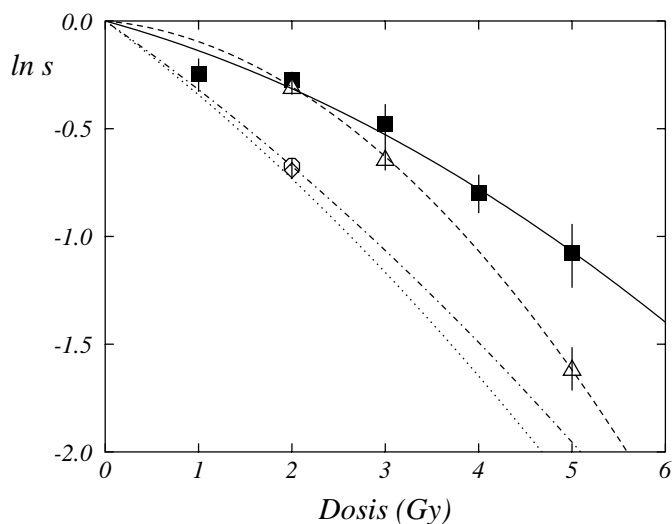


Figura 2.16: Logaritmo de la fracción de supervivencia en función de la dosis absorbida para los resultados de este trabajo (■) y ajuste correspondiente del modelo LQ (línea continua). Se incluyen también los resultados de otros estudios. Del trabajo de Villalobos et al. [Vil95b] se muestran sus ajustes al modelo LQ (línea de puntos y rayas), el valor obtenido para la fracción de supervivencia a 2 Gy (○) y un reanálisis de los datos originales (△ y línea de trazos). Del trabajo de Núñez et al. [Nun95] se muestran sus ajustes al modelo LQ (línea de puntos) y el valor de la fracción de supervivencia a 2 Gy (◇). Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=1$.

Tabla 2.4: Comparación de los parámetros α , β y fracción de supervivencia a 2 Gy, $s(2 \text{ Gy})$, obtenidos con nuestro método de análisis para los MTS de las células MCF-7, y los obtenidos mediante ensayo clonogénico (EC) para esta misma línea celular. Los valores obtenidos para el ensayo de retraso en el crecimiento (GD) para 5 y 8 veces el volumen inicial también se incluyen en la tabla. Las incertidumbres se refieren a un factor de cobertura $k=1$.

	$\alpha[\text{Gy}^{-1}]$	$\beta[\text{Gy}^{-2}]$	$s(2 \text{ Gy})[\%]$
EC en monocapa [Nun95]	0.32 ± 0.02	0.023 ± 0.006	50 ± 2
EC para MTS [Vil95b]	0.30 ± 0.10	0.018 ± 0.005	51
EC para MTS nuevo análisis	0.04 ± 0.03	0.057 ± 0.009	74 ± 3
Recrecimiento de MTS (este trabajo)	0.12 ± 0.03	0.019 ± 0.008	76 ± 3
GD $5\times$	0.11 ± 0.02	0.027 ± 0.004	71 ± 7
GD $8\times$	0.13 ± 0.01	0.033 ± 0.004	67 ± 9

Los resultados obtenidos para los dos ensayos clonogénicos (en monocapa y para esferoides) son muy semejantes entre sí y bastante diferentes de los que produce el nuevo método. La diferencia entre nuestros resultados y los que se obtienen de los datos de Villalobos et al. [Vil95b] suponen una sorpresa, dado que se realizan sobre el mismo sistema experimental. Por ello, hemos hecho un nuevo análisis de estos datos para dosis de hasta 5 Gy; los resultados de este nuevo análisis también se muestran en la tabla 2.4, y resultan más próximos a los que se obtienen con nuestro procedimiento, en particular los valores de $s(2 \text{ Gy})$ coinciden, aunque siguen existiendo discrepancias importantes para dosis más altas de 3 Gy (véase la figura 2.16), lo que se manifiesta en las considerables diferencias de los valores de los parámetros α y β del modelo LQ. En cualquier caso, puede concluirse que las células organizadas como MTS son más resistentes a la radiación que cuando forman cultivos en monocapa; hecho que ya ha sido mostrado por otros autores [Oli94].

Aunque en el método que hemos propuesto en este trabajo no es preciso estudiar el tiempo de retraso, hemos realizado un análisis de los datos de crecimiento para los valores medios del volumen, ecuación (2.9), empleando las dos definiciones posibles de GD a las que ya hemos aludido antes. En la figura 2.17 se muestran los ajustes del modelo de Gompertz a estos volúmenes medios para los esferoides de control e irradiados; como podemos apreciar, las incertidumbres, que ahora corresponden a un factor de cobertura $k=1$, son mucho mayores que las representadas en la figura 2.14 para $k=2$. Esto se debe a que el cálculo de los volúmenes como media de un conjunto produce una mezcla estadística de formas y estadios de crecimientos diferentes y, por tanto, una mayor desviación típica.

Una vez obtenidas las curvas de crecimiento para cada dosis puede calcularse el tiempo de retraso. La fracción de supervivencia correspondiente a un cierto GD se calcula mediante una modificación de la ecuación propuesta por Rofstad et al. [Rof86] para un modelo de crecimiento exponencial. Si se considera la definición de tiempo de retraso para N_V veces el volumen inicial tenemos:

$$\begin{aligned}
 \ln s &= \frac{A}{a} \exp(-at) [\exp(-at_R) - 1] \\
 &= \left(\frac{A}{a} - \ln N_V \right) \exp(-at) [\exp(-at_R) - 1], \quad (2.20)
 \end{aligned}$$

donde t_R es el GD.

En la tabla 2.4 se muestran también los resultados del ajuste del modelo LQ a estos valores de supervivencia obtenidos con el método GD para dos de sus posibles definiciones, que manifiestan diferencias entre sí que no son muy importantes, y diferencias con los resultados de nuestro modelo que son significativas para dosis altas (debido al valor de β). No obstante, en todos los casos, el ensayo de recrecimiento produce valores muy semejantes para bajas dosis, sea cual sea el método empleado para el análisis.

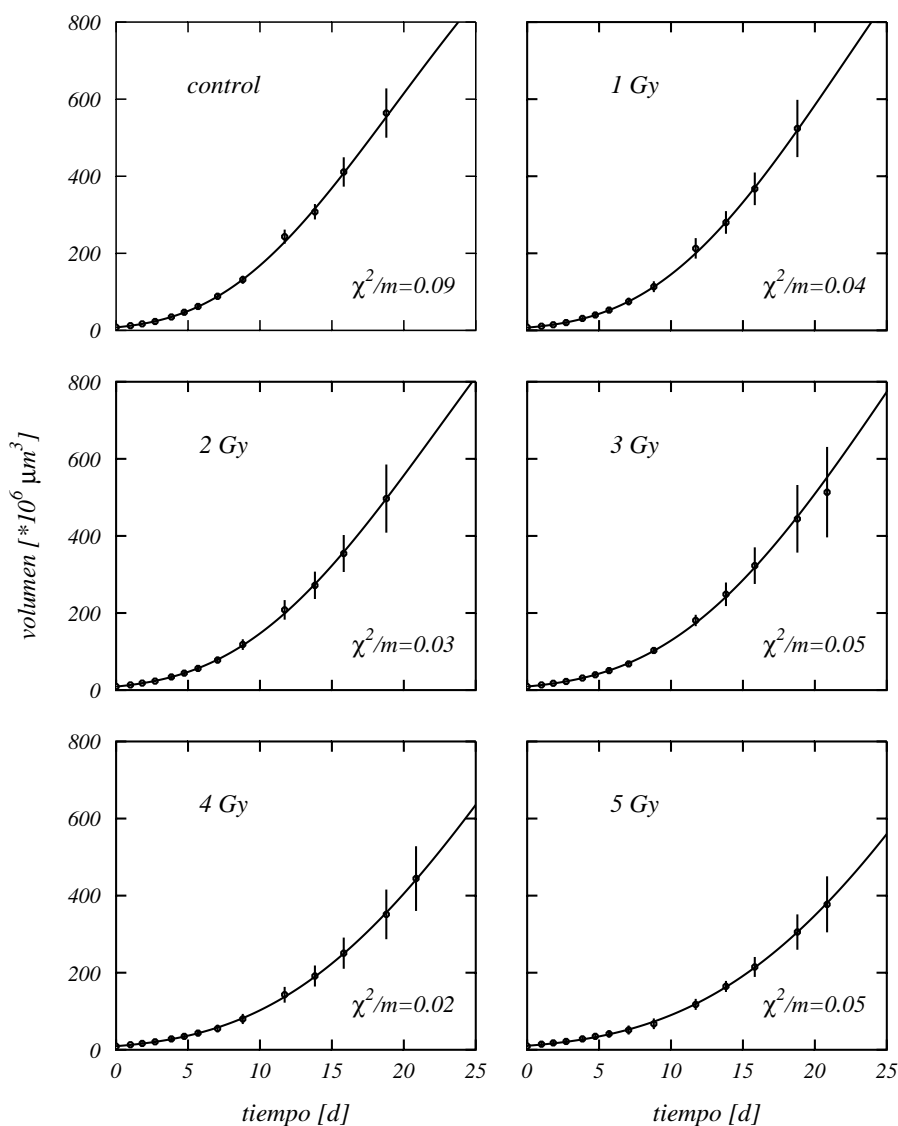


Figura 2.17: Ajustes de las ecuaciones (2.2) y (2.16) para la media de volúmenes de los esferoides de control y de los esferoides irradiados a diferentes dosis. Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=1$. En cada gráfica se indica el valor de ji-cuadrado por grado de libertad, χ^2/m .

2.4. Recapitulación

El modelo de Gompertz es adecuado para describir las curvas individuales de crecimiento de los esferoides multicelulares de la línea MCF-7 de cáncer de mama. Existe una importante variabilidad en el crecimiento de un conjunto de esferoides, aunque éstos se hayan cultivado en idénticas condiciones y se introduzca una normalización que permita observar la evolución de todos ellos desde un mismo volumen inicial.

Suponiendo que, tras la irradiación, las células que conforman un tumor pueden dividirse en dos grupos: supervivientes y esterilizadas, es posible emplear el modelo de Gompertz de crecimiento para calcular la fracción de supervivencia sin perturbar el sistema experimental; mediante la simple observación de la evolución del volumen del agregado con el tiempo.

La radiación afecta al crecimiento de los esferoides multicelulares y, por tanto, no es válida la suposición común de que el ritmo de crecimiento de estos agregados se recupera un tiempo después de la irradiación; al menos durante varias semanas, un período semejante al de la duración de los programas de radioterapia fraccionada. La demostración de esta característica no es posible sin un adecuado tratamiento matemático de los datos de crecimiento de los MTS, que incluye el seguimiento de los esferoides individualmente y la normalización a un volumen inicial común.

Las supervivencias celulares determinadas para los MTS mediante el ensayo de recrecimiento aquí propuesto y el ensayo clonogénico (que supone la disgregación de los esferoides) son semejantes, al menos para dosis por debajo de unos 3 Gy; del orden de las empleadas en los esquemas de radioterapia fraccionada usuales. También son semejantes, por debajo de esa dosis de 3 Gy, las supervivencias determinadas para el ensayo de recrecimiento por varios métodos: el que aquí proponemos y el que emplea el tiempo de retraso. No obstante, nuestro método evita las inconsistencias en la definición del tiempo de retraso y, por tanto, reduce la incertidumbre inherente a la determinación de la supervivencia celular.

La supervivencia para MTS irradiados con una dosis absorbida de 1 Gy es menor que la predicha por el modelo LQ y, habida cuenta de la limitada incertidumbre del método para determinarla, es interesante estudiar la respuesta de los esferoides multicelulares en esta región de dosis; lo haremos en el capítulo 3. La fracción de supervivencia obtenida para las células cuando forman parte de un esferoide resulta mayor que cuando se cultivan en monocapa, lo que nos indica una importante influencia de la estructura tridimensional y de los contactos celulares en la respuesta de los tumores a la radiación.

El crecimiento de los esferoides multicelulares se sigue durante unas pocas semanas y, por tanto, los volúmenes medidos están muy lejos del volumen máximo que predice el ajuste del modelo de Gompertz a los datos obtenidos de ese seguimiento. Debe tenerse en cuenta que ese volumen máximo puede ser un artefacto al que hay que prestar atención.

La consideración de los esferoides individualmente cuando estudiamos la evolución de su tamaño con el tiempo, y el hecho de no mezclar estadios de crecimiento correspondientes a etapas distintas en la evolución de los MTS, nos permiten descubrir la variabilidad que existe entre sus formas de crecimiento, y que podamos así determinar con mayor precisión la supervivencia celular tras irradiarlos. El propósito de elaborar un método para determinar la supervivencia a partir de un ensayo de recrecimiento nos ha conducido hasta una

nueva pista que nos marca, una vez más, el camino de la individuación y la consideración de la variabilidad como un hecho fundamental en radiobiología.

Con las herramientas desarrolladas en este capítulo, y el indicio de que hay fenómenos que merece la pena estudiar en la región de dosis inferiores a 1 Gy, estamos listos para desarrollar los siguientes capítulos.

Capítulo 3

Hipersensibilidad a bajas dosis

La hipersensibilidad a baja dosis de radiación (*low dose hyper-radiosensitivity*, LDHRS) es un problema interesante de la radiobiología actual que no ha sido resuelto completamente [Joi01]. Se trata de un fenómeno que se manifiesta para dosis absorbidas menores de 1 Gy, y que consiste en las diferencias entre las predicciones del modelo lineal-cuadrático y los valores experimentales obtenidos en el laboratorio para la supervivencia de un buen número de líneas celulares. La hipótesis más plausible para explicar la LDHRS es la inducción de mecanismos de reparación del ADN que actúan sólo si la dosis supera un determinado umbral y que, por tanto, no operan en el rango más bajo de dosis para las que se obtienen datos de supervivencia celular.

Para la descripción de los datos de supervivencia, cuando se da el fenómeno de hipersensibilidad, se ha empleado hasta ahora un modelo matemático que no es consistente con una activación brusca del mecanismo de reparación. En este capítulo desarrollamos un modelo que, siendo fiel a la idea biológica original, explica la forma final de la curva de supervivencia a partir de la variabilidad en la respuesta de las células del cultivo: dependiendo de la fase del ciclo por la que esté pasando la célula, de sus condiciones de oxigenación y otras, el mecanismo de reparación se activará a una cierta dosis. Así, existe una distribución de probabilidad para la dosis crítica a la que se produce el disparo del mecanismo de reparación para una cierta población celular en determinadas condiciones de cultivo.

En este capítulo, tras elaborar ese nuevo modelo para explicar la LDHRS, lo emplearemos en la descripción de los datos publicados por otros autores y lo compararemos con los modelos empleados hasta ahora; por último, utilizando los métodos expuestos en el capítulo precedente, estudiaremos el fenómeno de la LDHRS en los esferoides multicelulares de la línea MCF-7 de cáncer de mama.

El contenido de este capítulo ha sido publicado en buena parte en [Gui12].

3.1. Antecedentes

En los últimos veinte años se ha acumulado una importante colección de datos experimentales que muestran, para muchas líneas celulares, una mayor sensibilidad de la que predice el modelo lineal-cuadrático de supervivencia para dosis por debajo de 0.5 Gy. Este fenómeno, llamado *hipersensibilidad a baja dosis* (LDHRS), está asociado a un aumento relativo de la resistencia a la radiación (incremento de la radiorresistencia, IRR) de las células para dosis entre 0.5 y 1 Gy.

El fenómeno LDHRS/IRR fue descrito por primera vez por Marples y Joiner en un trabajo en el que estudiaron la respuesta a la radiación de la línea celular V79 de fibroblastos de hámster [Mar93], aunque ya había sido observado años antes en experiencias con animales y plantas [Joi88, Joi01]. Después se ha manifestado en muchas líneas celulares de tumores y de tejidos normales [Joi01] y en tumores metastásicos en humanos [Har04a], y se ha investigado su posible aplicación clínica para la irradiación de tumores radiorresistentes mediante esquemas “ultrafraccionados” [Smi99, Sho01, Har04a]. También se ha calculado la influencia que puede tener el fenómeno sobre la respuesta del tejido sano en regímenes fraccionados [Hon06], cuestión importante por cuanto el uso de la radioterapia con intensidad modulada (IMRT) supone la irradiación de volúmenes grandes de tejido sano con dosis por fracción pequeñas. No obstante, parece difícil detectar el fenómeno en situaciones clínicas y los datos que poseemos no son concluyentes [Ham96, Dub97, Har04b].

Aunque no hay una explicación que pueda considerarse definitiva para el fenómeno de hipersensibilidad a baja dosis, la hipótesis más plausible es que se produce por la inducción de mecanismos de reparación del ADN que sólo actúan (o se “disparan”) cuando se alcanza una determinada dosis umbral [Wou96, Joi01]. Otras explicaciones alternativas para el fenómeno, como la existencia de subpoblaciones sensibles, o de grupos celulares en diferentes fases del ciclo, parecen descartadas [Mar93, Joi01]. Es importante señalar a este respecto que la LDHRS no se ha observado para radiaciones de alta LET (como los neutrones) [Lam93, Mar93], lo que indica que la reparación tiene un papel determinante en su aparición. También se ha sugerido que la inducción de la reparación es consecuencia de que la detención en la fase G₂ del ciclo celular, que permite a la célula reparar las lesiones radioinducidas antes de dividirse, sólo se produce para una determinada dosis umbral [Mar04]. Esto relacionaría el fenómeno de la hipersensibilidad con el llamado “efecto inverso de la tasa de dosis” [Bed73, Ste02].

Puesto que la manifestación de este fenómeno exige conocer valores de la supervivencia celular para dosis absorbidas relativamente pequeñas, es necesario que, tanto la administración de las dosis como la determinación de la supervivencia, sean suficientemente precisas. En ambos casos han de analizarse los métodos empleados y sus incertidumbres. Tratamos a continuación estos asuntos con más detalle.

Si bien, como se ha dicho, la precisión dosimétrica debe ser alta y, por tanto, ha de valorarse específicamente la incertidumbre asociada a la dosis absorbida, en ninguna de las publicaciones sobre LDHRS a las que hemos tenido acceso se analiza este aspecto; tampoco se dan detalles sobre la forma en que se hace la irradiación en lo que se refiere a la configuración de la fuente y de las muestras. Para estudiar la LDHRS en el caso de radiaciones de baja LET se han empleado fuentes de rayos X de 240 ó 250 kVp [Mar93, Ska96, Wou96], de ⁶⁰Co [Cha02] y de ¹³⁷Cs [Smi99], y cabe esperar que la geometría de

la irradiación y el diseño del propio equipo generador sean importantes a este respecto. Así mismo, en algunos trabajos se indica la necesidad de que el tiempo de irradiación sea suficientemente largo, de manera que se eviten las incertidumbres producidas por la inestabilidad de los equipos de rayos X al comienzo de cada irradiación, o que exista influencia de la tasa de dosis sobre la sensibilidad [Lam93, Mar93], pero no en otros [Ska96].

De lo dicho puede concluirse que, aun si el efecto final de la incertidumbre de las dosis absorbidas fuese poco importante, y los trabajos señalados no estuviesen afectados por esta causa, parece pertinente estudiarlo de manera detallada.

Puesto que se requiere un método para analizar la supervivencia que sea preciso y fiable, la manera en que se determinan las colonias formadas a partir de las células supervivientes en los ensayos clonogénicos se ha desarrollado mucho para alcanzar niveles de precisión mayores que los del procedimiento tradicional, que hemos descrito en el capítulo anterior. Este es el caso del método DMIPS (*dynamic microscopic image processing scanner*) utilizado por Joiner, Marples y sus colaboradores en la serie de trabajos más importante sobre la hipersensibilidad a baja dosis de que disponemos [Mar93]¹. No obstante, Chandna y sus colaboradores [Cha02] muestran que el fenómeno de la LDHRS puede manifestarse sin el uso de métodos sofisticados como el DMIPS, mediante el ensayo clonogénico tradicional, y que la exposición de las células a los pulsos de luz láser que implica el DMIPS puede perturbar el sistema experimental.

Si, como Chandna et al. [Cha02] han mostrado mediante estudios en monocapa, el contacto celular y el ambiente en el que se desarrollan las células es importante para la manifestación del fenómeno de hipersensibilidad, los esferoides multicelulares pueden proporcionar datos interesantes a este respecto. Como hemos visto en el capítulo anterior, disponemos de un método que permite determinar la radiosensibilidad de los MTS de manera suficientemente precisa y con una perturbación mínima de las muestras experimentales. Estas condiciones, como se ha discutido antes, son las adecuadas para que el escenario experimental permita mostrar, si existe para la población celular estudiada, el fenómeno de la LDHRS.

En este capítulo investigamos el fenómeno de la hipersensibilidad a baja dosis en los esferoides multicelulares de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, valiéndonos de los métodos desarrollados en el capítulo anterior para determinar la supervivencia con una mínima perturbación del sistema. También cuidamos los aspectos dosimétricos de la irradiación y consideramos particularmente las incertidumbres de la dosis absorbida. Además desarrollamos un nuevo modelo para el análisis de los datos de supervivencia proporcionados por los experimentos en el caso de que exista LDHRS. En este modelo se consideran tanto la idea original de que la inducción de los mecanismos de reparación se produce bruscamente a partir de una determinada dosis umbral, como la existencia de una variación de esta dosis umbral para las diferentes células de la población. Ninguna de estas características es tenida en cuenta por el llamado modelo de inducción de la reparación (*induced repair model*) [Joi88], en el que, de un modo heurístico, se introduce la variación en la estrategia de reparación celular mediante una función que varía suavemente.

¹El analizador DMIPS permite contar de manera automática el número de colonias formadas en un cultivo. Justo después de la irradiación el sistema localiza y memoriza las posiciones de las células y, tras el tiempo de cultivo establecido, la operación vuelve a realizarse para determinar las células supervivientes que han formado colonias.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Cultivo celular

Aunque las características del cultivo celular que utilizamos para estudiar la hipersensibilidad son semejantes a las descritas en el capítulo anterior, las volvemos a presentar aquí para facilitar la continuidad en la lectura de este capítulo.

Hemos empleado células de la línea humana MCF-7, clon BB, de cáncer de mama [Vil95a]. Estas células se mantienen en medio esencial mínimo complementado con un 10 % de suero fetal bovino. Los cultivos en monocapa se mantienen a 37°C en atmósfera húmeda con un 95 % de aire y un 5 % de CO₂. Las células utilizadas para generar los esferoides se obtienen separando con tripsina las células adheridas en monocapa a las cajas de este cultivo que acabamos de describir.

Los esferoides se generan sembrando entre 1000 y 1500 células en cada uno de los 48 pocillos de las 12 cajas de cultivo que empleamos en el estudio. Cada uno de los pocillos ha sido tratado previamente con una delgada capa formada por agar al 1 % (Bacto agar, Difco, Detroit, EEUU), de manera que se evite la adhesión de las células al sustrato plástico. Las 12 cajas se agitan durante 18-20 horas. De este modo se produce en cada pocillo un esferoide de unos 100 μm de diámetro. Una vez que los MTS se han formado, el medio se cambia cada tres días a lo largo del experimento. Esta operación, junto con el traslado de las cajas de cultivo a la unidad de irradiación y al microscopio, son las únicas manipulaciones que sufren las muestras experimentales.

3.2.2. Irradiación y dosimetría

Se ha utilizado el haz de irradiación de una unidad de teleterapia de ⁶⁰Co (Theratron 780, Canadá) que produce una tasa de dosis absorbida en el isocentro, a la profundidad del máximo de dosis, de 0.021 cGy/s para un campo de 10 cm × 10 cm. La división más pequeña del sistema temporizador es de 0.6 s y el tiempo de entrada-salida de la fuente, que coincide con este valor, se tiene en cuenta en los cálculos del tiempo de irradiación. Para poder administrar a los esferoides dosis absorbidas tan pequeñas como 0.1 Gy con una incertidumbre aceptable, es preciso aumentar el tiempo de irradiación y emplear una geometría que nos asegure la irradiación homogénea de las muestras. Para ello las cajas de cultivo se disponen en el seno de un maniquí de láminas de agua sólida (RW3 de PTW, Friburgo), a 20 cm de profundidad y, sobre ellas, se colocan 6 cm más de material (figura 3.1). La distancia desde la fuente hasta la superficie del maniquí es de 80 cm. De este modo el tiempo necesario para administrar 0.1 Gy a las muestras es de 12 s.

Aunque se ha hecho una estimación inicial de las dosis absorbidas mediante el cálculo para realizar una adecuada planificación del experimento, también se ha hecho una medida de la dosis absorbida mediante dosímetros TLD en similares condiciones a las de la irradiación de los esferoides. Los cristales TLD se han situado dentro de los pocillos de cultivo en una posición igual a la que ocupan los esferoides en la cajas durante la irradiación, y rodeados de material equivalente a agua para simular el medio de cultivo. Se han empleado cristales TLD de la marca TLD Poland del tipo MCP-100 (sistema de lectura de la marca LAB modelo RA'94, con horno de borrado de la marca PTW), calibrados para la energía del Co-60. De este modo se tienen en cuenta las condiciones geométricas de la irradiación y el efecto producido por las interfases creadas por las cajas de cultivo.

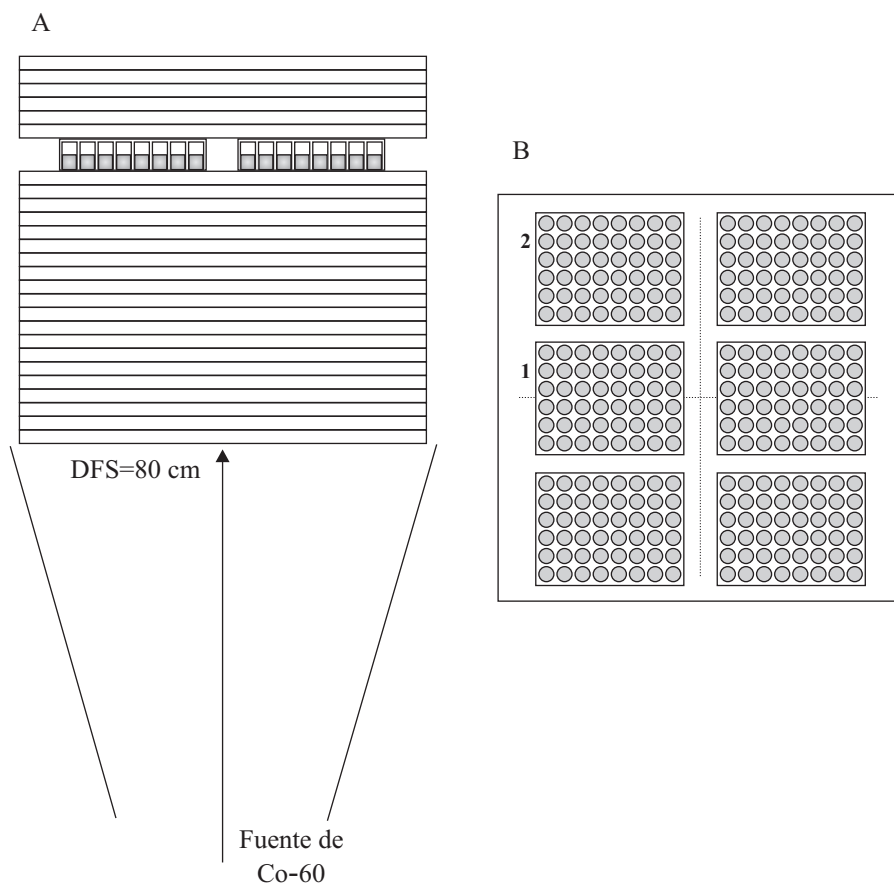


Figura 3.1: Situación de las muestras experimentales para la irradiación en una unidad Theratron 780. (A) Las cajas de cultivo de los esferoides se sitúan a una profundidad de 20 cm en el seno de un maniquí de láminas de RW3 (PTW) de 30 cm×30 cm×1 cm. (B) Para reproducir las condiciones dosimétricas de la irradiación, teniendo en cuenta la simetría de los haces empleados, pueden considerarse dos posiciones posibles para las cajas de cultivo, que etiquetamos con 1 y 2 en la figura.

3.2.3. Selección y seguimiento de los esferoides

En el momento de la irradiación los MTS presentaban diámetros inferiores a 300 μm . Esto permite asegurar que su composición es homogénea, que no se ha formado un núcleo necrótico en su seno y que el acceso al oxígeno y a los nutrientes es semejante para todas las células que forman el agregado. De este modo cabe esperar una respuesta más homogénea de las células a la radiación [Ole92]. Además, en estas condiciones se cumple la relación proporcional entre el volumen del esferoide y el número de células que lo integran; de manera que puede aplicarse el método desarrollado en el capítulo 2 para obtener la fracción de supervivencia a partir de la curva de crecimiento de los esferoides tras la irradiación.

Como ya se hizo antes, en este estudio sólo consideramos los esferoides que tienen una forma aproximadamente esférica, de tal modo que la medida de dos diámetros perpendiculares arroje un valor muy parecido. Todos los esferoides con una marcada asimetría en los primeros estadios de crecimiento fueron desechados; también lo fueron todos aquéllos que mostraron algún problema en el crecimiento, como la fusión de dos o más agregados

contenidos en el pocillo de cultivo o la inclusión de alguna fibra de agar en su interior, y en el caso en que se produjo la contaminación del pocillo. Unos pocos esferoides fallaron en su crecimiento tras la irradiación, y también se excluyeron del estudio.

Las muestras se observaron durante 18 días, al final de los cuales los MTS válidos para el análisis (y las dosis absorbidas correspondientes) fueron: 13 (0.08 Gy), 5 (0.15 Gy), 20 (0.23 Gy), 14 (0.31 Gy), 13 (0.48 Gy), 18 (0.65 Gy), 15 (0.80 Gy), 9 (1.15 Gy), 21 (1.54 Gy), 20 (2.42 Gy) y 14 (3.23 Gy). Un total de 22 esferoides se utilizaron como control y no fueron irradiados, aunque sí sometidos a la misma manipulación que el resto.

3.2.4. Modelos de supervivencia

Para cada esferoide, considerado individualmente, se realiza una medida de su diámetro cada 2 ó 3 días mediante un microscopio invertido de contraste de fases al que se ha acoplado una escala de medida en el ocular; el volumen se calcula suponiendo que el agregado tiene forma esférica. Para describir la evolución del volumen con el tiempo en el caso de los esferoides de control, que no han sido irradiados, empleamos el modelo de crecimiento de Gompertz descrito por la ecuación (2.10). La fracción de supervivencia para los esferoides irradiados se calcula a partir de las ecuaciones (2.16) y (2.17). Los pormenores de estos métodos se han presentado en el capítulo 2.

Para el análisis de la supervivencia celular en el caso de hipersensibilidad a baja dosis es común partir de la ecuación lineal cuadrática (2.7). Si aceptamos la hipótesis de la inducción de radorresistencia como la explicación para el efecto de LDHRS, podemos suponer, partiendo del modelo LQ, que el parámetro α varía con la dosis absorbida del siguiente modo [Joi88]:

$$\alpha(d, d_c) = \alpha_r + (\alpha_s - \alpha_r) \exp\left(-\frac{d}{d_c}\right). \quad (3.1)$$

Como vemos, α se reduce desde α_s (las células son más sensibles) hasta α_r (las células son más resistentes) cuando la dosis varía desde 0 hasta $d \gg d_c$. A d_c se la ha llamado *dosis crítica para la estimulación de la reparación*. Así, la ecuación LQ modificada es:

$$s = \exp\left\{-\left[\alpha_r + (\alpha_s - \alpha_r) \exp\left(-\frac{d}{d_c}\right)\right]d - \beta d^2\right\}. \quad (3.2)$$

Esta modificación del modelo LQ ha sido llamada *modelo de reparación inducida* (*induced-repair*, IR).

La ecuación (3.2) se ha convertido en el modelo habitual para ajustar los datos en los experimentos de LDHRS o realizar cálculos en los que se tenga en cuenta el efecto [Mar93, Smi99, Hon06]. La condición $\alpha_s/\alpha_r > 1$ es una prueba de la existencia del fenómeno para una determinada población celular [Joi01]. No obstante, esta aproximación heurística a la descripción de la LDHRS no es fiel a la idea original de la reparación inducida, que supone la existencia de una dosis a partir de la cual aumenta drásticamente la capacidad de reparación de la célula, hecho que ha sido incorporado ya en otros modelos [Leo07], en lugar de una variación gradual del valor de α como considera el modelo IR .

Aquí proponemos un nuevo modelo en el cual, como hace Leonard [Leo07], se incluye una función escalón, pero no tenemos en cuenta (él sí lo hace) el efecto de la tasa de dosis absorbida. La componente fundamental de este nuevo modelo es que existe variabilidad en los parámetros que lo describen para las diferentes células que componen la muestra. Para una célula concreta tenemos:

$$s(d, d_c) = [1 - H(d - d_c)]s_1(d) + H(d - d_c)s_{1q}(d), \quad (3.3)$$

donde $H(d)$ es la función de Heaviside, cuyo valor es 0 para $d < 0$ y 1 en cualquier otro caso. En general, pueden elegirse diferentes formas para las funciones de supervivencia s_1 y s_{1q} ; en nuestro caso consideramos las siguientes:

$$s_1(d) = \exp(-\alpha_s d), \quad (3.4)$$

y

$$s_{1q}(d) = \exp(-\alpha_r d - \beta d^2). \quad (3.5)$$

Por debajo de la dosis absorbida d_c , el logaritmo de la supervivencia es una función lineal (hipótesis plausible por cuanto la influencia del término cuadrático del modelo LQ es despreciable para dosis muy pequeñas); y, por encima de la dosis umbral para la que se produce la inducción de la reparación, porque la célula activa mecanismos que antes no tenía, la supervivencia es una función lineal-cuadrática con un nuevo valor del coeficiente lineal. La dosis crítica d_c juega aquí el papel de una dosis umbral. Esto puede verse en la parte izquierda de la figura 3.2 donde se ha dibujado, con una línea de trazos, la fracción de supervivencia s dada por la ecuación (3.3) en función de la dosis d para $d_c = 0.58$ Gy, $\alpha_s = 1.19$ Gy⁻¹, $\alpha_r = 0.15$ Gy⁻¹ y $\beta = 0.07$ Gy⁻². Estos valores se han obtenido de Singh y sus colaboradores [Sin94] y corresponden al ajuste del modelo IR a los datos experimentales de la línea humana L132 de células epiteliales de pulmón.

Esta función (3.3), con un salto brusco a una dosis $d = d_c$, no describe adecuadamente los datos experimentales del fenómeno LDHRS. La ecuación (3.3) es admisible para una célula en particular, pero no para una población numerosa, en la que cabe esperar que existan diferencias en las respuestas de las distintas células que la componen. Si la hipersensibilidad es un proceso dinámico que obedece a los cambios en el daño del ADN y a la funcionalidad del proceso de reparación [Mar08], tras la inducción del daño existe un conjunto importante de proteínas involucradas en los procesos de reparación y en el mecanismo que regula la parada en G₂. Podemos pensar así que la variación en la concentración de estas proteínas de unas células a otras, por diferencias entre estirpes celulares, por las condiciones del cultivo, acceso a los nutrientes, fase del ciclo celular, estado de oxigenación o, simplemente, por razones estadísticas, produce finalmente una variación en la dosis para la que cada célula determina su detención en G₂. Por ello, si la respuesta de una célula se describe mediante una determinada ecuación, las respuestas de diferentes células pueden traducirse en diferencias entre los parámetros del modelo. Así, para cada célula el valor de la dosis umbral para la que se produce la reparación inducida será diferente, como podrán serlo los demás parámetros del modelo.

Para reflejar el efecto de la variabilidad en la respuesta celular a la radiación, puede realizarse una simulación Monte Carlo en la que se tenga en cuenta este hecho a través de distribuciones de probabilidad adecuadas de los parámetros. En la parte izquierda de la figura 3.2 puede verse un ejemplo en el que se ha calculado la fracción de supervivencia

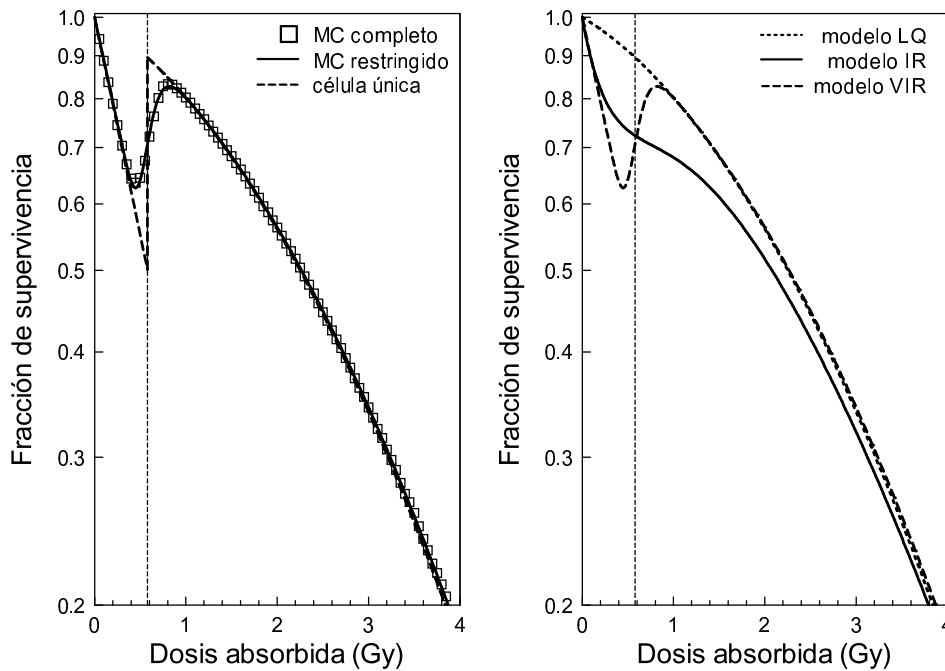


Figura 3.2: Comparación entre los modelos estudiados. Figura de la izquierda: fracción de supervivencia dada por la ecuación (3.3) (línea de trazos), cálculo Monte Carlo completo (cuadrados) y cálculo Monte Carlo restringido (línea continua). Figura de la derecha: el modelo VIR propuesto (línea de trazos) se compara con el modelo IR (línea continua) y el modelo LQ (línea de puntos). En ambas figuras la línea de puntos vertical indica la dosis crítica d_c para la estimulación de la reparación. Los valores medios, μ , empleados para el sorteo de los parámetros son los siguientes: $\bar{\alpha}_s = 1.19 \text{ Gy}^{-1}$, $\bar{\alpha}_r = 0.15 \text{ Gy}^{-1}$, $\bar{\beta} = 0.07 \text{ Gy}^{-2}$ y $\bar{d}_c = 0.58 \text{ Gy}$. Para las desviaciones típicas se ha tomado un valor $\sigma = 0.2\mu$ en todos los casos. Los valores medios se han tomado de los resultados obtenidos para la línea humana L132 de células epiteliales de pulmón [Sin94].

en función de la dosis absorbida de una población de 10^4 células como el valor medio del conjunto (cuadrados). Para cada una de estas células se han sorteado los parámetros del modelo (3.3) de acuerdo con distribuciones de probabilidad normales, $\mathcal{N}(\mu, \sigma)$, con las medias que se indican en ella y con desviaciones típicas $\sigma = 0.2\mu$ en todos los casos, de manera que exista una notable variabilidad entre las células.

Para entender el efecto de cada uno de los parámetros del modelo, se han realizado simulaciones Monte Carlo restringidas, esto es, semejantes a la descrita antes pero considerando solamente la distribución de la dosis umbral y fijando el resto de parámetros. Los valores promedio obtenidos de este modo se han dibujado también en la parte izquierda de la figura 3.2 con línea continua.

Como puede verse, los valores medios obtenidos de ambos cálculos presentan sólo pequeñas diferencias para altas dosis, donde la curva representada en línea continua se solapa con la curva a trazos obtenida para una célula única. Este cálculo preliminar muestra que la variabilidad en d_c es fundamental para describir la forma de la curva de supervivencia cuando se manifiesta el fenómeno LDHRS. Por tanto, consideramos la existencia de una distribución de probabilidad para d_c , mientras que para el resto de parámetros puede tomarse el valor medio de sus distribuciones respectivas.

De acuerdo con la ecuación (3.3), la supervivencia media de la población será:

$$\begin{aligned}\bar{s}(d) &= \int_0^\infty s(d, x)P(x)dx \\ &= s_1(d) + [s_{1q}(d) - s_1(d)] \int_0^\infty P(x)H(d-x)dx \\ &= s_1(d) + [s_{1q}(d) - s_1(d)] \int_0^d P(x)dx,\end{aligned}\tag{3.6}$$

donde $P(x)$ es la distribución de probabilidad para la dosis crítica a la que se produce la inducción de la reparación.

La ecuación anterior es la forma general del nuevo modelo que se propone aquí, y al que hemos llamado *modelo de inducción variable de la reparación (variable induced repair model, VIR)*. Ahora es preciso establecer la forma de la distribución de probabilidad $P(x)$. Para ello, nótese en primer lugar que no es posible una distribución normal para d_c , pues, en tal caso, serían posibles valores negativos para la dosis de estimulación. Adoptamos por ello una distribución lognormal que, de acuerdo con los argumentos expuestos en el capítulo 1, puede obtenerse a partir de un razonamiento biológico basado en la capacidad de reparación de las células y en el proceso en múltiples pasos que suponemos para esta reparación [Koc66]. También aquí, como en el capítulo 1, pueden elegirse otras distribuciones de probabilidad, como la de Weibull, con resultados semejantes.

De este modo tomamos [Joh94]:

$$P(d_c) = \frac{1}{d_c \sigma \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(\mu - \ln d_c)^2}{2\sigma^2} \right].\tag{3.7}$$

Llevando (3.7) a (3.6) tenemos:

$$\begin{aligned}\bar{s}(d) &= s_1(d) + [s_{1q}(d) - s_1(d)] \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \int_0^d \frac{1}{x} \exp \left[-\frac{(\mu - \ln x)^2}{2\sigma^2} \right] dx \\ &= s_1(d) + \frac{1}{2} [s_{1q}(d) - s_1(d)] \left[1 - \operatorname{Erf} \left(\frac{\mu - \ln d}{\sigma \sqrt{2}} \right) \right],\end{aligned}\tag{3.8}$$

donde Erf es la función error:

$$\operatorname{Erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x \exp(-t^2) dt.\tag{3.9}$$

Y la dosis media para la estimulación de la reparación puede escribirse como:

$$\bar{d}_c = \exp \left(\mu + \frac{\sigma^2}{2} \right).\tag{3.10}$$

En la parte derecha de la figura 3.2 se muestra una comparación de los tres modelos analizados. Las líneas de puntos, continua y de trazos muestran, respectivamente, las fracciones de supervivencia para los modelos LQ, IR y VIR, ajustados a los datos de la simulación Monte Carlo restringida mostrada en la parte izquierda. Para dosis absorbidas por encima de \bar{d}_c , cuando todas las células de la población han activado sus mecanismos de reparación, los modelos LQ y VIR coinciden. En torno a la dosis crítica más probable, las diferencias entre los modelos IR y VIR pueden ser importantes.

3.2.5. Métodos estadísticos e incertidumbres

Debido a la disposición de los cultivos para la irradiación y a la simetría del haz empleado, hay dos posibles posiciones para las cajas de cultivo (véase la figura 3.1). Para cada una de estas posiciones, y en condiciones semejantes a las de la irradiación de los esferoides, se han irradiado 20 dosímetros TLD distribuidos entre los 48 posibles alojamientos de la caja. Estos dosímetros, empleados con el resto de elementos del sistema dosimétrico (unidad de lectura y horno de borrado), habían sido caracterizados y calibrados individualmente en un haz de ^{60}Co . La incertidumbre de la dosis absorbida se estima a partir del conjunto de medidas obtenido mediante los dosímetros TLD para cada una de las disposiciones posibles, y su valor es del 5.5% (con un factor de cobertura $k=1$).

El procedimiento para obtener la fracción de supervivencia es el mismo que se ha descrito en el capítulo 2. Tras ajustar la ecuación (2.10) a los datos de crecimiento de los esferoides de control, se obtienen los valores de los parámetros A y a de estos esferoides que no han sido irradiados pero que han sufrido, por lo demás, idéntica manipulación a la del resto de muestras. La fracción de supervivencia se calcula ahora en dos pasos para cada esferoide individual: en primer lugar se ajustan los parámetros de la ecuación (2.16) a los datos de volumen obtenidos del seguimiento del esferoide, fijando el valor del parámetro a al obtenido para los esferoides de control, tal y como se describe en el capítulo 2; en segundo lugar, se utiliza la ecuación (2.17) para calcular la fracción de supervivencia de ese esferoide en particular. La incertidumbre para la fracción de supervivencia se toma como la desviación típica del conjunto de valores de la fracción de supervivencia calculados por este procedimiento para cada valor de la dosis absorbida.

Los ajustes de los diferentes modelos analizados en este trabajo, tanto para los datos de otros autores como a los obtenidos con los esferoides de la línea MCF-7, se han hecho mediante el método de Levenberg-Marquardt [Pre95] que minimiza el valor de la función ji-cuadrado, tal y como se ha descrito en el capítulo 2. Para comparar los diferentes modelos usamos el valor de ji-cuadrado por grado de libertad, χ^2/m , obtenido del procedimiento de ajuste para cada caso. El modelo con un valor más bajo de χ^2/m es el que con más verosimilitud describe los datos experimentales.

3.3. Resultados y discusión

En primer lugar, y con el propósito de analizar la capacidad que tiene el modelo VIR para describir los datos de supervivencia cuando se muestra el fenómeno LDHRS, se ha ajustado la ecuación (3.8) a dos conjuntos de datos experimentales ya publicados que corresponden a cultivos en monocapa. También, para determinar si el fenómeno se muestra en el caso de esferoides multicelulares, se ha ajustado a los datos del experimento realizado en la forma descrita con estos agregados.

La figura 3.3 muestra el ajuste a los datos publicados para la línea celular humana T98G de glioblastoma [Sho99]. La figura 3.4 hace otro tanto para la línea celular humana L132 de células epiteliales de pulmón [Sin94]. Los ajustes para los modelos VIR y LQ se han representado con líneas de trazos y de puntos respectivamente. Los ajustes de estos datos experimentales obtenidos mediante el modelo IR de la ecuación (3.2) se muestran con líneas continuas. La parte derecha de cada una de las figuras resalta un detalle de la región

en la que se produce la inducción de la reparación para la línea celular correspondiente. En la tabla 3.1 se dan los datos obtenidos para todos estos ajustes; en la última fila se muestra \bar{d}_c , calculado a partir de los parámetros ajustados.

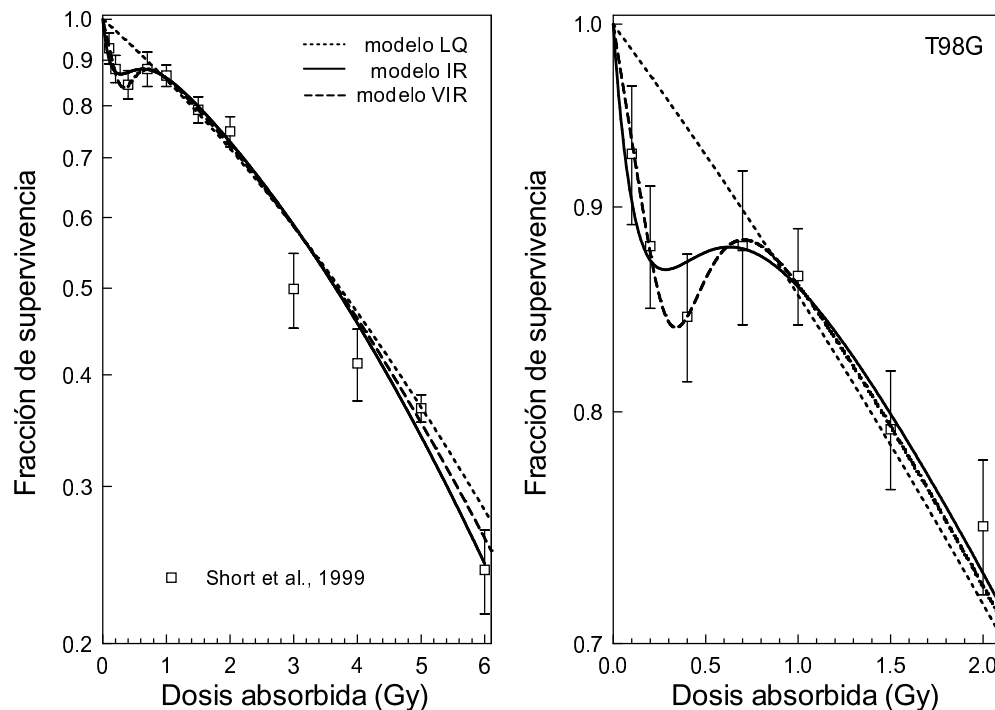


Figura 3.3: Ajustes del modelo de supervivencia propuesto a los datos experimentales publicados para la línea celular humana T98G de glioblastoma (Short et al. 1999 [Sho99]). También se muestra el ajuste del modelo IR dado por la ecuación (3.2). En la parte derecha se resalta un detalle de la región en la que se produce la inducción de la reparación.

Como puede apreciarse, el modelo VIR describe adecuadamente los dos conjuntos de datos a los que se ha ajustado, y posee la capacidad de adaptarse bien a la estructura de los valores de supervivencia en la región en la que se produce la hipersensibilidad. Esto es particularmente destacable en el caso de las células de la línea T98G (figura 3.3). A la vista de estos resultados puede afirmarse que es posible formular un nuevo modelo, el VIR, basado en la explicación biológica más plausible para el fenómeno LDRHS, con capacidad para describir satisfactoriamente los datos experimentales de que disponemos.

Los resultados obtenidos para la línea celular MCF-7 se muestran en la figura 3.5 junto con los ajustes que proporcionan los modelos estudiados en este capítulo. Los valores de estos ajustes también se incluyen en la tabla 3.1. Como sucede para los datos de las líneas celulares L132 y T98G, el modelo LQ no es capaz de describir el comportamiento de los valores de supervivencia en la región de dosis estudiada; en este caso los valores obtenidos para el cociente α_s/α_r son 5.78 y 2.78 para los modelos IR y VIR, respectivamente. Esto nos permite concluir que el fenómeno de hipersensibilidad a baja dosis se presentan en esta línea celular. Por otra parte, al menos en una primera aproximación, el nuevo modelo se acomoda mejor a los datos experimentales que el modelo IR, como puede apreciarse

por su mejor descripción de la región en la que parece producirse el fenómeno de LDHRS y por el menor valor para χ^2/m en el caso del modelo VIR.

En la figura 3.6 se muestran las distribuciones obtenidas para el valor de la dosis crítica para la estimulación de la reparación, d_c , cuando se utiliza el modelo VIR para describir los datos de supervivencia de las líneas celulares L132, T98G y MCF-7. Es interesante destacar que, aunque las tres líneas celulares muestran la LDHRS en la misma región de dosis absorbida, las tres distribuciones son diferentes; la línea L132 presenta una larga cola, mientras que los esferoides de la línea MCF-7 tienen una distribución muy próxima a la normal.

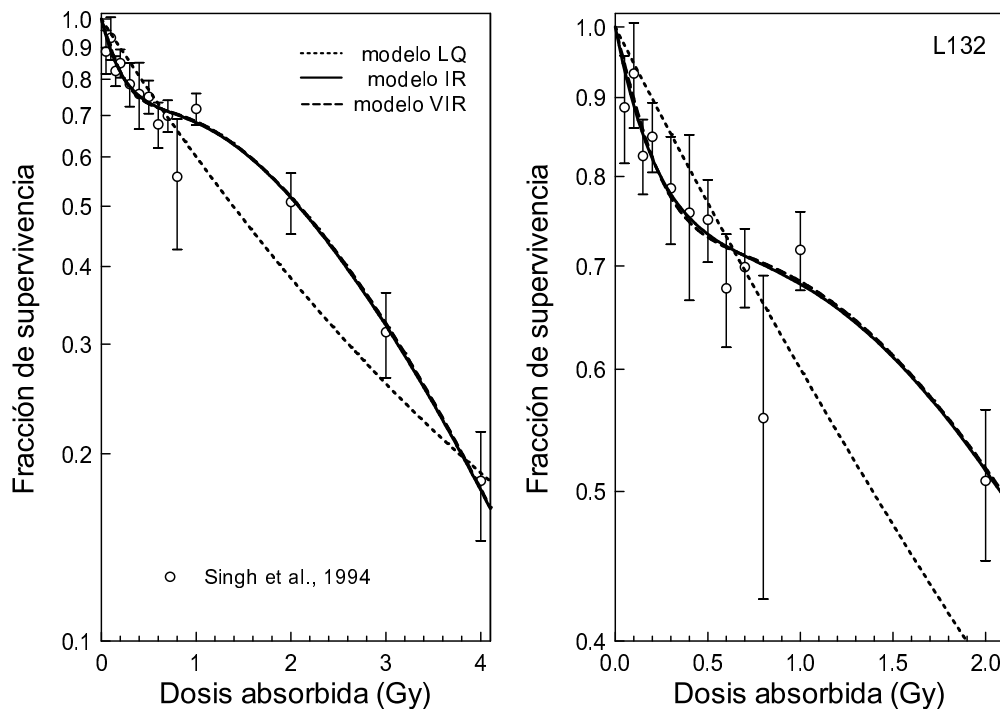


Figura 3.4: Ajustes del modelo de supervivencia propuesto a los datos experimentales publicados para la línea celular humana L132 de células epiteliales de pulmón (Singh et al. 1994 [Sin94]). También se muestra el ajuste del modelo IR dado por la ecuación (3.2). En la parte derecha se destaca un detalle de la región en la que se produce la inducción de la reparación.

Como se ha dicho antes, es posible elegir otras distribuciones distintas a la lognormal para describir la variación de d_c en la población celular. Sin embargo, la distribución lognormal, además de describir adecuadamente esta variación, puede fundamentarse en argumentos biológicos como los desarrollados en el capítulo 1 [Koc66]; allí para explicar la distribución en la población de pacientes del efecto final sobre los tejidos sanos, se partía de la distribución del daño celular en el ADN de un cierto tipo de células. En la situación que nos ocupa, si suponemos que la inducción de la reparación es una consecuencia del daño inicial que la radiación inflige al ADN que, tras varias etapas, produce la activación de un nuevo mecanismo de reparación celular, podemos considerar que la distribución final de la señal, y, por tanto, de la dosis que produce una señal suficiente como para activar esos mecanismos, es una distribución lognormal. La forma final de esta distribución

dependerá del medio de cultivo de las células, de la concentración de oxígeno y nutrientes en el seno de la población celular y de la fase del ciclo en la que cada célula se encuentre. Esto significa que podemos esperar diferencias entre poblaciones celulares distintas o entre poblaciones semejantes sometidas a condiciones de vida diferentes.

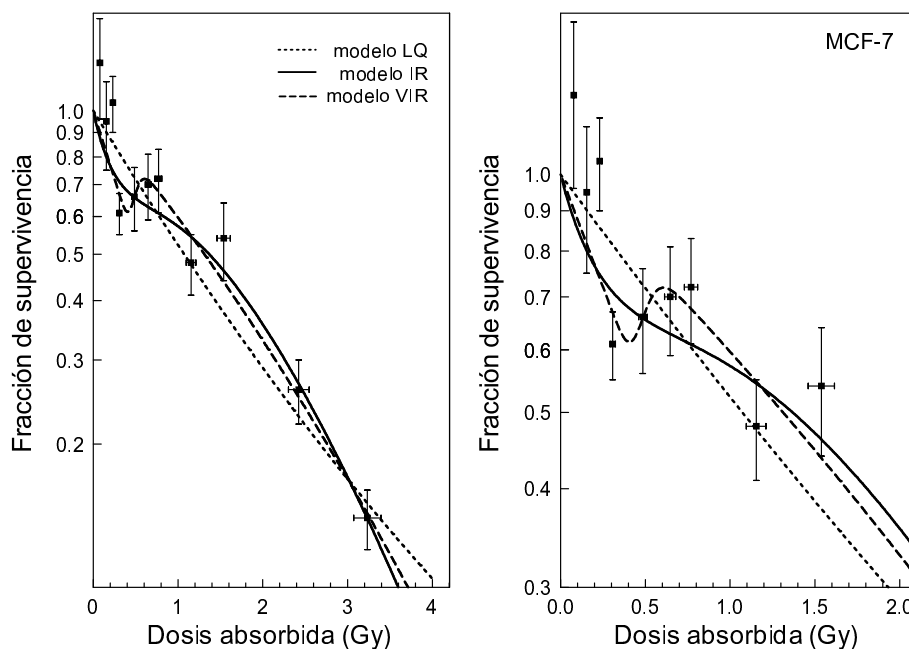


Figura 3.5: Ajuste del modelo de supervivencia propuesto en este trabajo dado por la ecuación (3.6) a los datos de supervivencia de los esferoides de la línea celular humana MCF7, clon BB, de cáncer de mama. También se muestran los ajustes del modelo IR dado por la ecuación (3.2). Las incertidumbres corresponden a un factor de cobertura $k=1$.

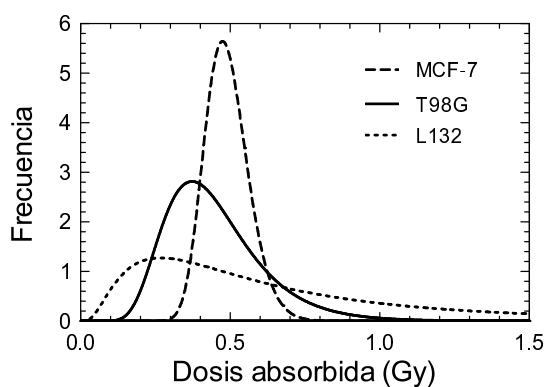


Figura 3.6: Distribución lognormal para d_c , ecuación (3.7), de cada una de las líneas celulares estudiadas.

Tabla 3.1: Resultado del ajuste de los modelos LQ, IR y VIR a los tres conjuntos de datos experimentales analizados en este trabajo. Entre paréntesis se muestran los límites para una confianza del 95 %. También se muestran los valores de ji-cuadrado por grado de libertad, χ^2/m , para los ajustes.

	L132 [Sin94]	T98G [Sho99]	MCF-7 (este trabajo)
Parámetros LQ			
α (Gy^{-1})	0.504 (0.370,0.638)	0.153 (0.091,0.215)	0.677 (0.315,1.038)
β (Gy^{-2})	-0.030 (-0.078,0.018)	0.011 (-0.003,0.024)	-0.028 (-0.156,0.100)
χ^2/m	1.86	3.21	2.19
Parámetros IR			
α_s (Gy^{-1})	1.412 (0.909,1.914)	1.341 (0.154,2.532)	1.930 (-1.387,5.248)
α_r (Gy^{-1})	0.200 (0.009,0.390)	0.127 (0.079,0.173)	0.334 (-0.562,1.230)
β (Gy^{-2})	0.059 (0.001,0.117)	0.016 (0.006,0.026)	0.085 (-0.209,0.380)
d_c (Gy)	0.440 (0.202,0.677)	0.237 (0.057,0.417)	0.411 (-0.649,1.471)
χ^2/m	0.44	1.26	1.75
Parámetros VIR			
α_s (Gy^{-1})	1.084 (0.454,1.715)	0.666 (0.251,1.081)	1.310 (0.460,2.160)
α_r (Gy^{-1})	0.181 (-0.124,0.488)	0.132 (0.088,0.176)	0.479 (0.088,0.870)
β (Gy^{-2})	0.063 (-0.021,0.147)	0.015 (0.006,0.025)	0.038 (-0.101,0.178)
μ	-0.629 (-1.280,0.023)	-0.860 (-1.348,-0.372)	-0.723 (-1.206,-0.241)
σ	0.826 (-0.372,2.024)	0.356 (-0.210,0.923)	0.147 (-0.463,1.757)
\bar{d}_c (Gy)	0.750 (-0.148,1.648)	0.451 (0.213,0.689)	0.491 (0.275,0.707)
χ^2/m	0.51	1.29	1.61

Es posible así diseñar experimentos en los cuales la variabilidad entre las células se reduzca; por ejemplo, teniendo en cuenta que las células de la línea MCF7 son estrógeno-dependientes y empleando esta dependencia para sincronizar las células en las diferentes fases del ciclo celular mediante antiestrógenos [Vil95b]. De este modo, podrían estudiarse los efectos de la fase del ciclo celular sobre la hipersensibilidad, así como evaluar si la expresión de las proteínas producidas por los diferentes genes implicados en la reparación celular, como p53, ATM o PARP, tiene un comportamiento diferente en las células MCF7 que crecen como esferoides respecto de las que se desarrollan en monocapa [Sil96, Agu07].

Puesto que los contactos entre células son muy importantes en los tumores reales, y pueden influir en su respuesta a la radiación, es interesante estudiar el fenómeno LDHRS en un modelo tumoral en el que estos contactos célula-célula también se produzcan. Eso es lo que se ha hecho aquí para el caso de los esferoides multicelulares.

Los resultados obtenidos muestran la flexibilidad del modelo VIR para describir la LDHRS tanto para células cultivadas en monocapa como para células creciendo en forma de MTS. Es interesante notar que, aunque no sean directamente comparables, los valores medios obtenidos para d_c con el modelo VIR (véase la tabla 3.1) son mayores que los obtenidos mediante el modelo IR. En cualquier caso, el intervalo de confianza del 95 % para los valores de ese parámetro se solapa. Esto se debe a la larga cola que muestra la distribución, y que produce medias mayores que los valores más probables.

De lo discutido hasta aquí puede afirmarse que el nuevo modelo es adecuado para describir el fenómeno LDHRS de diferentes líneas celulares. Si se compara con los modelos

clásicos LQ e IR, para lo que podemos fijarnos en el valor de χ^2/m consignado en la tabla 3.1, podemos afirmar que el modelo LQ es claramente inadecuado para describir los datos experimentales, mientras que los modelos IR y VIR producen ajustes muy similares. No obstante lo anterior, habida cuenta de que el nuevo modelo incorpora de manera adecuada la idea biológica que explica el fenómeno LDHRS, la interpretación VIR es más satisfactoria que la proporcionada por el modelo IR.

3.4. Recapitulación

El modelo lineal-cuadrático predice, para la región de dosis absorbidas por debajo de 0.5 Gy, una mayor supervivencia que la mostrada experimentalmente para muchas líneas celulares humanas. Este comportamiento, conocido como hipersensibilidad a baja dosis (LDHRS), está asociado a un aumento relativo de la resistencia a la radiación, que suele explicarse por la inducción de mecanismos de reparación celular que no se manifiestan hasta superada una determinada dosis umbral (dosis crítica para la estimulación de la reparación) y que, por tanto, aumentan la capacidad de las células, a partir de esa dosis, para superar el daño que la radiación les inflige.

El modelo empleado usualmente para describir los datos de supervivencia cuando se produce el fenómeno LDHRS se conoce como modelo de reparación inducida (IR), y predice una variación continua y suave del parámetro α del modelo lineal cuadrático con la dosis, lo que contradice la explicación biológica dada para este fenómeno.

Hemos desarrollado un nuevo modelo, al que denominamos modelo de inducción variable de la reparación (VIR), que es consistente con el mecanismo biológico de una inducción brusca de la reparación; y que permite reproducir las curvas de supervivencia experimentales introduciendo variabilidad en la dosis crítica para la estimulación de la reparación entre las diferentes células que componen la población estudiada. Este nuevo modelo describe adecuadamente los datos experimentales de otros autores.

Con los métodos descritos en el capítulo 2 hemos realizado un ensayo de recrecimiento para estudiar si las células MCF-7 manifiestan, cuando crecen en forma de esferoides multicelulares, el fenómeno LDHRS. Para ello hemos cuidado especialmente los aspectos dosimétricos de nuestro experimento. El resultado es que los esferoides de la línea MCF-7 exhiben una respuesta hipersensible a baja dosis que puede describirse adecuadamente con el modelo VIR.

La variabilidad aparece así como un constituyente fundamental de la respuesta biológica del sistema, que se introduce en el modelo matemático para describir el fenómeno LDHRS; pero también en varios aspectos metodológicos de interés, como la demostración de que sólo es preciso tener en cuenta la variabilidad en la dosis crítica y no en el resto de parámetros del modelo. Por otra parte, la elección de una distribución lognormal para la dosis crítica puede deducirse utilizando los mismos argumentos que se emplearon en el capítulo 1, en donde se explicaba que la respuesta de diferentes pacientes a la radiación se distribuye del mismo modo, al menos en lo que a la forma de la función densidad de probabilidad se refiere, que las roturas dobles de cadena en el ADN de los linfocitos de su sangre.

Por último, hay al menos dos cuestiones pendientes que merecen nuestra atención. La primera es que la estructura que se observa en la curva de supervivencia en el intervalo de dosis de 0 a 1 Gy bien podría darse en otras regiones, lo que indicaría la existencia de diferentes mecanismos de reparación que se activan a diferentes niveles de dosis. La segunda es que los valores de supervivencia observados en la región de dosis más bajas son mayores de lo esperado y, teniendo en cuenta que el método de recrecimiento que hemos desarrollado supone una perturbación mínima del sistema experimental, quizás muestren un comportamiento reproducible y no sean, meramente, un efecto espurio del ensayo.

Capítulo 4

El tiempo en la radioterapia fraccionada

En la radioterapia fraccionada de algunos cánceres, como los de cabeza y cuello, la proliferación de las células tumorales puede ser muy intensa, sobre todo en la fase final de los tratamientos, cuando el número de clonógenos se reduce como consecuencia de las irradiaciones previas; esta proliferación puede comprometer el resultado de la terapia. Sin embargo, problemas tan elementales como la cuantificación del efecto que cabe esperar tras la interrupción de un tratamiento o la demora en su inicio, no están resueltos por ahora; si bien es cierto que la mayor parte de los estudios de que disponemos indican que la probabilidad de curación disminuye en ambos casos para tumores con altas tasas de proliferación [Wit88, Fow92, Bes07, Wya08]. La razón fundamental de este desconocimiento es que carecemos de buenos datos experimentales sobre este particular, y ello por dos razones: la primera es que los datos disponibles se han obtenido en su mayor parte de estudios retrospectivos, en los que se examinan historias clínicas de individuos que recibieron su tratamiento en el pasado y que no estaban incluidos en un programa para estudiar específicamente esas cuestiones [Ben91a, Kea94]; y la segunda, que no es posible, por razones éticas, realizar estudios prospectivos aleatorios en los que las variables relevantes sean las interrupciones o las demoras en el inicio de los tratamientos, puesto que habría que someter a determinados pacientes a estas demoras o interrupciones a sabiendas de que pueden perjudicarles. Para sortear estas dos dificultades desarrollaremos herramientas computacionales que permitan generar poblaciones virtuales de pacientes, sobre las que puedan ensayarse los efectos de las interrupciones, demoras y variaciones del esquema de tratamiento. Estos útiles se basarán en técnicas Monte Carlo, que permiten introducir en las poblaciones virtuales objeto de los ensayos la variabilidad observada entre los pacientes reales. Trataremos así de reproducir mediante estas herramientas los datos que nos ofrecen los estudios clínicos retrospectivos disponibles; de tal modo que podamos ajustar los parámetros de los modelos para, más tarde, analizar el efecto del tiempo total de tratamiento mediante ensayos desprovistos de toda variabilidad que no sea la que interesa como objeto de estudio.

El contenido de este capítulo ha sido publicado en [Gui00, Vil01, Ald01, Gui03a, Ald04].

4.1. Antecedentes

4.1.1. La radioterapia fraccionada

La historia de la radioterapia es, en una buena parte, la de los métodos de fraccionamiento; es decir, el modo en que las dosis de radiación se distribuyen en el tiempo hasta completar un programa terapéutico. Es más, el desarrollo tecnológico que hace posible la irradiación selectiva de los tejidos de un individuo ha estado subordinado, en ciertos casos, a las condiciones impuestas por el deseo de aplicar un determinado esquema de tratamiento (como en la braquiterapia pulsada). Por otra parte, los desarrollos de la radiobiología y de los métodos de fraccionamiento han sido mutuamente dependientes, de tal suerte que la búsqueda de los mejores esquemas terapéuticos ha producido datos que era preciso explicar, y explicaciones que permitían ensayar nuevos modos de fraccionamiento.

En la primera etapa de esa historia, que se extendió durante los primeros 30 años del siglo pasado, el conocimiento sobre la mejor forma de distribuir la dosis para conseguir el mayor efecto sobre el tejido tumoral y preservar, en la medida de lo posible, los tejidos sanos, fue puramente empírico [Tha88]. Tal vez para algunos de sus artífices ni siquiera eso, puesto que la radioterapia era también una cuestión de escuelas: la francesa, cuyo representante más destacado fue Regaud, dividía la dosis total en múltiples fracciones; y la alemana, de entre cuyos componentes puede señalarse a Wintz, recomendaba irradiaciones en una o dos sesiones de dosis, naturalmente, más elevadas. Es curioso que las dos primeras aplicaciones de los rayos X al tratamiento de enfermedades consistiesen en esquemas fraccionados: Grubbé trató a una mujer con cáncer de mama en 18 fracciones diarias de 1 hora, y Freund a un niño con nevus piloso mediante 10 exposiciones diarias de 2 horas; ambos en 1897 [Del96]. Ha de mencionarse, por no ser un dato irrelevante, que la tecnología disponible influyó sobremedida en este hecho: los equipos generadores de rayos X no producían altas tasas de dosis, y la observación del paciente a lo largo del tiempo era fundamental para establecer su respuesta a la terapia.

La adhesión, casi conversión, a la radioterapia fraccionada se produjo en todo el mundo en los años 30 y 40 gracias, en gran medida, a la investigación sistemática de Regaud junto a otros científicos, cuyos experimentos de la respuesta de los testículos de carnero a la radiación son una jugosa anécdota para aquéllos que tienen que hablar en público sobre fraccionamiento [Reg27]; pero, sobre todo, a los resultados de Coutard en el tratamiento de los cánceres de cabeza y cuello en la década de los años 20 [Cou32]. Éste, a diferencia de Regaud y otros oncólogos, que empleaban fuentes de radio para el tratamiento de cánceres de útero, lengua o labio, utilizó rayos X para tratar tumores más extensos de cabeza y cuello. La frecuencia de aparición de graves efectos secundarios en sus pacientes era baja, frente a la incidencia del 23 % para edema severo y necrosis en pacientes tratados con dosis únicas [Jun24]. Coutard se ayuda de la observación de las reacciones de la piel que remiten sin secuelas, eritema y descamación seca; también establece que la respuesta de los epitelios y el tumor son semejantes, por cuanto las células tumorales proceden de esos epitelios.

A partir de los trabajos de Strandqvist de 1944 [Str44] y hasta los años 70, la influencia sobre el efecto de la radioterapia (en los tejidos sanos y en el tumor) del modo en que se distribuye en el tiempo la dosis total, conocida como factor tiempo, se describe mediante la ley potencial de Schwarzschild de la fotoquímica aplicada al fraccionamiento, aunque dicha

aproximación sufre una evolución que se concreta en diferentes modelos: *nominal standard dose*, NSD [Coh49, Ell67]; *cumulative radiation effect*, CRE [Kir71]; y *time, dose, and fractionation*, TDF [Ort73]. Todos ellos tratan de ajustar los datos clínicos de la respuesta al tratamiento mediante varios de los parámetros que lo definen: dosis por fracción, número de fracciones total y fracciones por semana, dosis total y tiempo de tratamiento. Estos modelos, puesto que proceden de una ley empírica, carecen de una base biológica que los sustente. Además, y esto es lo más relevante, no explican bien los datos clínicos, de los cuales se generó una colección importante a raíz de los ensayos clínicos aleatorios auspiciados por Instituto Británico de Radiología a partir de 1966 [Sau97], especialmente en lo que se refiere a la distinción de las respuestas del tejido sano en precoces y tardía [Tha88].

A principios de los 80 aparece un nuevo modelo, el lineal-cuadrático, que permite tratar el problema del fraccionamiento a partir de una hipótesis biológica [Dou76, Bar82]: el efecto que se observa sobre el tumor o los tejidos sanos tras su irradiación es consecuencia de la muerte de las células que los constituyen, y dos tratamientos que produzcan igual mortandad celular producen también igual efecto sobre el tejido en consideración (*isoeffecto*). El desarrollo de los ensayos de supervivencia celular, a partir de las experiencias de Puck y Marcus de 1956 [Puc56], permitió un intenso trabajo de laboratorio que ha sido determinante en el conocimiento de la respuesta clínica de los tejidos irradiados (tumoraes y sanos).

Aunque es posible plantear otras ecuaciones de isoeffecto a partir de modelos de supervivencia celular diferentes al lineal-cuadrático [San93], ha sido éste, tal vez por su adecuada sencillez, el único aplicado extensamente en la práctica clínica durante las últimas décadas, y el que ha determinado la suerte de los nuevos modos de fraccionamiento en radioterapia. El modelo lineal-cuadrático ha permitido dos cosas mutuamente dependientes: la primera, explicar las diferentes respuestas a la radiación, precoz y tardía, del tejido sano y la respuesta de los tumores; la segunda, plantear nuevos modos de fraccionamiento atendiendo a bases biológicas razonablemente bien establecidas. De este modo, con un soporte matemático extraordinariamente simple, se ha generado una intensa y fructífera investigación de nuevos modos de fraccionamiento que, a su vez, ha hecho precisas alteraciones del modelo que permitan dar cuenta de datos clínicos que no se habían observado hasta ahora. Vemos así que el método científico se ha asentado en una rama de la medicina, la radioterapia, que ha superado su antiguo empirismo y ha generado problemas que admiten ser tratados con las herramientas habituales de la física.

Durante los últimos años se han realizado muchos ensayos de fraccionamiento, especialmente para tumores de cabeza y cuello, partiendo de la información que proporciona la ecuación de isoeffecto lineal-cuadrática [Sau97, Bau02]. Si tomamos como referencia el esquema clásico de la radioterapia fraccionada (2 Gy por fracción, 1 fracción por día, 5 días por semana hasta alcanzar dosis totales de entre 60 y 70 Gy), puede afirmarse que el modelo lineal-cuadrático, corregido por la reparación incompleta del daño infligido por la radiación a los tejidos entre fracciones consecutivas [Dal85, Tha85], describe bien los esquemas de tratamiento hiperfraccionados, en los que se mantiene la duración del esquema clásico y se aumenta la dosis total mediante la administración de varias fracciones cada día (de una cuantía menor que la del esquema clásico) [Hor92, Bau10]. Mediante el hiperfraccionamiento se persigue incrementar el efecto sobre los tumores manteniendo un mismo nivel de daños en los tejidos sanos. Si bien es cierto que existen problemas de interpretación pendientes para los resultados de la braquiterapia de alta tasa y pulsada [Ciu03],

y algunos esquemas hiperfraccionados extravagantes, como el CHART [Bau02], el modelo da cuenta de los efectos que producen la variación en la dosis por fracción y el tiempo entre fracciones siempre y cuando no se altere el tiempo que dura el tratamiento completo. En todo caso, la atribución a la reparación incompleta del efecto de las fracciones de dosis de muy corta duración separadas pocas horas, parece ser una idea adecuada que sólo precisa de un mejor conocimiento, tanto de los mecanismos biológicos que producen la reparación, como del efecto de la heterogeneidad de la distribución de dosis con intensos gradientes a que dan lugar las fuentes de braquiterapia [Dal85, Tha85].

La cosas se complican más cuando la variación fundamental es el tiempo total de tratamiento. En el caso de neoplasias para las cuales la proliferación celular es muy importante, una forma de aumentar el efecto de la radiación sobre el tumor es limitar esa proliferación reduciendo la duración total de los tratamientos. A los esquemas fraccionados que aplican este principio se les llama acelerados [Ang97], y el modelo lineal-cuadrático, con una sencilla modificación introducida ad hoc para tener en cuenta la proliferación, no hace predicciones adecuadas.

Los esquemas acelerados también aumentan el daño a los tejidos sanos de respuesta precoz y, sobre ellos, el efecto de la duración del esquema terapéutico es muy importante, tanto más cuanto mayor sea la renovación celular en el tejido en consideración. Pero en esta memoria, en la que necesariamente debemos realizar una acotación en los problemas asociados a la proliferación, se estudiarán exclusivamente los efectos del tiempo sobre el tumor. Y esto sin menoscabo de la capacidad de los métodos que aquí se desarrollan para analizar la influencia del tiempo de tratamiento sobre el daño a los tejidos sanos. Presentaremos así nuevas herramientas para el estudio de los efectos de la proliferación de las células tumorales en la radioterapia fraccionada, en las que la idea fundamental es la consideración de la variabilidad en el modo en que ha sido expuesta a lo largo de los capítulos precedentes.

4.1.2. Factor tiempo en radioterapia fraccionada

Como se ha apuntado antes, la proliferación celular de muchos tumores tiene una influencia importante en el resultado de la radioterapia [Wit88, Tro91]. El que históricamente los *esquemas partidos*, que ya no se emplean, produjeran peores resultados que los esquemas continuados [Par80, Ove88], junto con la experiencia clínica de una necesidad de mayores dosis para programas de terapia más largos [Tay90, Bar92], se han citado como pruebas de la proliferación de las células tumorales durante la radioterapia. Esta proliferación explica por qué una prolongación del tiempo de tratamiento produce una reducción de la tasa de curación entre los pacientes que la sufren, sean tratados exclusivamente con radioterapia o mediante cirugía seguida de radioterapia [Fow92, Ped01, Suw03].

En el caso de las interrupciones, y para determinados tipos de cáncer, puede considerarse probado que el aumento del tiempo total que suponen produce un empeoramiento de los resultados de la radioterapia [Gui03a, Bes07]. Para entender la magnitud del problema que provocan las interrupciones basta un ejemplo próximo: en tres hospitales andaluces un estudio de los tratamientos llevados a efecto durante los años 2007 y 2008, para un total de 2052 pacientes, mostró que el 83% de ellos interrumpieron su tratamiento al menos una vez y el 63% dos veces [Rio10]. Para tumores de células escamosas de cabeza y cuello el tiempo total de tratamiento se aumentó de media 7 días y, de acuerdo con lo dicho y

en una primera aproximación, esto supone globalmente una reducción del 10 % en la probabilidad de control tumoral que hubiese podido alcanzarse de no existir interrupciones [Bes07].

Es así necesario evitar las interrupciones y, si esto no es posible, adoptar las medidas oportunas para compensar el efecto adverso que provocan [RCR08, Jam08]. Estas acciones deben contemplarse en el marco de los programas de calidad de las unidades de radioterapia.

En algunos estudios sobre pacientes tratados exclusivamente con radioterapia parece que la espera entre el diagnóstico y la terapia, al menos en los tiempos usuales que esto supone, no tiene influencia en los resultados [Wit88, Rob93]. En pacientes irradiados tras cirugía, los resultados de los estudios clínicos disponibles son controvertidos; mientras que algunos muestran una influencia negativa de un aumento de la demora [Ped01], otros no muestran influencia alguna [Leo03]. No obstante, es razonable suponer que la demora en el comienzo de la radioterapia influya en su resultado [Mac07], y los análisis teóricos sobre este particular así lo muestran [Ald04, Lal07, Wya08]. En este caso también es patente la preocupación por una gestión y control adecuados de los tiempos de espera para el comienzo de la radioterapia, que pueden ser muy variables de unos hospitales a otros [Jac07].

Antes de proseguir es conveniente poner énfasis en la gran diferencia que existe entre la demora de la radioterapia y su interrupción. Mientras que para las demoras, bien sea por las listas de espera o por la administración de otros tratamientos previos, tenemos una débil constatación de su influencia en el resultado final, si tenemos alguna, para las interrupciones estas pruebas son sólidas, aunque la cuantificación de su efecto es también difícil. En cualquier caso, los perjuicios de las demoras y las interrupciones se deben a la proliferación celular y su manifestación no será más que una consecuencia de la relación “señal/ruido” que producen nuestras formas usuales de estudiar el problema; relación muy débil para las primeras y más alta, en algunos tipos de cáncer, para las segundas.

Vamos a introducir ahora los útiles matemáticos usuales para la consideración del efecto del tiempo en que se administra un tratamiento en la radioterapia fraccionada. Obsérvese que este tiempo sólo se refiere al período que va desde el inicio de la radioterapia a su final. Por consiguiente, no atendemos a las demoras en lo que sigue; volveremos más tarde sobre ellas.

El efecto final de un esquema de radioterapia depende de la distribución de la dosis en el tiempo. Así, fijado un cierto nivel de efecto biológico, o isoeffecto, la dosis absorbida necesaria para alcanzarlo, o *dosis isoeffectiva*, será diferente para diferentes esquemas terapéuticos. El modelo lineal-cuadrático proporciona diversas formas de calcular relaciones de isoeffecto, pero todas se basan en la suposición de que un cierto efecto de la radiación se corresponde con una cierta fracción de células muertas. La más utilizada fue introducida por Barendsen en 1982 [Bar82] con el nombre de *dosis extrapolada de tolerancia* (DET). Fowler sugirió en 1989 [Fow89b] el término *dosis biológica equivalente* (DBE) para una cantidad equivalente a la DET¹. Aquí emplearemos la terminología DBE.

De acuerdo con el modelo lineal-cuadrático expresado en las ecuaciones (2.7) y (2.8), el efecto E que produce un esquema de n fracciones de dosis d_f , administradas con suficiente

¹Términos en los que se ha vertido al español el original inglés “biologically effective dose”.

intervalo de tiempo como para que la reparación de todo el daño subletal sea completa, puede escribirse:

$$E \equiv -\ln s = nd_f(\alpha + \beta d_f). \quad (4.1)$$

Dividiendo ambos miembros por α llegamos a la definición de la DBE:

$$\text{DBE} = \frac{E}{\alpha} = nd_f \left(1 + \frac{d_f}{\alpha/\beta} \right). \quad (4.2)$$

Así pues, la DBE es una medida del efecto biológico en un esquema fraccionado y tiene unidades de dosis absorbida.

Para incluir el efecto de la proliferación basta añadir un término en la ecuación (4.1) que dé cuenta del aumento de células con el paso del tiempo. Si para ello, como es usual, empleamos el modelo de crecimiento exponencial:

$$-\ln s = nd_f(\alpha + \beta d_f) - \frac{\ln 2}{T_D} T, \quad (4.3)$$

donde T el tiempo total en que se administra el tratamiento. Así tenemos:

$$\text{DBE} = nd_f \left(1 + \frac{d_f}{\alpha/\beta} \right) - \kappa T, \quad (4.4)$$

con $\kappa = \ln 2/(\alpha T_D)$. A κ se le llama *factor tiempo* y representa, para un cierto esquema terapéutico empleado como referencia, la DBE “perdida” por cada día que aumenta el tiempo total de tratamiento respecto del tiempo empleado en el esquema de referencia. Naturalmente, la proliferación disminuye la efectividad de la dosis absorbida para producir un determinado efecto biológico y, por tanto, entra con un signo negativo en la ecuación anterior.

En la tabla 4.1 se muestra un resumen de los datos de varios estudios clínicos sobre esta influencia del tiempo total de tratamiento en la probabilidad de control tumoral, y se da el factor tiempo estimado para cada patología cuando está disponible.

La presentación de estos datos en forma de tabla parece otorgarles una consistencia de la que carecen. La lectura de las referencias es obligada para entender las deficiencias que posee la metodología utilizada en los estudios retrospectivos (muy pocos estudios son prospectivos [Rob94]), limitación que ya ha sido indicada [Ben91a, Kea94]. Son tantos los aspectos que inciden en el resultado final del tratamiento que cabe predecir una compleja interacción entre ellos, de manera que se oscurecen los datos aportados por cualquier análisis estadístico por sofisticado que sea. Entre dichos aspectos cabe destacar los siguientes: incertidumbre en la distribución de dosis en la zona irradiada, efecto de otros tratamientos o estrategias previas a la radioterapia, efectos de los cambios de instrumental y política de los centros hospitalarios y sesgo producido por una mayor dosis y, consecuentemente, un mayor tiempo total para los pacientes con peor pronóstico.

Como se aprecia en la tabla 4.1, incluso para los tumores que se han considerado clásicamente de proliferación lenta, como los de la próstata, se apunta una posible influencia del tiempo total de tratamiento. Es necesario, por tanto, esclarecer esta cuestión mediante métodos alternativos a los ensayos retrospectivos que se valen de las herramientas usuales

Tabla 4.1: Resultados de varios estudios clínicos sobre la influencia del tiempo total de tratamiento en el control local y factor tiempo estimado en ellos para varios tipos de cáncer. El factor tiempo para la ecuación de isoeffecto, κ , se calcula multiplicando el factor tiempo de esta tabla, que corresponden a un esquema de 2 Gy por fracción, por $\left(1 + \frac{2}{\alpha/\beta}\right)$ [Gui03a], donde α/β se toma de acuerdo con el tipo de tumor y cuyos valores pueden consultarse en [Van09].

Tumor	Efecto del tiempo total de tratamiento	Factor tiempo (Gy/día)	Referencias
cabeza y cuello	significativo	0.6	[Wit88, Mac89]
	significativo	1.09	[Suw03]
glotis	no significativo	0.48 [-0.88,1.83] ^a	[Saa98]
laringe	significativo	0.64-0.73	[Bar92]
	significativo	0.5 (T2) y 0.6 (T3)	[Sle92]
	significativo	0.8 [0.5,1.1] ^a	[Rob94]
	significativo	0.6-0.8	[Hen94]
	significativo	0.89 [0.35,1.43] ^a	[Rob98]
	significativo	0.76 [0.51,1.26] ^a	[Cha95]
faringe/laringe	no significativo	0.30 [-9.2,1.3] ^a	[Cha95]
nasofaringe	no significativo	—	[Lee95]
orofaringe	significativo	0.68 [0.05,1.3] ^a	[Ben91b]
esófago	no significativo (T1)	-3.75	
	significativo (T2)	0.24 [0.1,1.96] ^a	[Kaj95]
pulmón	significativo	—	[Cox93]
	significativo	0.45	[Kou96, Che00]
mama	no significativo	—	[Tha90]
	significativo	—	[Bes05]
cuello uterino	significativo (est. III)	—	[Lan93]
	significativo	—	[Fyl92, Gir93]
			[Per95, Pet95]
	no significativo	—	[Err02]
vejiga	significativo	0.36	[Mac91]
	no significativo	—	[Den95, Moo98]
	significativo	0.2	[Maj04]
próstata	no significativo	—	[Kaj93]
	significativo para dosis >72 Gy	—	[Per04]
	significativo	—	[Dam08]
	significativo	—	[Tha10]

^a intervalo de confianza del 95 %

de la estadística; métodos que nos permitan obtener valores fiables para el factor tiempo que puedan aplicarse en la práctica clínica, puesto que, si se produce proliferación tumoral, un aumento en el tiempo de tratamiento ha de generar un aumento del número de clonógenos y, en consecuencia, un empeoramiento de la probabilidad de curación para el paciente. Este aspecto ha de ser tenido en cuenta aunque no todos los estudios retrospectivos lo muestren.

4.1.3. Repoblación acelerada

El fenómeno conocido como *repoblación acelerada* consiste en un aumento considerable del ritmo de crecimiento de un tumor, respecto del que poseía antes de comenzar la terapia, conforme el tratamiento progresa. Los mecanismos que dan lugar a la repoblación acelerada no son bien conocidos, aunque se han propuesto varias explicaciones basadas principalmente en tres procesos [Fow91, Tro93]: acortamiento del tiempo del ciclo celular, aumento de la fracción de crecimiento y reducción de la pérdida celular. El primero de estos procesos ha sido mostrado en algunos trabajos [Han96], aunque en otros no ha podido comprobarse [Dur97]. Por otra parte, sí se ha comprobado que la radiación produce el paso de la fase G_0 a la fase G_1 en el ciclo reproductivo celular en tumores in vivo; las células proliferantes no sólo continúan en el ciclo durante la radioterapia, sino que la mayoría de las células, antes quiescentes, entran en él como consecuencia de la misma. Este incremento de la fracción de crecimiento puede producirse tras unas pocas sesiones de radioterapia convencional [Dur97]. Puesto que los patrones de proliferación varían mucho de unos tipos de tumores a otros, y ya que la repoblación acelerada es característica, por ejemplo, de los tumores de células escamosas, se ha sugerido que estos tumores retienen algunos de los mecanismos homeostáticos característicos de los tejidos de que proceden (como la mucosa oral) [Tro93]; y la aceleración es así resultado de la compensación de la pérdida celular producida por la radiación u otros agentes.

Como la repoblación acelerada se manifiesta varias semanas después de comenzar el tratamiento [Wit88], puede modificarse la ecuación (4.4) para tener en cuenta este hecho:

$$DBE = nd_f \left(1 + \frac{d_f}{\alpha/\beta} \right) - \kappa \max(T - T_0, 0). \quad (4.5)$$

Es decir, el efecto del tiempo total de tratamiento no se hace sentir si no superamos un cierto tiempo T_0 , a partir del cual la repoblación acelerada produce una disminución clínicamente significativa del tiempo de duplicación. Para tumores de cabeza y cuello la estimación para T_0 es de unos 28 ± 7 días para un intervalo de confianza del 95 % [Dal02].

Aunque la ecuación (4.5) es la que se usa comúnmente en la práctica clínica, parece más natural considerar que el tiempo de duplicación, T_D , disminuye a lo largo del tratamiento de acuerdo con algún modelo; por ejemplo, con el de Gompertz. En la figura 4.1 se muestra la posible evolución del tiempo de duplicación a lo largo de un tratamiento, conforme se produce una disminución de número de células tumorales. Naturalmente, considerar un tiempo de duplicación variable de este modo impide usar una expresión para la DBE tan sencilla como la dada por la ecuación (4.5); sin embargo, será fácil plantearlo así en las simulaciones que haremos más tarde.

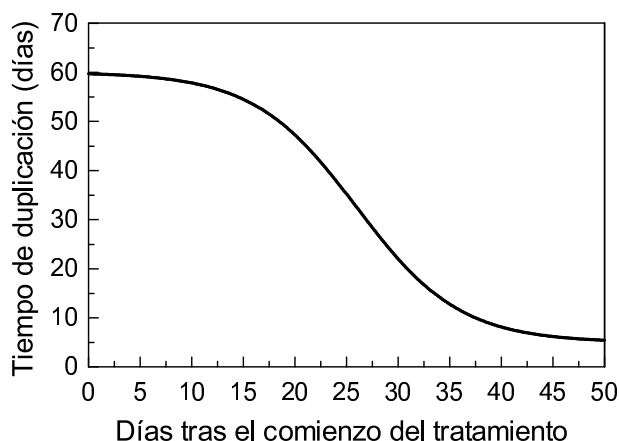


Figura 4.1: Posible evolución del tiempo de duplicación conforme progresa un tratamiento de acuerdo con la hipótesis de repoblación acelerada; en la fase final el tiempo de duplicación puede llegar a ser de unos pocos días. El caso representado aquí no corresponde al modelo de Gompertz, que predice un aumento indefinido del tiempo de duplicación.

Propósito de este capítulo

Los estudios clínicos retrospectivos tienen defectos importantes y la información que nos proporcionan es limitada. Si a esto añadimos que los ensayos clínicos aleatorios sobre los efectos de la demora o la interrupción de los tratamientos en radioterapia fraccionada nos están vedados por constricciones éticas, cabe desear alguna suerte de experimentos virtuales en los que puedan realizarse ese tipo de ensayos sin comprometer la calidad del tratamiento de los pacientes reales. Nosotros los desarrollaremos a partir de técnicas de simulación computarizada en las que han de tener un papel relevante los métodos Monte Carlo, que permiten introducir en las poblaciones virtuales objeto de tales ensayos la variabilidad observada en los pacientes reales.

Establecido el modelo computacional que nos permita generar trasuntos de la colección de casos que constituyen un estudio clínico real, examinaremos el efecto de las demoras e interrupciones de la radioterapia y apuntaremos algunas ideas sobre la validez y el alcance de los análisis estadísticos retrospectivos.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Cinética tumoral

En la radioterapia del cáncer tras cirugía podemos considerar tres etapas en la evolución de un tumor. La primera es el tiempo que va de la cirugía al comienzo de la radioterapia, en ella los clonógenos que no han sido eliminados proliferan y el tumor crece. La segunda corresponde a la radioterapia propiamente dicha, y en ella se produce una reducción del número de clonógenos como consecuencia de la radiación, pero ha de tenerse en cuenta que, durante el tiempo que media entre las distintas fracciones del tratamiento, se produce nuevamente la proliferación de los clonógenos tumorales. Por último, si el tumor no ha sido

completamente eliminado por la radioterapia, los clonógenos supervivientes lo harán crecer de nuevo hasta que sea detectable clínicamente. Nótese que un programa terapéutico que no incluya la cirugía previa puede dividirse en las dos últimas fases, considerando como punto de partida el número de células que tuviese el tumor al comienzo de la radioterapia.

Este conjunto de acontecimientos puede ser modelado convenientemente mediante una simulación Monte Carlo, que incluirá, como ingredientes fundamentales, el crecimiento del tumor como consecuencia de la división celular y el efecto de la radioterapia a través de la supervivencia celular.

Para describir el crecimiento tumoral podemos emplear los modelos exponencial y gompertziano dados por las ecuaciones (2.1) y (2.10) respectivamente. Puesto que nuestro tratamiento considerará el número de células en lugar del volumen, podemos reescribir esas ecuaciones del siguiente modo:

$$N(t) = N_0 \exp \left[\frac{\ln 2}{T_D} t \right], \quad (4.6)$$

para el modelo exponencial, donde $N(t)$ es el número de células clonogénicas en el instante t , N_0 el número de clonógenos en el instante inicial y T_D el tiempo de duplicación; y

$$N(t) = N_0 \exp \left[(A - \ln N_0)(1 - e^{-at}) \right], \quad (4.7)$$

para el de Gompertz, donde se ha incluido la necesaria normalización. Recordemos que para el modelo de Gompertz T_D no es constante y depende del número de clonógenos, como se ve en la ecuación (2.4).

El aumento del número de células en un intervalo de tiempo Δt será:

$$\Delta N(t) = N(t + \Delta t) - N(t) = N(t)p(t, \Delta t), \quad (4.8)$$

donde $p(t, \Delta t)$ es la probabilidad de crecimiento. En el caso del modelo de Gompertz:

$$\begin{aligned} p(t, \Delta t) &= \exp \left\{ [A - \ln N(t)](1 - e^{-a\Delta t}) \right\} - 1 \\ &= \exp \left[\frac{\ln 2}{1 - e^{-aT_D}} (1 - e^{-a\Delta t}) \right] - 1 \equiv p(t, \Delta t, T_D). \end{aligned} \quad (4.9)$$

Y para el modelo exponencial:

$$p(t, \Delta t, T_D) = \exp \left[\frac{\ln 2}{T_D} \Delta t \right] - 1. \quad (4.10)$$

La reducción del número de células debida a la radiación se introduce en la simulación mediante la fracción de supervivencia, s , que consideramos constante durante todo el tratamiento.

4.2.2. Procedimiento de simulación

Para simular la evolución de los tratamientos en las etapas que hemos descrito, se genera un conjunto de tumores virtuales que reproducen la heterogeneidad en tamaños, cinética celular y respuesta a la radiación (supervivencia) que puede esperarse en la clínica.

Para ello, los parámetros de la simulación se obtienen para cada tumor de acuerdo con una distribución de probabilidad adecuada.

Vamos a considerar dos posibles modelos de crecimiento en las simulaciones, los modelos exponencial y de Gompertz; por ello, aunque los parámetros relacionados con el tamaño inicial de los tumores y la supervivencia, N_0 y s , serán los mismos en ambos casos, tendremos que tomar los parámetros de crecimiento de acuerdo con el modelo que se esté empleando: A y a en el caso del modelo de Gompertz y T_D para el modelo exponencial.

El número de clonógenos remanente tras la cirugía (o justo antes de la radioterapia si no hay cirugía), N_0 , se obtiene muestreando una distribución uniforme $\mathcal{U}[N_0^{\min}, N_0^{\max}]$. El resto de parámetros se determina del muestreo de distribuciones normales: $\mathcal{N}[s_0, \sigma_s]$, $\mathcal{N}[A_0, \sigma_A]$, $\mathcal{N}[a_0, \sigma_a]$ y $\mathcal{N}[T_{D0}, \sigma_{T_D}]$.

El muestreo de los valores de T_D para el modelo exponencial, y su dependencia del número de clonógenos en el caso del modelo de Gompertz, pueden producir valores extremadamente altos o bajos de este tiempo de duplicación respecto de lo que sucede en los tumores reales. Por ello, es preciso establecer unos límites para los valores que puede tomar este parámetro en las simulaciones. De acuerdo con el rango usualmente descrito en los estudios de que disponemos [Ste77], hemos fijado $T_D^{\min} = 3$ días y $T_D^{\max} = 180$ días. En correspondencia, las probabilidades de crecimiento de las ecuaciones (4.9) y (4.10) presentan también un valor mínimo y máximo.

Puesto que los programas usuales de radioterapia fraccionada separan 1 día las fracciones consecutivas de la dosis, el proceso de la simulación empleará incrementos temporales de esa duración, $\Delta t = 1$ día. Una vez transcurrido este tiempo, un tumor con $N(t)$ células aumentará su contenido celular en $\Delta N(t)$ células; valor que se obtiene mediante la distribución binomial $\mathcal{B}[N(t), p]$ que, como se mencionó en el prólogo [Tuc90], es la adecuada en estas circunstancias:

$$p = \begin{cases} p(t, 1, T_D^{\min}) & T_D \leq T_D^{\min} \\ p(t, 1, T_D) & T_D^{\min} < T_D < T_D^{\max} \\ p(t, 1, T_D^{\max}) & T_D \geq T_D^{\max}. \end{cases} \quad (4.11)$$

De este mismo modo pueden incluirse en las simulaciones tanto el crecimiento entre la cirugía y la radioterapia, como la proliferación que se produce por las paradas de los fines de semana o por las interrupciones del tratamiento.

Para simular la pérdida celular como consecuencia de la radiación, se muestreará el número de células supervivientes mediante la distribución binomial $\mathcal{B}[N(t), s]$.

En la figura 4.2 puede verse un ejemplo de simulación que emplea los procedimientos descritos. En este ejemplo, un tumor crece durante 100 días tras la cirugía, que no ha conseguido eliminar todas sus células, hasta que comienza la radioterapia. El tratamiento con radiaciones dura 40 días en los que, sesión tras sesión, el número de clonógenos disminuye; puede notarse la influencia de los 5 fines de semana en el aumento del número de células, que se aprecia con más detalle en la gráfica derecha. El tratamiento no ha tenido éxito y el tumor vuelve a crecer tras la radioterapia hasta que alcanza un tamaño que permite su detección clínica un año y medio después, y que en la figura corresponde a un contenido celular de 10^9 células. En esta simulación se ha utilizado el modelo de Gompertz para describir la proliferación celular, cuyo efecto puede apreciarse tanto en la lentificación del

crecimiento del tumor tras la radioterapia hasta que alcanza el tamaño que puede detectarse clínicamente, como en el aumento de la pendiente del tramo que indica el crecimiento durante los fines de semana conforme progresa la radioterapia. Para evitar los artefactos de un tiempo de duplicación excesivo o muy pequeño, se han introducido las limitaciones indicadas en la ecuación (4.11).

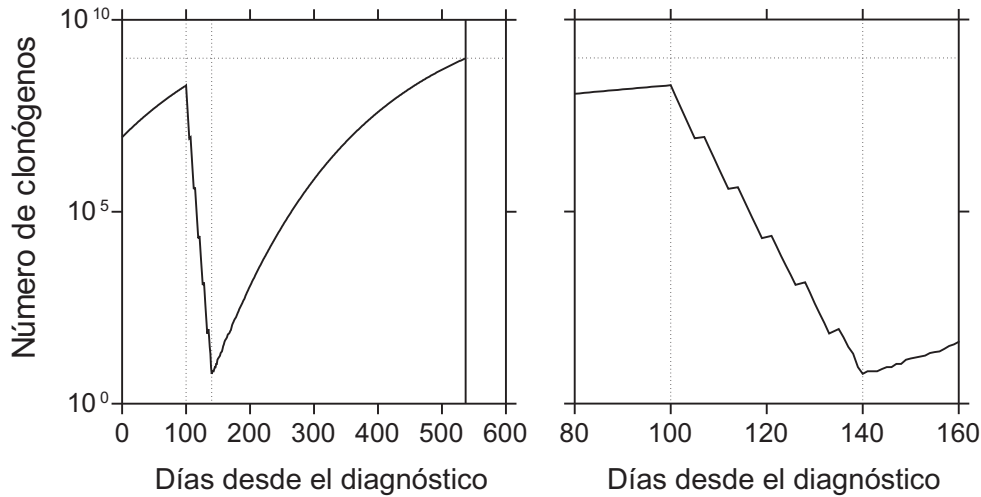


Figura 4.2: Evolución del número de clonógenos en la simulación de un tumor desde la cirugía (o desde el diagnóstico si no hay cirugía) y tras la aplicación de un tratamiento con radiaciones que no los destruye completamente. La figura de la derecha muestra un detalle en el que se aprecia mejor lo que acontece durante la radioterapia. En esta simulación se ha empleado el modelo de Gompertz (con las modificaciones mencionadas) para describir el crecimiento celular, de manera que el tiempo de duplicación varía de modo semejante al que se muestra en la figura 4.1.

En cada simulación, salvo que se indique lo contrario, se emplean 10⁵ tumores. Dadas las características de la situación estudiada, el resultado de cada ciclo de simulación (que corresponde con un tumor) es 1 ó 0, ya que el tumor resultará controlado tras el tratamiento o no (según que la radiación destruya todos sus clonógenos o no lo haga). En este caso, la incertidumbre puede determinarse como:

$$\sigma_Q = \sqrt{\frac{1}{N} \bar{Q}(1 - \bar{Q})}, \quad (4.12)$$

donde \bar{Q} es el valor medio de la cantidad estudiada para cada tumor en la muestra simulada. En todo lo que sigue las incertidumbres que se indican corresponden a un factor de cobertura $k=1$.

4.2.3. Parámetros de las simulaciones

Para que los resultados de las simulaciones que se han descrito tengan significación clínica deben buscarse unos valores para sus parámetros relevantes, que como hemos dicho son los siguiente: N_0^{\min} , N_0^{\max} , A_0 , σ_A , a_0 , σ_a , T_{D0} , σ_{T_D} , s_0 , σ_s .

En primer lugar, si nos centramos en la radioterapia tras cirugía, debemos considerar la posibilidad de que el procedimiento quirúrgico elimine completamente los clonógenos

tumorales. Existe una considerable incertidumbre relacionada con ese porcentaje de pacientes curados directamente por la cirugía [Lun98] y, por ello, no tendremos en cuenta esta posibilidad en las simulaciones, puesto que siempre puede considerarse aparte del siguiente modo:

$$\text{TCP} = (1 - R) \text{TCP}_0 + R, \quad (4.13)$$

donde TCP_0 es la probabilidad de control tumoral que estimaremos en las simulaciones y R es la fracción de tumores curados exclusivamente mediante la cirugía. Por ello, fijamos el mínimo número de clonógenos tras cirugía como $N_0^{\min} = 1$.

Por otra parte, la proporción de células clonogénicas en un tumor supone un 0.1 % del total de células que contiene, y el número de células para la detección clínica está en torno a $10^6 - 10^8$ [Tro94]. Por ello planteamos dos posibles escenarios: en el primero tomamos como límite superior del número de clonógenos tras cirugía $N_0^{\max} = 10^5$, y un límite para la detectabilidad clínica de 10^6 ; el segundo escenario consiste en suponer $N_0^{\max} = 10^7$ y un límite para la detectabilidad clínica de 10^8 . En los dos casos se considera que el tumor ha sido controlado tras el tratamiento si $N(t) = 0$ en algún momento.

Dado nuestro desconocimiento de la situación real en los tumores con que nos enfrentamos en la práctica clínica, estos dos escenarios permitirán comprobar si los resultados difieren mucho dependiendo de cuál de ellos se considere o, en otros términos, si nuestras simulaciones dependen críticamente de esta elección de parámetros o son robustas, en cuanto a las predicciones que nos permiten, con una relativa independencia del escenario elegido.

Para fijar el resto de parámetros, nos valdremos de resultados clínicos reales. A pesar de las importantes deficiencias de los estudios clínicos retrospectivos que ya se han señalado, y que no permiten obtener datos fiables sobre el efecto del tiempo en el resultado de la radioterapia, éstos pueden emplearse para obtener otros datos valiosos. En particular, aquí se utilizarán para determinar los valores adecuados de los parámetros que nos faltan para poder hacer simulaciones con sentido clínico. Se describe a continuación el modo en que esto puede llevarse a cabo.

Si disponemos de todos los datos que pueden recogerse de las historias clínicas de los pacientes sobre los que se hace un determinado estudio retrospectivo, podemos determinar las distribuciones reales de variables importantes para la respuesta de los tumores de esos pacientes a la radiación: dosis total, dosis por fracción, tiempo entre cirugía y radioterapia (o entre cualquier otro tratamiento y la radioterapia), interrupciones del tratamiento y momento en el que acontecen, y otras. Además conocemos la tasa de curaciones de esa muestra de pacientes en particular y, para los que no se han curado, la distribución de los tiempos en que se manifiesta el fracaso del tratamiento tras el fin de la radioterapia (aparición de la recidiva). Todas las causas de variabilidad pueden introducirse en las simulaciones directamente con las distribuciones determinadas en el análisis retrospectivo. De este modo, con la elección de los tamaños tumorales de partida que se ha explicado antes, trataremos de reproducir con la simulación el resultado clínico real observado, en cuanto a tasa de aparición de recidivas y porcentaje de control tumoral alcanzado. Para ello debemos probar con diferentes conjuntos de valores para los parámetros que aún no se han fijado: los de crecimiento y los de supervivencia. A este proceso podemos llamarlo “sintonización” de la simulación. Describimos en lo que sigue esta sintonización para un caso concreto.

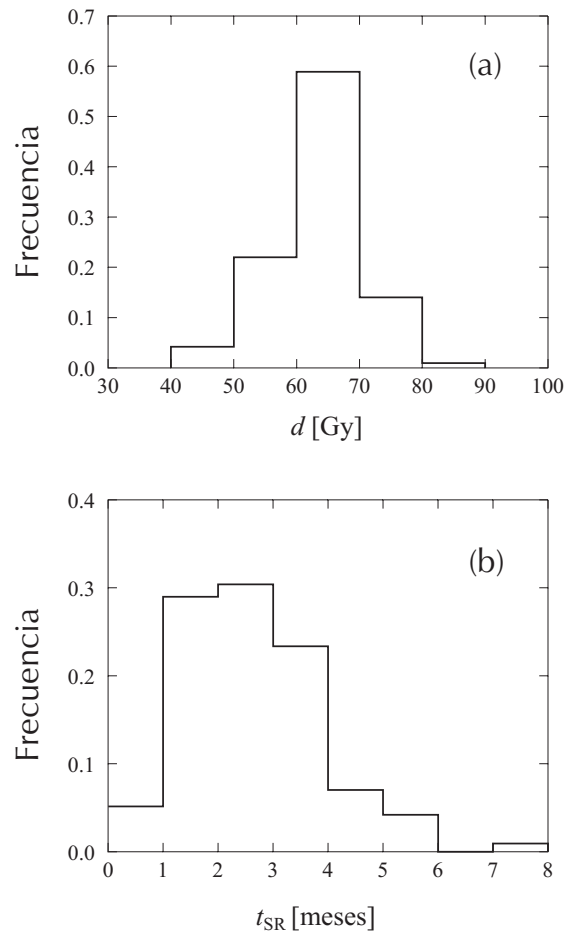


Figura 4.3: Distribuciones normalizadas de la dosis total (a) y del intervalo de tiempo entre cirugía y radioterapia (b) para la muestra de pacientes del estudio de Pedraza et al. [Ped01].

Partimos de un estudio sobre 214 pacientes con cáncer escamoso de cabeza y cuello tratados con radioterapia tras cirugía [Ped01]. En la figura 4.3a se muestra la distribución de la dosis en la población de pacientes considerada, mientras que en la figura 4.3b se muestra la distribución del tiempo entre cirugía y radioterapia, t_{SR} , para esos mismos pacientes. Otras causas de variabilidad en la muestra de pacientes no se han tenido en cuenta explícitamente en la simulación, como la dosis por fracción. Aunque el 51% de ellos se trataron con fracciones de 2 Gy, el 14% con fracciones de 1.8 Gy y el 35% restante con fracciones de 1.7 Gy, hemos considerado que la variabilidad estadística que ya contiene la fracción de supervivencia, que introduciremos más tarde, incluye tanto la variabilidad en la dosis por fracción como la heterogeneidad en la radiosensibilidad de los tumores de cada paciente.

En cuanto a los resultados de la terapia para este grupo de pacientes, en la figura 4.4 las líneas continuas representan la proporción de recidivas registrada clínicamente en el seguimiento de los pacientes que habían completado su tratamiento. Finalmente, Pedraza et al. [Ped01] indican un valor de la probabilidad de control a 5 años del $(72 \pm 3)\%$. Este tiempo de seguimiento se considera suficiente para determinar todos los posibles fracasos del tratamiento y, por consiguiente, la probabilidad de control tumoral total a la que da lugar.

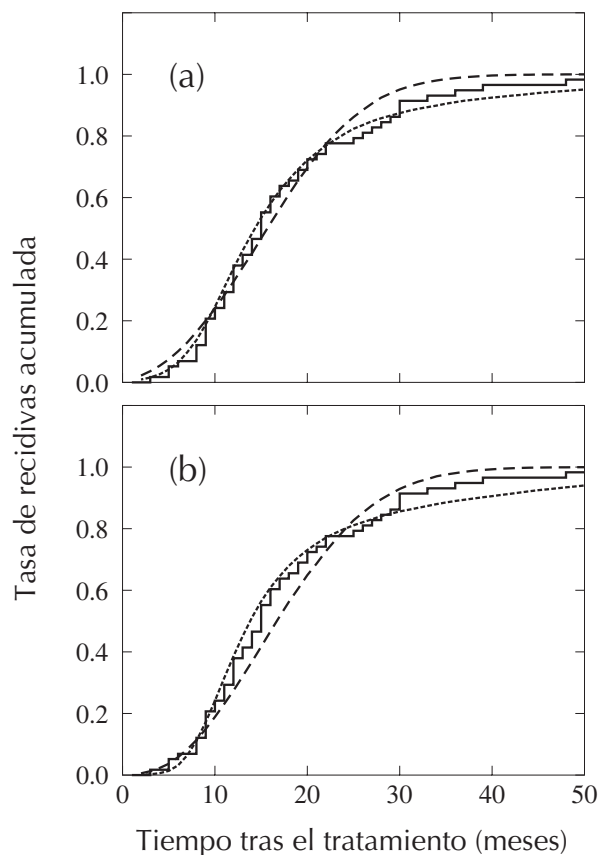


Figura 4.4: Tasa de aparición de recidivas acumulada para los pacientes del estudio de Pedraza et al. [Ped01]. Las líneas continuas muestran los resultados clínicos y las líneas de trazos (puntos) corresponden a los resultados de la simulación empleando el modelo de Gompertz (exponencial). En la gráfica (a) las simulaciones se han realizado con los parámetros G1 y E1 de la tabla 4.2, mientras que en la (b) los parámetros corresponden a G2 y E2.

La simulación consiste así en el seguimiento de 10^5 pacientes para cada uno de los cuales sorteamos, en primer lugar, el número de clonógenos tras cirugía. Después, de acuerdo con las distribuciones de la figura 4.3, determinamos la dosis total y el tiempo entre radioterapia y cirugía para ese paciente en particular². Por último tomamos valores posibles para los parámetros restantes según distribuciones gaussianas, como se ha explicado. El desarrollo de la simulación, para cada paciente, consiste en administrar 5 fracciones semanales de 2 Gy de lunes a viernes considerando los descansos por fin de semana, hasta completar la dosis total muestreada para ese paciente. Del conjunto de 10^5 pacientes se obtiene la probabilidad de control tumoral y la tasa de recidivas y se comparan con las del estudio clínico hasta dar con el mejor conjunto de parámetros para reproducirlas.

En la tabla 4.2 se muestran los resultados de la sintonización para los escenarios elegidos. En la figura 4.4 se comparan la curva de aparición de recidivas clínica con las resultantes de

²El muestreo para un histograma se hace en dos pasos, primero se sortea uno de los intervalos de la distribución de acuerdo con su peso relativo, después, dentro del intervalo resultante, se sortea según una distribución uniforme el valor final del parámetro. Hemos determinado que no existe correlación entre la dosis total y el tiempo de retraso, por lo que cada una de estas variables se sortea independientemente.

la simulación en los escenarios descritos. En (a) se muestran los resultados para los modelos de Gompertz G1 (línea de trazos) y exponencial E2 (línea de puntos) que corresponden al escenario 1 del número de clonógenos; en (b) se hace otro tanto para el escenario 2. Las incertidumbres en la simulación son menores del 3% y no se han dibujado para que los gráficos puedan verse con mayor claridad.

Tabla 4.2: Parámetros empleados en las simulaciones para reproducir los resultados del estudio clínico de Pedraza et al. [Ped01] y resultados que producen en términos de probabilidad de control tumoral global.

	$N_0^{\max} = 10^5, N_{\text{fallo}} = 10^6$		$N_0^{\max} = 10^7, N_{\text{fallo}} = 10^8$	
	G1	E1	G2	E2
$T_{D0} \pm \sigma_{T_D}$ (días)		33 ± 11		24 ± 10
$A_0 \pm \sigma_A$	25 ± 7		24 ± 5	
$a_0 \pm \sigma_a$ (días ⁻¹)	$(15 \pm 3) \times 10^{-4}$		$(30 \pm 6) \times 10^{-4}$	
$s_0 \pm \sigma_s$	0.520 ± 0.156	0.520 ± 0.156	0.450 ± 0.135	0.450 ± 0.135
TCP (%)	77.6 ± 0.1	77.3 ± 0.1	73.5 ± 0.1	74.0 ± 0.1

4.3. Resultados

Una vez que disponemos de una colección adecuada de parámetros para realizar las simulaciones, analizamos en primer lugar el efecto de la elección de uno u otro conjunto de los cuatro posibles en términos de probabilidad de control tumoral. Si se repiten las simulaciones del mismo modo en que se han hecho para el proceso de sintonización, pero ahora con una dosis total variable, podemos determinar las formas de las curvas de probabilidad de control acumuladas. En la figura 4.5a se muestran los resultados para el conjunto de parámetros G1 (cuadrados) y G2 (círculos). Para dosis totales iguales a las del estudio clínico (entre 60 y 80 Gy) los cálculos proporcionan una TCP semejante. En la figura 4.5b se representan las diferencias de TCP que producen, por una parte, los escenarios G1 y E1 (cuadrados) y, por otra, los escenarios G2 y E2 (círculos). Como apreciamos, estas diferencias son menores del 1% en el rango de dosis absorbidas terapéuticas.

Un aspecto destacable que nos muestra la figura 4.5 es el “efecto plateau” para altas dosis absorbidas (mayores de 80 Gy). Esto indica que una proporción relevante de tumores crece de manera tan rápida, que la proliferación no puede ser compensada por el efecto de la radiación. Mientras que el crecimiento de la TCP obtenido cuando la dosis total se aumenta de 60 a 70 Gy está entre el 7 y el 10%, esta mejora sólo llega al 5% cuando pasamos de 70 a 80 Gy. La posibilidad de que este fenómeno exista ha sido indicada por otros autores [Suw99]; aunque podría tratarse de un efecto espurio de las simulaciones, debido a una limitación insuficiente del tiempo mínimo de duplicación, nos alerta sobre la posibilidad de que para determinados tumores el aumento de la dosis total sea ineficaz. Esto supondría la superación de un tópico y lugar común de la radioterapia: si las dosis pudiesen incrementarse lo suficiente los tumores se curarían en todos los casos.

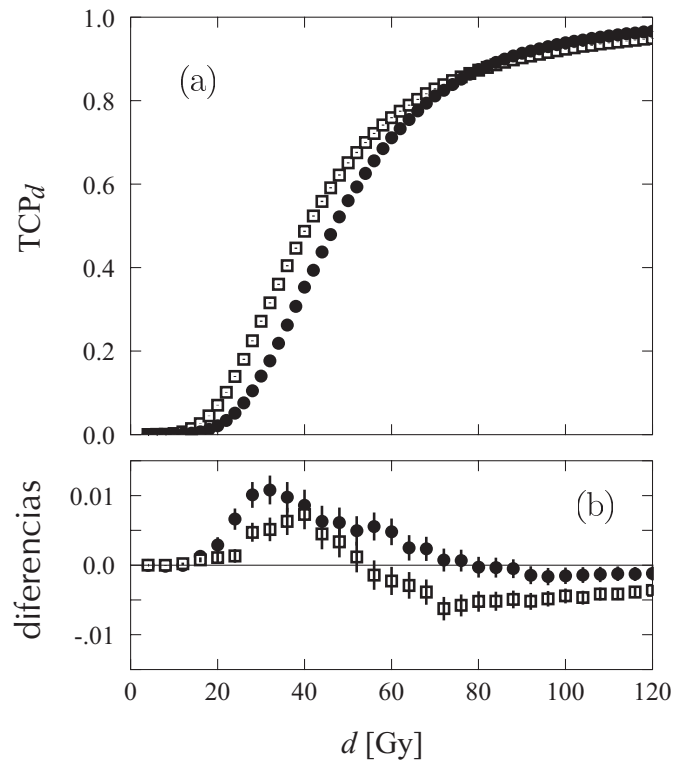


Figura 4.5: (a) Probabilidad de control tumoral en función de la dosis total obtenida mediante los parámetros G1 (\square) y G2 (\bullet). (b) Diferencias entre los resultados obtenidos mediante G1 y E1 (\square) y mediante G2 y E2 (\bullet). Las incertidumbres de los resultados de la simulación en (a) son menores que los símbolos empleados para representarlos.

4.3.1. Demora en el inicio de la radioterapia

Ahora, como primer paso en el estudio del efecto del tiempo entre cirugía y radioterapia sobre la probabilidad de control, podemos examinar qué sucedería si no existiese demora alguna en el comienzo de los tratamientos. Para ello basta suprimir de las simulaciones la distribución de tiempos dada por la figura 4.3b y considerar este tiempo nulo en todos los casos. La figura 4.6 nos muestra los resultados para un crecimiento gobernado por el modelo de Gompertz; en (a) para los parámetros G1 y en (b) para los parámetros G2 de la tabla 4.2. En ambos casos los cuadrados corresponden a la muestra clínica, con la distribución completa para t_{SR} , y los círculos corresponden a un $t_{SR} = 0$ común a todos los tumores de la simulación. El efecto del intervalo de tiempo entre cirugía y radioterapia para una dosis total de 60 Gy es una disminución del 6-7 % en la TCP que podría haberse conseguido de no existir retraso alguno para la radioterapia; esta pérdida en la probabilidad de control se compensaría mediante un aumento de 10 Gy en la dosis total.

Para estudiar con más profundidad el efecto de la demora en el comienzo de la radioterapia, se hace una simulación en la que se eliminan causas de variabilidad que no interesan a esta investigación: el propio tiempo de retraso y la dosis total. De este modo, tomamos un esquema de 60 Gy para todos los tumores y realizamos un conjunto de simulaciones para tiempos de retraso que van desde 0 a 150 días. La probabilidad de control tumoral resultante, TCP_{60Gy} , se muestra en la figura 4.7a para G1 (cuadrados), G2 (círculos), E1

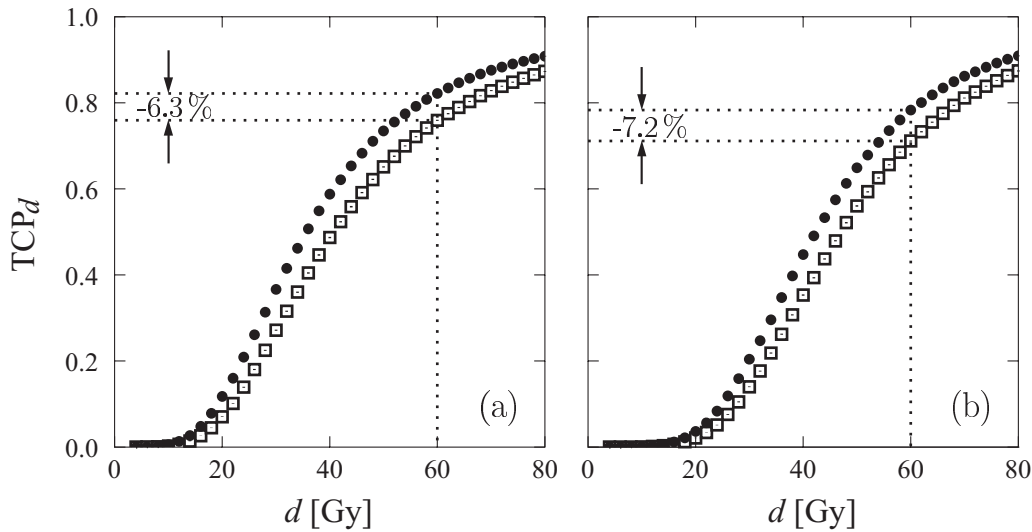


Figura 4.6: Probabilidad de control tumoral en función de la dosis absorbida total obtenida con los conjuntos de parámetros G1 (a) y G2 (b) considerando en la simulación la distribución de intervalos de espera entre cirugía y radioterapia de la figura 4.3a (\square), o suponiendo que ningún paciente sufre retraso entre cirugía y radioterapia (\bullet). También se muestra la reducción de control tumoral para una dosis de 60 Gy que produce el retraso. Las incertidumbres son en todos los casos menores que los símbolos empleados para representar los datos.

(línea continua) y E2 (línea de trazos). En general TCP_{60Gy} disminuye linealmente cuando t_{SR} aumenta. El ajuste de estos resultados para $t_{SR} \leq 100$ días a una recta dada por $TCP_{60Gy} = \tau t_{SR} + TCP_{60Gy}(0)$ se muestra en la tabla 4.3. Las pendientes determinadas en todos los escenarios son prácticamente iguales y suponen una reducción de la probabilidad de control tumoral entre el 0.08 y el 0.1 % por día de retraso.

En su estudio clínico Pedraza et al. [Ped01] obtienen que el control local para el grupo de pacientes con demoras entre la cirugía y la radioterapia menores y mayores de 50 días son del $83 \pm 7\%$ y del $68 \pm 7\%$ respectivamente. En la tabla 4.3 se muestran los valores medios de la TCP resultantes de la simulación para tiempos menores de 50 días y entre 50 y 150 días para todos los escenarios; estos valores están en buen acuerdo con los datos del estudio clínico.

Finalmente, las simulaciones permiten determinar la dosis extra necesaria para compensar el efecto de la repoblación tumoral entre la cirugía y la radioterapia; esto es, el factor tiempo que se definió en el apartado 4.1.2. Los resultados se muestran en la figura 4.7b, en la que se ha dibujado el aumento de dosis necesario, Δd , para alcanzar la probabilidad de control obtenida para 60 Gy en el caso en que $t_{SR} = 0$. Los símbolos y líneas tienen el mismo significado que en la figura 4.7a. Para determinar el factor tiempo, f_t , se ha realizado un ajuste lineal para $t_{SR} \leq 150$ días, con $\Delta d(t_{SR}) = f_t t_{SR}$. El factor tiempo determinado está entre 0.09 y 0.13 Gy/día. Por tanto, el efecto del tiempo entre cirugía y radioterapia es moderado en comparación con el que tienen las interrupciones para los cánceres de cabeza y cuello (véase la tabla 4.1). Dicho de otro modo, por cada 10 días de retraso es preciso aumentar la dosis total 1 Gy para compensar la proliferación tumoral en ese tiempo.

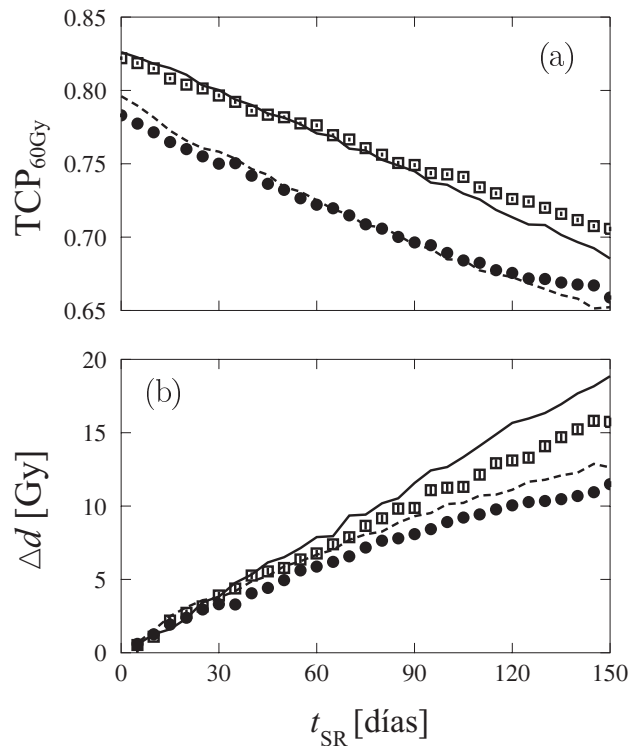


Figura 4.7: (a) Efecto del intervalo de tiempo entre cirugía y radioterapia sobre la probabilidad de control tumoral. Las simulaciones se realizan considerando una dosis total de 60 Gy en todos los escenarios: G1 (\square), E1 (línea continua), G2 (\bullet) y E2 (línea de trazos). (b) Aumento de la dosis total necesario para alcanzar la misma TCP que se hubiese obtenido de no existir retraso alguno; los símbolos y curvas se corresponden con los mismos escenarios que en la gráfica (a). Las incertidumbres en las líneas son menores del 3% y no se han dibujado por claridad. Las incertidumbres para los datos representados mediante los símbolos son más pequeñas que éstos.

Nótese el cambio de notación realizado para indicar el factor tiempo. En la ecuación (4.4) escribíamos κ para designar al factor tiempo que aparece en la expresión de isoeffecto, mientras que ahora hemos utilizado la notación f_t ; ambos factores son diferentes, como se indica en la tabla 4.1, y para pasar del segundo al primero debe multiplicarse por $[1 + 2/(\alpha/\beta)]$, donde α/β corresponde al tumor considerado. Naturalmente esto se debe a que κ se refiere a la variación de la DBE por cada día de aumento del tiempo total de tratamiento, mientras que f_t se refiere a la variación de la dosis absorbida en un esquema de 2 Gy por fracción. En general, para un factor tiempo importante, debido a una intensa proliferación tumoral, el valor de α/β es elevado (de 10 a 15 Gy) [Van09] y, en consecuencia, la diferencia entre κ y f_t pequeña; más, si cabe, teniendo en cuenta la gran incertidumbre asociada a la determinación del factor tiempo.

Tabla 4.3: Valores obtenidos para los ajustes de la relación $TCP_{60Gy} = \tau t_{SR} + TCP_{60Gy}(0)$, valores medios de TCP para $t_{SR} \leq 50$ días y para $50 \text{ días} \leq t_{SR} \leq 150$ días y factor tiempo determinado para la demora entre cirugía y radioterapia. Los números entre paréntesis indican la incertidumbre en la última cifra significativa, esto es, 0.094(1) significa 0.094 ± 0.001 .

	Gompertz		Exponencial	
	G1	G2	E1	E2
τ (% días ⁻¹)	-0.081(1)	-0.093(1)	-0.0928(9)	-0.108(2)
$TCP_{60Gy}(0)$ (%)	82.13(6)	77.99(8)	82.74(5)	79.1(1)
$\overline{TCP}(t_{SR} \leq 50 \text{ días})$ (%)	80.08(4)	75.66(4)	80.41(4)	76.37(4)
$\overline{TCP}(50 \text{ días} < t_{SR} \leq 150 \text{ días})$ (%)	74.04(3)	69.01(3)	73.17(3)	68.71(3)
f_t (Gy días ⁻¹)	0.116(1)	0.094(1)	0.128(1)	0.108(2)

4.3.2. Otro estudio retrospectivo

Aplicaremos ahora los métodos expuestos al análisis de los resultados de un estudio retrospectivo que podría considerarse amplio en cuanto al número de pacientes que incluye. Se trata del trabajo publicado por Suwinski y sus colaboradores en 2003 [Suw03], en el que examinan el efecto del tiempo en una muestra de 868 pacientes con cánceres de cabeza y cuello (laringe, cavidad oral, orofaringe e hipofaringe) que siguen un programa de radioterapia tras cirugía y que no han recibido quimioterapia.

De acuerdo con los procedimientos descritos, emplearemos los datos de cinética celular deducidos del estudio de Pedraza et al. para un determinado escenario del número de clonógenos inicial, e introduciremos en las simulaciones las distribuciones observadas en la muestra de pacientes de Suwinski et al. para las siguientes variables: tiempo de retraso entre la cirugía y la radioterapia, dosis total administrada en la radioterapia y paradas que se producen a lo largo del tratamiento. Esa última causa de variabilidad no se tenía en cuenta en el estudio de Pedraza et al. ya que no disponíamos de datos al respecto.

En la figura 4.8 se muestran las distribuciones para el tiempo de retraso entre cirugía y radioterapia y para el número de paradas a lo largo del tratamiento. El 70 % de los pacientes paran al menos una vez y la duración media de esta parada es de 4.8 días. La distribución del momento de la parada a lo largo del tratamiento es prácticamente uniforme en la muestra clínica; así, durante 6 semanas de tratamiento, el porcentaje de las paradas es: semana 1, 15 %; semana 2, 16 %; semana 3, 15 %; semana 4, 18 %; semana 5, 17 %; semana 6, 13 %; resto, 6 %. De este modo se considera en las simulaciones.

En lugar de hacer una simulación con muchos pacientes realizaremos varias con 868 pacientes, distribuidos para cada tiempo de retraso como en la muestra empleada en el estudio clínico: menos de 30 días, 41; entre 30 y 60 días, 450; entre 61 y 90 días, 311; y más de 90 días, 66. El objetivo de esta forma de proceder es determinar la incertidumbre asociada a los resultados que puede ofrecernos el estudio retrospectivo que estamos analizando. Se han empleado los modelos de Gompertz y exponencial, con resultados muy parecidos, para los escenarios G1 y E1 (tabla 4.2). En la figura 4.9a se muestran los resultados de las simulaciones para el escenario G1.

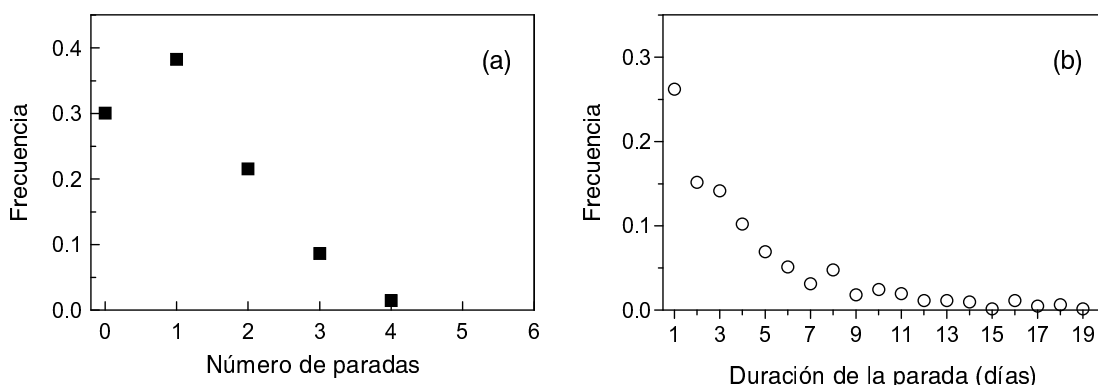


Figura 4.8: (a) Frecuencia del número de paradas en la muestra clínica de Suwinski et al. [Suw03]; para el 70% de los pacientes se interrumpe al menos una vez su tratamiento. (b) Distribución de la duración de las paradas en esta misma muestra de pacientes; la duración media de una parada es 4.8 días.

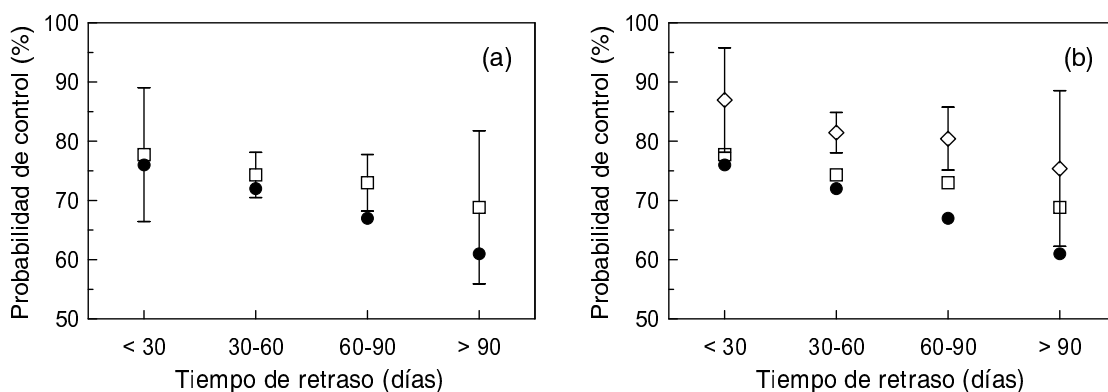


Figura 4.9: (a) Resultados de las simulaciones descritas para las demoras en el inicio de la radioterapia consideradas en el estudio de Suwinski et al [Suw03] (□) junto a los datos clínicos indicados por estos autores (●). (b) Resultados de la simulación cuando se eliminan las paradas durante el tratamiento (◇), cuando se tienen en cuenta (□) y datos clínicos (●). El estudio clínico no proporciona incertidumbres y las que corresponden a las simulaciones, que representan dos desviaciones típicas, se han determinado a partir de 15 simulaciones para cada tiempo de retraso con el mismo número de pacientes que incluye el estudio clínico.

El aspecto más destacable de estos resultados es la incertidumbre que cabe esperar de los datos obtenidos del estudio Suwinski et al., y que la simulación nos proporciona de un modo directo. El estudio clínico, que emplea los métodos usuales de la estadística para estos casos, no puede realizar una estimación adecuada de las incertidumbres asociadas a estos datos, y por eso los autores no las muestran en su trabajo. A pesar de que 868 pacientes puede parecer un número suficiente para un estudio clínico, la simulación demuestra que es pequeño para conocer el efecto de la demora sobre el efecto de la radioterapia: habida cuenta de las incertidumbres que cabe esperar, son posibles conjuntos de datos que muestren desde un efecto nulo hasta una importante influencia de la demora en la probabilidad de control. Esta es la razón de que unos estudios retrospectivos señalen una correlación entre la probabilidad de control tumoral y la espera para radioterapia, como el de Suwinski et al., mientras que otros no [Leo03].

A pesar de que los datos de cinética celular no se han deducido del estudio clínico de Suwinski et al., pues se han tomado del trabajo de Pedraza et al., el acuerdo entre los resultados de la simulación y los resultados clínicos es bueno para la probabilidad de control cuando el retraso en el comienzo de la radioterapia es menor o igual a 2 meses. En todos los casos la incertidumbre asociada a los datos hace compatibles los resultados de la simulación y del estudio clínico.

Como resultado preliminar de la aplicación de estos métodos al caso de las interrupciones de la radioterapia, en la figura 4.9b se muestran los datos de TCP tras efectuar las mismas simulaciones que antes cuando no hay paradas durante el tratamiento, de manera que todos los pacientes terminan su programa cuando está previsto. La diferencia en la probabilidad de control que se produce en esta situación es notable con respecto al caso en que las paradas tienen lugar, y supone entre el 6.5 y el 9.2% de variación absoluta en la TCP. Esta importante influencia de las interrupciones en el efecto final de la radioterapia para pacientes de cabeza y cuello, explica por qué ha sido indicada por los estudios retrospectivos a pesar de sus deficiencias.

4.4. Discusión

Si asumimos la hipótesis de que las células que es preciso eliminar para alcanzar la curación de un tumor son las clonogénicas, el control local en el tratamiento del cáncer depende de su completa erradicación. Para los métodos que hemos empleado, una vez que se han ajustado las características de proliferación y unos ciertos tamaños tumorales a los datos de un grupo de pacientes reales, el número de células residuales tras la radioterapia depende de la radiosensibilidad de los clonógenos, de la dosis total administrada y del esquema temporal del tratamiento empleado.

En primer lugar, hemos elegido una distribución uniforme para muestrear el número inicial de clonógenos, esta elección está motivada por la propia acción de la cirugía sobre el lecho tumoral: no es posible determinar cuántas células quedan en el tejido tras la operación y no es razonable suponer un valor en torno al cual se distribuya su número. Sin embargo, hemos ensayado otra distribución, la log-uniforme, ya empleada por Withers y sus colaboradores [Wit95] para describir el tamaño de las metástasis tumorales. Utilizando los mismos límites en el número de células considerado, N_0^{\min} y N_0^{\max} , no se obtienen diferencias apreciables en los valores de TCP resultantes.

Nuestros resultados muestran, como parecía razonable esperar, que un escenario en el que se suponen más clonógenos de partida precisa de una menor fracción de supervivencia para mantener la probabilidad de control tumoral (véase la tabla 4.2). No obstante, los valores para la fracción de supervivencia empleados aquí son semejantes a los indicados por otros autores [Mal86, Sta99].

El tiempo de duplicación es un parámetro clave en el efecto del tiempo total sobre el resultado de la terapia. Sin embargo, no existen buenos datos para los tumores humanos, debido a la imposibilidad de efectuar series de medidas para pacientes concretos dejando crecer los tumores sin realizar acción terapéutica alguna. De los estudios disponibles, que son bastante antiguos, se deduce que el tiempo de duplicación varía mucho de unos pacientes a otros, incluso para una misma estirpe histológica, y la distribución puede tomarse, una vez más, como lognormal [Spr64, Ste67, Ker84]. Tenemos así un tiempo medio de duplicación para cánceres primarios de pulmón de 82 días, y de 58 días para metástasis de cánceres escamosos de pulmón. Mackillop et al. [Mac95], en un estudio sobre el efecto del retraso en el inicio de la radioterapia mediante Monte Carlo, emplearon un rango para los tiempos de duplicación entre 5 y 180 días.

En nuestras simulaciones, cualquiera que sea el modelo de crecimiento empleado, los valores para T_D son significativamente menores que los valores medios mencionados (tabla 4.2). En el caso del modelo exponencial se obtienen valores de 33 ó 24 días para reproducir los resultados clínicos. En el caso del modelo de Gompertz, los valores de T_D siguen distribuciones asimétricas de media 39 ó 35 días y de moda 25 ó 19 días, respectivamente.

Para el modelo de Gompertz T_D varía con el número de clonógenos y, aunque esto nos hacía suponer que podría ser más flexible que el modelo exponencial para reproducir el crecimiento de los tumores reales, no hay diferencias apreciables entre ambos modelos respecto de su capacidad para describir los datos clínicos del estudio analizado.

Hemos obtenido una pérdida del 0.09 % de TCP por día o, equivalentemente, un factor tiempo de 0.11 Gy/día para el intervalo de tiempo entre cirugía y radioterapia. Se trata de valores un orden de magnitud menores que los determinados para el efecto de las interrupciones en el mismo tipo de cánceres (véase la tabla 4.1), que pueden estar en torno a 1 Gy/día. Esta es la razón por la cual los estudios clínicos retrospectivos han mostrado una influencia de las interrupciones sobre la probabilidad de control, mientras que arrojan resultados contradictorios para la influencia del retraso en el inicio de la terapia. El efecto de la demora es pequeño y la incertidumbre asociada a los resultados muy grande, por lo que sólo el empleo de métodos como los presentados aquí permiten una visión adecuada del problema.

Agradecimientos

Agradecemos a Rafal Suwinski el habernos facilitado los datos de su trabajo [Suw03]; con ellos hemos realizado el análisis preliminar que se ha mostrado en el apartado 4.3.2. También a Xavier León el haber compartido los datos clínicos de su estudio [Leo03]; aunque no los hemos empleado aquí, su examen nos ha dado algunas pistas sobre el camino a seguir.

4.5. Recapitulación

Hemos reunido en este capítulo varios de los elementos desarrollados en los precedentes para ampliar nuestros conocimientos sobre el efecto de las demoras y la interrupciones de la radioterapia en la efectividad de los tratamientos.

En general, pueden definirse tres períodos de tiempo importantes en la radioterapia del cáncer: uno inicial que va desde el diagnóstico o el final de cualquier otra forma de terapia previa (como cirugía o quimioterapia) hasta el comienzo de la radioterapia propiamente dicha; un segundo período que abarca la duración de un tratamiento fraccionado, que se administra con una cierta cadencia de irradiaciones de muy corta duración y descansos entre ellas; y, finalmente, un período de seguimiento en el que, si el tratamiento no ha sido efectivo, se producirá la recaída del paciente.

Si definimos una cierta distribución de tamaños tumorales posibles al inicio de la terapia, y utilizamos los modelos de crecimiento y supervivencia celular descritos en el capítulo 2, puede reproducirse virtualmente la evolución del número de células de un tumor y determinarse si el tratamiento tiene éxito, lo que significa la eliminación de todos los clonógenos de ese tumor (los que tenía inicialmente y los que han ido apareciendo como consecuencia de la proliferación). De este modo puede generarse una colección de tumores, que harán las veces de pacientes virtuales, mediante la introducción de distribuciones de probabilidad adecuadas para las variables relevantes en este problema.

Si deseamos que esta forma de reproducir en el ordenador un tratamiento de radioterapia nos preste servicios útiles, es preciso que los valores de los parámetros relevantes de la simulación se escojan adecuadamente. Partiendo de los estudios clínicos retrospectivos sobre el resultado de la radioterapia fraccionada, necesariamente insuficientes por sus importantes limitaciones, puede obtenerse información muy valiosa sobre las distribuciones de probabilidad de las variables que nos interesan, entre otras: dosis absorbidas, tiempos de retraso e interrupciones y su duración. Del seguimiento a largo plazo de los pacientes se obtiene la tasa de recidiva local de la enfermedad y la efectividad global del tratamiento. Así, aunque algunas variables importantes para la simulación (y sus variabilidades), como el número de clonógenos inicial, deban elegirse a partir de un presupuesto razonable, otras, como los parámetros del modelo de crecimiento empleado y la supervivencia celular (y sus variabilidades), una vez fijado ese escenario de carga tumoral, tendrán que reproducir los datos de la clínica.

Si hemos sido capaces de reproducir los resultados de algunos estudios clínicos concretos, podemos eliminar de las simulaciones todas las causas de variabilidad que no nos interesen, y hacer que todo cambio provenga de la variable que nos preocupa como objeto del estudio: las demoras, las interrupciones, el cambio de fraccionamiento, la aceleración de los programas y otras.

En el caso de las demoras en el inicio de los tratamientos, que se relacionan inmediatamente con la existencia de listas de espera, todavía no tenemos suficientes evidencias, ni siquiera en el caso de los tumores altamente proliferantes como los de cabeza y cuello, de que exista un factor tiempo; mucho menos, por tanto, del valor de este factor tiempo. Los métodos que hemos desarrollado permiten superar las limitaciones de las herramientas de que disponemos ahora para analizar esta cuestión, que se sustentan en el análisis estadístico de los datos de calidad limitada que aportan los estudios retrospectivos. Análisis

estadístico que, además, se transforma en objeto de nuestras investigaciones, con la idea de contribuir a establecer el mejor modo de obtener la información contenida en los datos que arrojan los ya mencionados estudios clínicos retrospectivos, y aspectos tan básicos como el número de pacientes que han de considerarse en uno de tales estudios para garantizar la validez de las conclusiones a que den lugar.

Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas

5.1. Conclusión general

En esta memoria se han presentado cuatro problemas de la radiobiología en los cuales la consideración de la variabilidad como un elemento específico y fundamental es la clave para abordarlos de manera adecuada. En algunos casos esto consiste en el uso de una herramienta de análisis que la incluya, en otros la variabilidad se integra en el modelo biológico que describe el fenómeno estudiado.

Primero, tras determinar la forma general que tiene la distribución de probabilidad de la respuesta de distintos pacientes a la radioterapia, en lo que se refiere a los efectos secundarios que este modo de tratamiento les produce, la utilización del método Monte Carlo permite estimar la ganancia terapéutica que cabe esperar de un programa de individuación de las dosis. Esta estimación, además de proporcionar datos del aumento medio en la probabilidad de control tumoral de la población de pacientes, como hacen los procedimientos usuales del análisis, nos permite conocer cómo se distribuye la ganancia terapéutica en esa población.

En el caso del examen del crecimiento de esferoides multicelulares, la consideración de la variabilidad en la forma de crecimiento de cada uno de los agregados que constituyen la muestra bajo estudio, permite elaborar un método de análisis del efecto de la radiación que produce una incertidumbre menor que la asociada a los métodos empleados hasta ahora.

En tercer lugar, al estudiar la hipersensibilidad a baja dosis, la suposición de que las diferentes células que componen el cultivo irradiado activan el mecanismo de reparación inducida a dosis absorbidas diferentes y, por tanto, la asunción de una distribución de probabilidad para la dosis crítica para la estimulación de la reparación, permite formular un modelo de supervivencia fiel a la explicación biológica comúnmente aceptada para este fenómeno; lo hemos llamado *modelo de inducción variable de la reparación* (VIR).

Por último, para tratar el efecto de las demoras y las interrupciones sobre la efectividad de la radioterapia fraccionada, pueden utilizarse herramientas de simulación Monte Carlo en las que se consideran explícitamente las distribuciones de las variables relevantes para este problema. Su empleo permite, habida cuenta de las limitaciones éticas que impiden ejecutar estudios de corte aleatoria con pacientes reales, obtener una información inaccesible a los estudios clínicos retrospectivos que sí pueden realizarse.

5.2. Conclusiones particulares

- (1) Existe una importante variabilidad en el daño que produce la radiación sobre el ADN de los linfocitos de diferentes individuos. Esta variabilidad puede describirse mediante una distribución lognormal, que es también la distribución que cabe esperar para la respuesta de los tejidos sanos de diferentes pacientes. Partiendo de esta distribución, las estimaciones que hemos realizado sobre la mejora que cabe esperar de un programa de individuación de las dosis totales, indican un aumento significativo de la probabilidad de control tumoral.
- (2) El modelo de Gompertz es adecuado para describir las curvas de crecimiento de los esferoides multicelulares de la línea humana MCF-7 de cáncer de mama. El seguimiento de cada esferoide individualmente, la normalización de las curvas de crecimiento a un volumen inicial común y la suposición de que, tras la irradiación, los esferoides están formados por células muertas y células supervivientes, permiten obtener la fracción de supervivencia a partir de la evolución del volumen del agregado. Este método supone una perturbación mínima del sistema experimental y, por tanto, la disminución de las incertidumbres asociadas al ensayo de recrecimiento clásico.
- (3) La supervivencia obtenida mediante el ensayo de recrecimiento para las células de la línea MCF-7 cuando crecen en forma de esferoides multicelulares, es comparable a la de otros métodos para dosis por debajo de 3 Gy. Las células MCF-7 son más resistentes cuando se organizan como esferoides que cuando crecen en monocapa, lo que indica una importante influencia de la estructura tridimensional del cultivo y de los contactos celulares en la respuesta de los tumores a la radiación.
- (4) La radiación afecta al crecimiento de los esferoides de la línea MCF-7 de manera tanto más importante cuanto mayor es la dosis que se les administra. Por tanto, no es correcta la suposición común de que el ritmo de crecimiento de estos agregados se recupera un tiempo después de la irradiación, al menos para períodos de una duración semejante a la de los esquemas de la radioterapia fraccionada comunes en la práctica clínica.
- (5) Los esferoides multicelulares de la línea humana MCF-7 de cáncer de mama, clon BB, exhiben hipersensibilidad a baja dosis. La curva de supervivencia de estos esferoides se describe adecuadamente mediante el modelo VIR y la dosis para la estimulación de la reparación, que sigue una distribución lognormal, tiene un valor medio en este caso de 0.5 Gy.
- (6) Es posible realizar simulaciones Monte Carlo para describir la respuesta de los tumores de un grupo de pacientes sometidos a radioterapia fraccionada. Estas simulaciones se basan en los datos de cinética y respuesta celular a la radiación que pueden obtenerse de los estudios clínicos y tienen la capacidad de reproducir sus resultados.
- (7) La simulación Monte Carlo de los tratamientos de radioterapia fraccionada es una herramienta de análisis estadístico efectiva. Nos permite estimar la incertidumbre asociada a los estudios clínicos retrospectivos, elevada incluso en el caso de muestras con un gran número de pacientes, y nos proporciona datos inaccesibles para nosotros si se emplean las herramientas estadísticas convencionales.

5.3. Perspectivas

Presentamos en lo que sigue algunas de las posibles continuaciones de este trabajo, que aparecen de manera natural tras el desarrollo de los capítulos precedentes.

El esclarecimiento de la existencia de hipersensibilidad a bajas dosis para los tejidos humanos, tumorales y sanos, puede tener una importante influencia en la radioterapia del cáncer; en particular, para determinados esquemas de fraccionamiento con dosis por fracción menores de 1 Gy. El modelo VIR que hemos desarrollado para describir este fenómeno puede ser útil en el cálculo del efecto final de estos esquemas de fraccionamiento. Además, proporciona información sobre la distribución de la dosis crítica para la estimulación de la reparación, lo que permitirá estudiar si la limitación de la variabilidad en este parámetro afecta a la forma de la curva de supervivencia mediante el control de las condiciones experimentales que determinan esta variabilidad: por la sincronización de las células en el ciclo reproductivo, la influencia de sustancias con actividad hormonal, etc.

Por otra parte, la estructura que se observa en la curva de supervivencia celular entre 0 y 1 Gy puede darse en otras regiones de dosis, por lo que serían posibles diversos mecanismos de reparación que se activasen a umbrales de dosis distintos. Además, los valores de supervivencia observados en esferoides multicelulares para las dosis más bajas son mayores de lo esperado. No sabemos si se trata de un efecto espurio de los experimentos o de un indicio de algo más sustancial. Mediante el ensayo de recrecimiento de esferoides multicelulares es posible estudiar con más detalle estas dos posibilidades.

Aunque el empuje de la evolución tecnológica y la presión de la industria lleven a pensar lo contrario, los avances en radioterapia no provienen sólo del aumento de los nuevos desarrollos en equipos e infraestructuras; pueden mejorarse los resultados de los tratamientos mediante la aplicación de planes de calidad y de actuaciones que requieren pequeñas inversiones. Creemos que este es el caso si se aplica una gestión adecuada de los tiempos en la radioterapia fraccionada del cáncer, considerando explícitamente en los planes de calidad la incidencia de las interrupciones y las demoras, cuya influencia podemos determinar con mayor precisión mediante las herramientas que hemos desarrollado aquí.

Para aquellos tumores en los que la proliferación sea importante, el conocimiento preciso del factor tiempo asociado a la interrupción de los tratamientos ha de tener una repercusión inmediata sobre la política para la gestión de estas interrupciones. Debido a los programas de mantenimiento y a las averías de las unidades de irradiación, a las reacciones intensas de los tejidos de respuesta rápida y a otros imprevistos que pueden ocasionar una interrupción del esquema terapéutico programado, es preciso establecer procedimientos concretos para compensar la pérdida de probabilidad de control tumoral a que puede dar lugar un aumento del tiempo total de tratamiento. Por ello, es importante conocer si para una cierto tipo de tumor el factor tiempo es relevante y, si lo es, su valor con una incertidumbre adecuada.

Por último, los métodos de simulación que hemos mostrado nos permitirán analizar los beneficios terapéuticos que cabe esperar de diferentes esquemas de tratamiento, en particular de los esquemas acelerados, antes de que sean llevados a la práctica clínica. Disponemos de este modo de una herramienta que supondrá una piedra de toque en la que probar un determinado esquema de fraccionamiento antes de que se constituya en materia de un ensayo clínico aleatorio, y que puede aumentar las garantías de éxito minimizando

los posibles perjuicios que podrían ocasionarse a los pacientes que participasen en los ensayos prospectivos.

Estos procedimientos hacen acopio de los métodos y hallazgos expuestos, concertando el leitmotiv de esta memoria con la mejora de la práctica clínica mediante el control del procedimiento radioterápico. Y fue un deseo de mejora el que alentó el trabajo resumido aquí, que debemos completar en los aspectos mencionados.

Por lo demás, no quiero hablar aquí particularmente de los progresos que espero realizar más adelante en las ciencias, ni comprometerme con el público, prometiéndole cosas que no esté seguro de cumplir; pero diré tan sólo que he resuelto emplear el tiempo que me quede de vida en procurar adquirir algún conocimiento de la naturaleza, que sea tal que se puedan derivar para la medicina reglas más seguras que las hasta hoy usadas, y que mi inclinación me aparte con tanta fuerza de cualesquiera otros designios, sobre todo de los que no pueden servir a unos sin dañar a otros, que si algunas circunstancias me constriñen a entrar en ellos, creo que no sería capaz de llevarlos a buen término.

René Descartes.
Discurso del método, 1637.

Bibliografía

- [Agu07] Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gómez JA, Martín-Oliva D, Peralta A, Valenzuela MT, Martínez-Romero R, et al. Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol Biol* 2007;8:29.
- [Alb89] Albright N. A Markov formulation of the repair-misrepair model of cell survival. *Radiat Res* 1989;118:1-20.
- [Ald01] Al-Dweri FMO, Guirado D, Lallena AM. Simulación de programas fraccionados de radioterapia. estudio del control tumoral y del efecto de la interrupción del tratamiento. *Rev Fis Med* 2001;2:17-20.
- [Ald04] Al-Dweri FMO, Guirado D, Lallena AM, Pedraza V. Effect on tumour control of time interval between surgery and postoperative radiotherapy: an empirical approach using Monte Carlo simulation. *Phys Med Biol* 2004;49:2827-39.
- [Ang92] Ang KK, Jiang GL, Guttenberger R, Thames HD, Stephens LC, Smith CD, et al. Impact of spinal cord repair kinetics on the practice of altered fractionation schedules. *Radiother Oncol* 1992;25:287-94.
- [Ang97] Ang KK. Accelerated fractionation: what is the price for speeding? *Radiother Oncol* 1997;44:97-9.
- [Ara03] Aranda M. Los esferoides multicelulares como test predictivo de radiosensibilidad y radiocurabilidad tumoral. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Departamento de Radiología y Medicina Física. Granada 2003.
- [Bar00] Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2000;55:179-86.
- [Bar82] Barendsen GW. Dose fractionation, dose-rate and isoeffect relationships for normal tissue responses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8:1981-97.
- [Bar92] Barton MB, Keane TJ, Gadalla T, Maki E. The effect of treatment time and treatment interruption on tumour control following radical radiotherapy of laryngeal cancer. *Radiother Oncol* 1992;23:137-43.
- [Bau10] Baujat B, Bourhis J, Blanchard P, Overgaard J, Ang KK, Saunders M, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy for head and neck cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010;12:CD002026.

- [Bau02] Baumann M, Saunders MI, Joiner MC. Modified fractionation. En: Basic clinical radiobiology. Tercera edición. Editado por Steel GG. Londres: Arnold 2002;147-57.
- [Bau08] Baumann M, Krause M, Hill R. Clonogens and cancer stem cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8:990.
- [Bed73] Bedford JS, Mitchell JB. Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat Res* 1973;54:316-27.
- [Beg93] Begg AC, Russell NS, Knaken H, Lebesque JV. Lack of correlation of human fibroblast radiosensitivity in vitro with early skin reactions in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1993;64:393-405.
- [Ben91a] Bentzen SM, Thames HD. Clinical evidence for tumor clonogen regeneration: interpretation of the data. *Radiother Oncol* 1991;22:161-6.
- [Ben91b] Bentzen SM, Johansen LV, Overgaard J, Thames HD. Clinical radiobiology of squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;20:1197-206.
- [Ben97] Bentzen SM. Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol* 1997;43:121-31.
- [Ben02] Bentzen SM. Dose-response relationships in radiotherapy. En: Basic clinical radiobiology. Tercera edición. Editado por Steel GG. Londres: Arnold 2002;94-104.
- [Ber04] Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 2004;4:737-47.
- [Ber60] Bertalanffy L, von. Principles and theory of growth. En: Fundamental aspects of normal and malignant growth. Editado por Nowinsky WW. Amsterdam: Elsevier 1960;137-42.
- [Bes05] Bese NS, Sut PA, Ober A. The effect of treatment interruptions in the postoperative irradiation of breast cancer. *Oncology* 2005;69:214-23.
- [Bes07] Bese NS, Hendry J, Jeremic B. Effects of prolongation of overall treatment time due to unplanned interruptions during radiotherapy of different tumor sites and practical methods for compensation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:654-61.
- [Bor02] Borgmann K, Röper B, El-Awady R, Brackrock S, Bigalke M, Dörk T, et al. Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol* 2002;64:141-52.
- [Bro95] Brock WA, Tucker SL, Geara FB, Turesson I, Wike J, Nyman J, et al. Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1371-9.
- [Buf01] Buffa FM, Davidson SE, Hunter RD, Nahum AE, West CM. Incorporating biologic measurements (SF(2), CFE) into tumour control probability model increases their prognostic significance: a study in cervical carcinoma treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:1113-22.

- [Byr95] Byrne HM, Chaplain MA. Growth of nonnecrotic tumors in the presence and absence of inhibitors. *Math Biosci* 1995;130:151-81.
- [Car00] Carlomagno F, Burnet NG, Turesson I, Nyman J, Peacock JH, Dunning AM, et al. Comparison of DNA repair protein expression and activities between human fibroblast cell lines with different radiosensitivities. *Int J Cancer* 2000;85:845-9.
- [Car84] Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. En: *Recent results in cancer research. Spheroids in cancer research*. Editado por Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland RM. Berlín: Springer-Verlag 1984;1-23.
- [Cha81] Chadwick KH, Leenhouts HP. *A molecular theory of radiation biology*. Berlín: Springer-Verlag 1981.
- [Cha02] Chandna S, Dwarakanath BS, Khaitan D, Mathew TL, Jain V. Low-dose radiation hypersensitivity in human tumor cell lines: effects of cell-cell contact and nutritional deprivation. *Radiat Res* 2002;157:516-25.
- [Cha95] Chappell R, Nondahl DM, Rezvani M, Fowler JF. Further analysis of radiobiological parameters from the first and second british institute of radiology randomized studies of larynx/pharynx radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:509-18.
- [Che00] Chen M, Jiang GL, Fu XL, Wang LJ, Qian H, Chen GY, et al. The impact of overall treatment time on outcomes in radiation therapy for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000;28:11-19.
- [Ciu87] Ciudad J. Generalización reparativa de los modelos clásicos de curvas de supervivencia celular en radiobiología. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Departamento de Medicina, Unidad Docente de Radiología y Medicina Física. Valencia 1987.
- [Ciu03] Ciudad J. El efecto de la tasa de dosis. En: *Radiobiología clínica*. Editado por Guirado D. Almería: Sociedad Española de Física Médica 2003;91-103.
- [Coh49] Cohen L. Clinical radiation dosage, part II. *Br J Radiol* 1949;22:706-13.
- [Con83] Conger AD, Ziskin MC. Growth of mammalian multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1983;43:556-60.
- [Cou32] Coutard H. Roentgentherapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx, and larynx from 1920 to 1926. *Am J Roentgenol* 1932;28:313-43.
- [Cox93] Cox JD, Pajak TF, Asbell S, Russell AH, Pederson J, Byhardt RW, et al. Interruptions of high-dose radiation therapy decrease long-term survival of favorable patients with unresectable non-small cell carcinoma of the lung: analysis of 1244 cases from 3 radiation therapy oncology group (RTOG) trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;27:493-8.
- [Cur86] Curtis SB. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation: a unified repair model. *Radiat Res* 1986;106:252-70.
- [Dal85] Dale RG. The application of the linear-quadratic dose-effect equation to fractionated and protracted radiotherapy. *Br J Radiol* 1985;58:515-28.

- [Dal02] Dale RG, Hendry JH, Jones B, Robertson AG, Deehan C, Sinclair JA. Practical methods for compensating for missed treatment days in radiotherapy, with particular reference to head and neck schedules. *Clin Oncol* 2002;14:382-93.
- [Dam08] D'Ambrosio DJ, Li T, Horwitz EM, Chen DY, Pollack A, Buyyounouski MK. Does treatment duration affect outcome after radiotherapy for prostate cancer? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:1402-7.
- [Dea84] Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 1984;2:317-23.
- [Del96] Del Regato JA. One hundred years of radiation oncology. En: *Current radiation oncology*, vol. 2. Editado por Tobias JS, Thomas PRM. Londres: Arnold 1996.
- [Den95] De Neve W, Lybeert MLM, Goor C, Crommelin MA, Ribot JG. Radiotherapy for T2 and T3 carcinoma of the bladder: the influence of overall treatment time. *Radiother Oncol* 1995;36:183-8.
- [Dic02] Dickson J, Magee B, Stewart A, West C. Relationship between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiation reactions: a comparison of training and validation cohorts of breast cancer patients. *Radiother Oncol* 2002;62:321-6.
- [Dik00] Dikomey E, Brammer I, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J. Relationship between DNA double strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblast derived from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:481-90.
- [Dou76] Douglas BG, Fowler JF. The effect of multiple small doses of X-rays on skin reactions in the mouse and a basic interpretation. *Radiat Res* 1976;66:401-26.
- [Dub97] Dubben HH, Röper B, Brackrock S. Is there sufficient evidence of hypersensitivity to low doses in radiotherapy? *Radiother Oncol* 1997;43:324-5.
- [Duc85] Düchting W, Vogelsaenger T. Recent progress in modelling and simulation of three-dimensional tumor growth and treatment. *Biosystems* 1985;18:79-91.
- [Duc89] Düchting W, Lehrig R, Rademacher G, Ulmer W. Computer simulation of clinical irradiation schemes applied to in vitro tumor spheroids. *Strahlenther Onkol* 1989;165:873-8.
- [Dur97] Durand RE. Tumor repopulation during radiotherapy: quantitation in two xenografted human tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;39:803-8.
- [Dur01] Durand R, Olive PL. Resistance of tumour cells to chemo and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumours and spheroids. *Method Cell Biol* 2001;64:211-29.
- [Elk60] Elkind MM, Sutton RM. Radiation response of mammalian cell grown in culture. 1. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1960;13:556-93.

- [Ell67] Ellis F. Fractionation in radiotherapy. En: *Modern trends in radiotherapy*, vol. 1. Editado por Deeley TJ, Poyser Wood CA. Londres: Butterworths 1967;34-51.
- [Err02] Erridge SC, Kerr GR, Downing D, Duncan W, Price A. The effect of overall treatment time on the survival and toxicity of radical radiotherapy for cervical carcinoma. *Radiother Oncol* 2002;63:59-66.
- [Fer81] Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumour radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981;7:621-9.
- [Fow89a] Fowler JF, Whitsed CA, Joiner MC. Repair kinetics in mouse lung: a fast component a 1.1 Gy per fraction. *Int J Radiat Biol* 1989;56:335-53.
- [Fow89b] Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol* 1989;62:679-94.
- [Fow91] Fowler JF. The phantom of tumor treatment-continually rapid proliferation unmasked. *Radiother Oncol* 1991;22:156-8.
- [Fow92] Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:457-67.
- [Fyl92] Fyles A, Keane TJ, Barton M, Simm J. The effect of treatment duration in the local control of cervix cancer. *Radiother Oncol* 1992;25:273-9.
- [Gar70] Gardner M. The fantastic combinations of John Conway's new solitaire game "Life". *Sci Am* 1970;223:120-3.
- [Gar11] Garvalov BK, Acker T. Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies. *J Mol Med (Berl)* 2011;89:95-107.
- [Gir93] Girinsky T, Rey A, Roche B, Haie C, Gerbaulet A, Randrianarivello H, et al. Overall treatment time in advanced cervical carcinomas: a critical parameter in treatment outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;27:1051-6.
- [Goo85] Goodhead DT. Saturable repair models of radiation action in mammalian cells. *Radiat Res* 1985;104:58-67.
- [Gre72] Greenspan HP. Models for the growth of a solid tumor by diffusion. *Stud Appl Math* 1972;51:317-38.
- [Gre74] Greenspan HP. On the self-inhibited growth of cell cultures. *Growth* 1974;38:81-95.
- [Gre76] Greenspan HP. On the growth and stability of cell cultures and solid tumors. *J Theor Biol* 1976;56:229-42.
- [Gui98] Guirado D, Guerrero R, López E, Vilches M, Valenzuela MT, Núñez MI, et al. Approach to the application of a predictive test of normal tissue response to radiation therapy. *Radiother Oncol* 1998;41(Suppl.1):S47.
- [Gui00] Guirado D, Vilches M. Estudio computarizado de la influencia de la proliferación y de la variación de la radiosensibilidad en un programa de radioterapia fraccionada. Efecto del tiempo total de tratamiento sobre el control tumoral. *Rev Oncología* 2000;2:42-50.

- [Gui01] Guirado D. Métodos computacionales en radiobiología. En: Avances en física médica 2001. Editado por Galán P, Góngora F, Carrasco JL, et al. Málaga: Fundación Carlos Haya 2001;182-232.
- [Gui03a] Guirado D. El tiempo en radioterapia fraccionada. En: Radiobiología clínica. Editado por Guirado D. Almería: Sociedad Española de Física Médica 2003;71-89.
- [Gui03b] Guirado D, Aranda M, Vilches M, Villalobos M, Lallena AM. Dose dependence of the growth rate of multicellular tumour spheroids after irradiation. *Br J Radiol* 2003;76:109-16.
- [Gui03c] Guirado D, Ruiz de Almodóvar JM. Prediction of normal tissue response and individualisation of doses in radiotherapy. *Phys Med Biol* 2003;48:3213-23.
- [Gui07] Guirado D. Relaciones dosis-respuesta en radioterapia. En: Principios de radiobiología clínica. Editado por Guerrero R, Guirado D, Vilches M. Ronda: Asociación Española de Técnicos en Radiología 2007;159-201.
- [Gui09] Guirado D, Navarro A, Wals A, Vilches M. Una perspectiva multidisciplinar del proceso de consentimiento informado en radioterapia. *Rev Fis Med* 2009;10:207-14.
- [Gui12] Guirado D, Aranda M, Ortiz M, Mesa JA, Zamora LI, Amaya E, et al. Low dose radiation hyper-radiosensitivity in multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol* 2012; en proceso de edición.
- [Hal06] Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. Sexta edición. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006.
- [Ham96] Hamilton CS, Denham JW, O'Brien M, Ostwald P, Kron T, Wright S, et al. Underprediction of human skin erythema at low doses per fraction by the linear quadratic model. *Radiother Oncol* 1996;40:23-30.
- [Han96] Hansen O, Gray C, Bentzen SM, Overgaard J. Repopulation in the SCCVII squamous cell carcinoma assessed by an in vivo-in vitro excision assay. *Radiother Oncol* 1996;39:137-44.
- [Har04a] Harney J, Short S, Shah N, Joiner MC, Saunders MI. Low dose hyper-radiosensitivity in metastatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:1190-5.
- [Har04b] Harney J, Shah N, Short S, Daley F, Groom N, Wilson GD, et al. The evaluation of low dose hyper-radiosensitivity in normal human skin. *Radiother Oncol* 2004;70:319-29.
- [Hen94] Hendry JH, Roberts SA, Slevin NJ, Keane TJ, Barton MB, Ågren-Conqvist A. Influence of radiotherapy treatment time on control or laryngeal cancer: comparisons between centres in Manchester, UK and Toronto, Canada. *Radiother Oncol* 1994;31:14-22.
- [Hen11] Henríquez-Hernández LA, Bordón E, Pinar B, Lloret M, Rodríguez-Gallego C, Lara PC. Prediction of normal tissue toxicity as part of the individualized treatment with radiotherapy in oncology patients. *Surg Oncol* 2011; doi:10.1016/j.suronc.2011.12.002.

- [Hil89] Hill SA, Denekamp J. An experimental study of tumour size and radiosensitivity: analysis by regrowth delay. *Radiother Oncol* 1989;15:39-48.
- [Hla94] Hlatky LR, Hahnfeldt P, Sachs RK. Influence of time-dependent stochastic heterogeneity on the radiation response of a cell population. *Math Biosci* 1994;122:201-20.
- [Hon06] Honoré HB, Bentzen SM. A modelling study of the potential influence of low dose hypersensitivity on radiation treatment planning. *Radiother Oncol* 2006;79:115-21.
- [Hor92] Horiot JC, Le Fur R, Guyen TN, Chenal C, Schraub S, Alfonsi S, et al. Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. *Radiother Oncol* 1992;25:231-41.
- [ISO92] ISO/IEC. Guide 98-3. Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995). International Organization for Standardization, International Electrotechnical Commission 1998.
- [Jac07] Jack RH, Davies EA, Robinson D, Sainsbury R, Møller H. Radiotherapy waiting times for women with breast cancer: a population-based cohort study. *BMC Cancer* 2007;7:71.
- [Jam08] James N, Williams M, Summers E. The management of interruptions to radiotherapy in head and neck cancer: an audit of the effectiveness of National Guidelines. *Clin Oncol* 2008;20:599-605.
- [Joh94] Johnson NL, Kotz S, Balakrishnan N. Continuous univariate distributions vol 1. Segunda edición. Nueva York: Wiley 1994.
- [Joi88] Joiner MC, Johns H. Renal damage in the mouse: the response to very small doses per fraction. *Radiat Res* 1988;114:385-98.
- [Joi01] Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:379-89.
- [Jun24] Jüngling O. Röntgenbehandlung chirurgischer Krankheiten: Zugleich Einführung in die physikalischen und biologischen Grundlagen der Röntgentherapie. Leipzig: S Hirzel 1924;237.
- [Kaj93] Kajanti M, Holsti LR, Holsti P, Möykkynen K. Effect of split-course radiotherapy on survival and local control in advanced localized prostatic carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:211-6.
- [Kaj95] Kajanti M, Kaleta R, Kankaanranta L, Muhonen T, Hosti L. Effect of overall treatment time on local control in radical radiotherapy for squamous cell carcinoma of esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1017-23.
- [Kal92] Källman P, Ågren A, Brahme A. Tumor and normal tissue responses to fractionated non-uniform dose delivery. *Int J Radiat Biol* 1992;23:249-62.
- [Kea94] Keane TJ. Limits to the analysis and interpretation of non-experimental clinical data. *Radiother Oncol* 1994;30:95-6.

- [Kel72] Kellerer AM, Rossi HH. The theory of dual radiation action. *Curr Top Radiat Res Q* 1972;8:85-158.
- [Ker84] Kerr KM, Lamb D. Actual growth rate and tumour cell proliferation in human pulmonary neoplasms. *Br J Cancer* 1984;50:343-9.
- [Kil99] Kiltie AE, Ryan AJ, Swindell R, Barber JB, West CM, Magee B, et al. A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Radiother Oncol* 1999;51:55-65.
- [Kir71] Kirk J, Gray WM, Watson ER. Cumulative radiation effect. Part I. Fractionated treatment regimes. *Clin Radiol* 1971;22:145-55.
- [Koc66] Koch AL. The logarithm in biology 1. Mechanisms generating the lognormal distribution exactly. *J Theoret Biol* 1966;12:276-90.
- [Koc69] Koch AL. The logarithm in biology 2. Distribution simulating the lognormal. *J Theoret Biol* 1969;23:251-68.
- [Kou96] Koukourakis M, Hlouverakis G, Kosma L, Skarlatos J, Damilakis J, Giatromanolaki A, et al. The impact of overall treatment time on the results of radiotherapy for nonsmall cell lung carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:315-22.
- [Kru92] Kruglikov IL. Modeling of the stochastic dynamics of radiation cell death: general approaches and some applications. *Radiat Res* 1992;130:26-30.
- [Lai64] Laird AK. The dynamics of tumour growth. *Br J Cancer* 1964;28:490-502.
- [Lal07] Lallena AM, Guirado D. Study of the time factor in fractionated radiotherapy by Monte Carlo methods. *Radiother Oncol* 2007;84(Suppl.1):S57-8.
- [Lam93] Lambin P, Marples B, Fertil B, Malaise EP, Joiner MC. Hypersensitivity of a human tumour cell line to very low radiation doses. *Int J Radiat Biol* 1993;63:639-50.
- [Lan93] Lanciano RM, Pajak TF, Martz KM, Hanks GE. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiations: a patterns-of-care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;25:391-7.
- [Lee95] Lee AW, Chan DK, Fowler JF, Poon YF, Foo W, Law SC, et al. Effect of time, dose and fractionation on local control of nasopharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol* 1995;36:24-31.
- [Leo03] León X, de Vega M, Orús C, Morán J, Vergés J, Quer M. The effect of waiting time on local control and survival in head and neck carcinoma patients treated with radiotherapy. *Radiother Oncol* 2003;66:277-81.
- [Leo07] Leonard BE. Thresholds and transitions for activation of cellular radioprotective mechanisms-correlations between HRS/IRR and the "inverse" dose-rate effect. *Int J Radiat Biol* 2007;83:479-89.
- [Lun98] Lundahl RE, Foote RL, Bonner JA, Suman VJ, Lewis JE, Kasperbauer JL, et al. Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: a matched-pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;40:529-34.

- [Mac89] Maciejewski B, Withers HR, Taylor JMG, Hliniak A. Dose fractionation and regeneration in radiotherapy for cancer of the oral cavity and oropharynx: tumor dose-response and repopulation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:831-43.
- [Mac91] Maciejewski B, Majewski S. Dose fractionation and tumour repopulation in radiotherapy for bladder cancer. *Radiother Oncol* 1991;21:163-70.
- [Mac98] MacKay RI, Niemierko A, Goitein M, Hendry JH. Potential clinical impact of normal-tissue intrinsic radiosensitivity testing. *Radiother Oncol* 1998;46:215-6.
- [Mac95] Mackillop WJ, Bates JH, O'Sullivan B, Withers HR. The effect of delay in treatment on local control by radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;34:243-50.
- [Mac07] Mackillop WJ. Killing time: the consequences of delays in radiotherapy. *Radiother Oncol* 2007;84:1-4.
- [Maj04] Majewski W, Maciejewski B, Majewski S, Suwinski R, Miszczyk L, Tarnawski R. Clinical radiobiology of stage T2-T3 bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;60:60-70.
- [Mal86] Malaise EP, Fertil B, Chavaudra N, Guichard M. Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of in vitro to in vivo data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:617-24.
- [Mar93] Marples B, Joiner MC. The response of chinese hamster V79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiat Res* 1993;133:41-51.
- [Mar04] Marples B, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ, Joiner MC. Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation damage G2-phase cells. *Radiat Res* 2004;161:247-55.
- [Mar08] Marples B, Collins SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70:1310-8.
- [Mar94] Marušič M, Bajzer Ž, Freyer JP, Vuk-Pavlovič S. Analysis of growth of multicellular tumour spheroids by mathematical models. *Cell Prolif* 1994;27:73-94.
- [Met49] Metropolis N, Ulam S. The Monte Carlo method. *J Am Stat Assoc* 1949;44:335-41.
- [Mil93] Millar WT, Canney PA. Derivation and application of equations describing the effects of fractionated protracted irradiation, based on multiple and incomplete repair processes. Part I. Derivation of equations. *Int J Radiat Biol* 1993;64:275-91.
- [Moo98] Moonen L, Voet H, De Nijs R, Horenblas S, Hart AAM, Bartelink H. Muscle-invasive bladder cancer treated with external beam radiation: influence of total dose, overall treatment time, and treatment interruption on local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:525-30.
- [Nor88] Norton L. A gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res* 1988;48:7067-71.

- [Nun95] Núñez MI, Villalobos M, Olea N, Valenzuela MT, Pedraza V, McMillan TJ, et al. Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *Br J Cancer* 1995;71:311-6.
- [Nun96] Núñez MI, McMillan TJ, Valenzuela MT, Ruiz de Almodóvar JM, Pedraza V. Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells. *Radiother Oncol* 1996;39:155-65.
- [Nun98] Núñez MI, Guerrero R, Lopez E, del Moral MR, Valenzuela MT, Siles E, et al. DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. *Int J Cancer* 1998;76:354-61.
- [Nun08] Núñez MI, López E, Pinar B, Guirado D, Guerrero R, Del Moral R, et al. Sobre la individualización de tratamientos en oncología radioterápica. *Bol Soc Esp Mat Apl* 2008;45:33-66.
- [Odo97] O'Donoghue JA. The response of tumours with Gompertzian growth characteristics to fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 1997;72:325-39.
- [Ole92] Olea N, Villalobos M, Ruiz de Almodóvar JM, Pedraza V. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 β -estradiol. *Int J Cancer* 1992;50:112-7.
- [Ole94] Olea N, Villalobos M, Núñez I, Elvira J, Ruiz de Almodóvar JM, Pedraza V. Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids using three mathematical models. *Cell Prolif* 1994;27:213-23.
- [Oli92] Olive PL. DNA organization affects radiosensitivity and detection of initial DNA strand breaks. *Int J Radiat Biol* 1992;62:389-96.
- [Oli94] Olive PL, Durand RE. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metast Rev* 1994;13:121-38.
- [Oli98] Olive PL. The role of DNA single and double strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res* 1998;150(Suppl.):S42-S51.
- [Ort73] Orton CG, Ellis F. A simplification in the use of the NSD concept in practical radiotherapy. *Br J Radiol* 1973;47:603-7.
- [Ove88] Overgaard J, Hjelm-Hansen M, Johansen LV, Andersen AP. Comparison of conventional and split-course radiotherapy as primary treatment in carcinoma of the larynx. *Acta Oncol* 1988;27:147-52.
- [Ozs97] Ozsahin M, Ozsahin H, Yuquan S, Larsson B, Würzler FE, Crompton NEA. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:429-40.
- [Par88] Parkins CS, Whitsed CA, Fowler JG. Repair kinetics in mouse lung after multiple X-ray fractions per day. *Int J Radiat Biol* 1988;4:429-43.
- [Par80] Parsons JT, Bova FJ, Million RR. A re-evaluation of split-course technique for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980;6:1645-52.

- [Pea00] Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, et al. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* 2000;55:173-8.
- [Pea24] Pearl R. *Studies in human biology*. Baltimore: Williams & Wilkins 1924.
- [Ped01] Pedraza V, Guerrero MR, Luna del Castillo JD. Time-dose-response relationships in postoperatively irradiated patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol* 2001;60:137-45.
- [Per95] Pérez CA, Grigsby PW, Castro-Vita H, Lockett MA. Carcinoma of the uterine cervix. I. Impact of prolongation of overall treatment time and timing of brachytherapy on outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1275-88.
- [Per04] Pérez CA, Michalski J, Mansur D, Lockett MA. Impact of elapsed treatment time on outcome of external-beam radiation therapy for localized carcinoma of the prostate. *Cancer J* 2004;10:349-56.
- [Pet95] Peterit DG, Sarkaria JN, Chappell R, Fowler JF, Hartmann TJ, Kinsella TJ, et al. The adverse effect of treatment prolongation in cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1301-7.
- [Pin07] Pinar B, Lara PC, Lloret M, Bordón E, Núñez MI, Villalobos M, et al. Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. *Radiat Res* 2007;168:415-22.
- [Pre95] Press WH, Teukolsky SA, Vetterling WT, Flannery BP. *Numerical recipes in FORTRAN. The art of scientific computing*. Segunda edición. Nueva York: Cambridge University Press 1995.
- [Puc56] Puck TT, Marcus PI. Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 1956;103:653-66.
- [Ram95] Ramsay J, Birell G. Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:339-44.
- [RCR08] The Royal College of Radiologist. Board of Faculty of Clinical Oncology. *The timely delivery of radical radiotherapy: standards and guidelines for the management of unscheduled treatment interruptions*. Tercera edición. Londres: The Royal College of Radiologist 2008.
- [RD98] Real Decreto 1566/1998, de 17 de julio, por el que se establecen los criterios de calidad en radioterapia. *BOE* 1998;206:29383-94.
- [Reg27] Regaud C, Ferroux R. Discordance des effets de rayons X, d'une part dans le testicule, par le fractionnement de la dose: diminution de l'efficacité dans la peau maintien de l'efficacité dans le testicule. *Compt Rend Soc Biol* 1927;97:431-4.
- [Rio10] Ríos MB, García-Cabezas S, Castro IJ, Richarte JM, Ariza MA, Guerrero R, et al. A study about the interruption causes in fractionated radiotherapy. *Radiother Oncol* 2009;96(Suppl 1):S618.

- [Rob93] Roberts SA, Hendry JH. The delay before onset of accelerated tumour cell repopulation during radiotherapy: a direct maximum-likelihood analysis of a collection of worldwide tumour-control data. *Radiother Oncol* 1993;29:69-74.
- [Rob94] Roberts SA, Hendry JH, Brewster AE, Slevin NJ. The influence of radiotherapy treatment time on the control of laryngeal cancer: a direct analysis of data from two British Institute of Radiology trials to calculate the lag period and the time factor. *Br J Radiol* 1994;67:790-4.
- [Rob98] Robertson C, Robertson AG, Hendry JH, Roberts SA, Slevin NJ, Duncan WB, et al. Similar decreases in local tumor control are calculated for treatment protraction and for interruptions in the radiotherapy of carcinoma of the larynx in four centers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;40:319-29.
- [Rof86] Rofstad EK, Wahl A, Brustad T. Radiation response of human melanoma multicellular spheroids measured as single cell survival, growth delay, and spheroid cure: comparisons with the parent tumor xenograft. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986;12:975-82.
- [Roj89] Rojas A, Joiner MC. The influence of dose per fraction on repair kinetics. *Radiother Oncol* 1989;14:329-36.
- [Rub81] Rubinstein RY. *Simulation and the Monte Carlo Method*. Nueva York: John Wiley & Sons 1981;6-12.
- [Rui94] Ruiz de Almodóvar JM, Núñez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, et al. Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 1994;69:457-62.
- [Rui02] Ruiz de Almodóvar JM, Guirado D, Núñez MI, López E, Guerrero R, Valenzuela MT, et al. Individualisation of radiotherapy in breast cancer patient: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2002;62:327-33.
- [Saa98] Saarilahti K, Kajanti M, Lehtonen H, Hämäläinen T, Joensuu H. Repopulation during radical radiotherapy for T1 glottic cancer. *Radiother Oncol* 1998;47:155-9.
- [Saf02] Safwat A, Bentzen SM, Turesson I, Hendry JH. Deterministic rather than stochastic factors explain most of the variation in the expression of skin telangiectasia after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:198-204.
- [San92] Sánchez-Reyes A. A simple model of radiation action in cells based on a repair saturation mechanism. *Radiat Res* 1992;130:139-47.
- [San93] Sánchez-Reyes A, Farrús B, Biete A. A new theoretical formula for fractionated radiotherapy bases on a saturable cellular repair mechanism. *Acta Oncol* 1992;32:57-61.
- [San03] Sanjuanbenito W, Guirado D. Principios básicos. En: *Radiobiología clínica*. Editado por Guirado D. Almería: Sociedad Española de Física Médica 2003;3-36.
- [San99] Santini RT, Rainaldi G, Indovina PL. Multicellular tumour spheroids in radiation biology. *Int J Radial Biol* 1999;75:787-99.

- [Sau97] Saunders MI, Dische S. Fractionation in radiotherapy: A view from the clinic. *Br J Radiol* 1997;70:S17-S24.
- [Sch89] Schwachöfer JHM, Crooijmans RPMA, Van Gasteren JJM, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB, et al. Repair of sublethal damage in two human tumor cell lines grown as multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:591-5.
- [Sch90] Schwachöfer JHM, Crooijmans RPMA, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB, Theeuwes AG. Radiosensitivity of human melanoma spheroids influenced by growth rate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;19:1191-7.
- [Sch84] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984;37:67-75.
- [Sho99] Short S, Mayes C, Woodcock M, Johns H, Joiner MC. Low dose hypersensitivity in the T98G human glioblastoma cell line. *Int J Radiat Biol* 1999;75:847-55.
- [Sho01] Short SC, Kelly J, Mayes CR, Woodcock M, Joiner MC. Low-dose hypersensitivity after fractionated low-dose irradiation in vitro. *Int J Radiat Biol* 2001;77:55-64.
- [Sil96] Siles E, Villalobos M, Valenzuela MT, Núñez MI, Gordon A, McMillan TJ, et al. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br J Cancer* 1996;73:581-8.
- [Sin94] Singh B, Arrand JE, Joiner MC. Hypersensitive response of normal human lung epithelial cells at low radiation doses. *Int J Radial Biol* 1994;65:457-64.
- [Ska96] Skarsgard LD, Skwarchuk MW, Wouters BG, Durand RE. Substructure in the radiation survival response at low dose in cells of human tumor cell lines. *Radiat Res* 1996;146:388-98.
- [Sle92] Slevin NJ, Hendry JH, Roberts SA, Ågren-Cronqvist A. The effect of increasing the treatment time beyond three weeks on the control of T2 and T3 laryngeal cancer using radiotherapy. *Radiother Oncol* 1992;24:215-20.
- [Smi99] Smith LG, Miller RC, Richards M, Brenner DJ, Hall EJ. Investigation of hypersensitivity to fractionated low-dose radiation exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;45:187-91.
- [Sou73] Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer* 1973;51:1409-16.
- [Spr64] Spratt JS, Spratt TL. Rates of growth of pulmonary metastases and host survival. *Ann Surg* 1964;159:161-71.
- [Sta02] Stamatakis GS, Dionysiou DD, Zacharaki EI, Mouravliansky NA, Nikita KS, Uzunoglu NK. In silico radiation oncology: combining novel simulation algorithms with current visualization techniques. *Proceedings of the IEEE* 2002;90:1764-77.
- [Sta07] Stamper IJ, Byrne HM, Owen MR, Maini PK. Modelling the role of angiogenesis and vasculogenesis in solid tumour growth. *Bull Math Biol* 2007;69:2737-72.

- [Sta99] Stausbøl-Grøn B, Bentzen SM, Jorgensen KE, Nielsen OS, Bundgaard T, Overgaard J. In vitro radiosensitivity of tumour cells and fibroblasts derived from head and neck carcinomas: mutual relationship and correlation with clinical data. *Br J Cancer* 1999;79:1074-84.
- [Ste67] Steel GG. Cell loss factor in the growth rate of human tumours. *Br J Cancer* 1967;3:381-7.
- [Ste77] Steel GG. The growth kinetics of tumours. Oxford: Oxford University Press 1977.
- [Ste02] Steel GG. The dose rate effect: brachytherapy and targeted radiotherapy. En: Basic clinical radiobiology. Editado por Steel GG. Tercera edición. Londres: Arnold 2002;197-204.
- [Str44] Strandqvist M. Studien über die kumulative Wirkung der Röntgenstrahlen bei Fraktionierung. Erfahrungen aus dem Radiumhemmet an 280 Haut-und Lippenkarzinomen. Tesis doctoral. *Acta Radiologica* 1944;55(suppl):1-300.
- [Sut84] Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. En: Recent results in cancer research. Spheroids in cancer research. Editado por Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland RM. Berlín: Springer-Verlag 1984;24-49.
- [Sut88] Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988;240:177-84.
- [Suw99] Suwinski R, Taylor JMG, Withers HR. The effect of heterogeneity in tumor cell kinetics on radiation dose-response. An exploratory investigation of a plateau effect. *Radiother Oncol* 1999;50:57-66.
- [Suw03] Suwinski R, Sowa A, Rutkowski T, Wydmanski J, Tarnawski R, Maciejewski B. Time factor in postoperative radiotherapy: a multivariate locoregional control analysis in 868 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:399-412.
- [Tay90] Taylor JM, Withers HR, Mendenhall WM. Dose-time considerations of head and neck squamous cell carcinomas treated with irradiation. *Radiother Oncol* 1990;17:95-102.
- [Tha85] Thames HD. An "incomplete-repair" model for survival after fractionated and continuous irradiations. *Int J Radiat Biol* 1985;47:319-39.
- [Tha88] Thames HD. Early fractionation methods and the origins of the NSD concept. *Acta Oncol* 1988;27:89-103.
- [Tha89] Thames HD. Repair kinetics in tissues: alternative models. *Radiother Oncol* 1989;14:321-7.
- [Tha90] Thames HD, Bentzen SM, Turesson I, Overgaard M, van den Bogaert W. Time-dose factors in radiotherapy: a review of the human data. *Radiother Oncol* 1990;19:219-35.
- [Tha10] Thames HD, Kuban D, Levy LB, Horwitz EM, Kupelian P, Martinez A, et al. The role of overall treatment time in the outcome of radiotherapy of prostate cancer: an analysis of biochemical failure in 4839 men treated between 1987 and 1995. *Radiother Oncol* 2010;96:6-12.

- [Tra87] Travis EL, Thames HD, Watkins TL, Kiss I. The kinetics of repair in mouse lung after fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol* 1987;52:903-19.
- [Tro91] Trott KR, Kummermehr J. Rapid repopulation in radiotherapy: a debate on mechanism. Accelerated repopulation in tumours and normal tissues. *Radiother Oncol* 1991;22:159-60.
- [Tro93] Trott KR, Kummermehr J. The time factor and repopulation in tumors and normal tissues. *Sem Radiat Oncol* 1993;3:115-25.
- [Tro94] Trott KR. Tumour stem cells: the biological concept and its application in cancer treatment. *Radiother Oncol* 1994;30:1-5.
- [Tuc90] Tucker SL, Thames HD, Taylor JMG. How well is the probability of tumor cure after fractionated irradiation described by Poisson statistics? *Radiat Res* 1990;124:273-82.
- [Tuc92] Tucker SL, Turesson I, Thames HD. Evidence for individual differences in the radiosensitivity of human skin. *Eur J Cancer* 1992;28A:1783-91.
- [Tur96] Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A. Prognosis factor for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;36:1065-75.
- [Van09] Van der Kogel A, Joiner M (editores). *Basic clinical radiobiology*. Cuarta edición. Londres: Hodder Arnold 2009.
- [Veg85] Vegesma V, Withers HR, Thames HD, Mason K. Multifraction radiation response of mouse lung. *Int J Radiat Biol* 1985;47:413-22.
- [Vel03] Velázquez S. Relaciones dosis-respuesta. En: *Radiobiología clínica*. Editado por Guirado D. Almería: Sociedad Española de Física Médica 2003;49-69.
- [Vil01] Vilches M, Guirado D. Influence of dose per fraction on 7 days per week fractionation in radiotherapy. En: *Radiological protection of patients in diagnostic and interventional radiology, nuclear medicine and radiotherapy*. Viena: Organización Internacional de la Energía Atómica 2001;581-5.
- [Vil90] Villalobos M. Modelos tumorales en oncología: los esferoides multicelulares en el estudio del cáncer hormonodependiente. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Medicina, Departamento de Radiología y Medicina Física. Granada 1990.
- [Vil95a] Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruiz de Almodóvar JM, Pedraza V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect* 1995;103:844-50.
- [Vil95b] Villalobos M, Aranda M, Núñez MI, Becerra D, Olea N, Ruiz de Almodóvar JM, et al. Interaction between ionizing radiation, estrogens and antiestrogens in the modification of tumor microenvironment in estrogen dependent multicellular spheroids. *Acta Oncol* 1995;34:413-7.
- [Wei84] Weichselbaum RR, Little JB, Tomkison K. Repair of fractionated radiation in plateau phase cultures of human tumor cells and human multicellular tumor spheroids. *Radiother Oncol* 1984;2:41-7.

- [Wes98] West CM, Davidson SE, Elyan SA, Swindell R, Roberts SA, Orton CJ, et al. The intrinsic radiosensitivity of normal and tumor cells. *Int J Radiat Biol* 1998;73:409-13.
- [Wes01] West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, et al. Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognosis factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:10-15.
- [Whe85] Wheldon TE, Livingstone A, Wilson L, O'Donoghue J, Gregor A. The radiosensitivity of human neuroblastoma cells estimated from regrowth curves of multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol* 1985;58:661-4.
- [Whe86] Wheldon TE, Wilson L, Livingstone A, Russell J, O'Donoghue J, Gregor A. Radiation studies on multicellular tumour spheroids derived from human neuroblastoma: Absence of sparing effect of dose fractionation. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986;22:563-6.
- [Wit88] Withers JM, Taylor JMG, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol* 1988;27:131-46.
- [Wit95] Withers HR, Peters LJ, Taylor JM. Dose-response relationship for radiation therapy of subclinical disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:353-9.
- [Wou96] Wouters BG, Sy AM, Skarsgard LD. Low-dose hypersensitivity and increase radioresistance in a panel of human tumor cell lines with different radiosensitivity. *Radial Res* 1996;146:399-413.
- [Wya08] Wyatt RM, Jones BJ, Dale RG. Radiotherapy treatment delays and their influence on tumour control achieved by various fractionation schedules. *Br J Radiol* 2008;81:549-63.
- [Zai96] Zaider M, Wu CS, Minerbo GN. The combined effects of sublethal damage repair, cellular repopulation and redistribution in the mitotic cycle. I. Survival probabilities after exposure to radiation. *Radiat Res* 1996;145:457-66.
- [Zai98] Zaider M. There is no mechanistic basis for the use of the linear-quadratic expression in cellular survival analysis. *Med Phys* 1998;25:791-2.