

ORIGINALS

IRRADIACIÓ CORPORAL TOTAL EN UN MODEL MURÍ. MORTALITAT HEMATOLÒGICA I CAPACITAT DE RESCAT DEL FACTOR G-CSF

A. Valls, A. Sureda (*), M. Algara, M. Lacruz, M. Jaume, L. Tobajas (**), E. Kadar (*), J. García (*)

Servei de Radioteràpia de l'Hospital de l'Esperança i Institut de Recerca Oncològica, Hospital Duran i Reynals (*). (***) AMYS-90. Barcelona

RESUM

La toxicitat hematològica és l'efecte tòxic agut que limita la utilització de tractaments citotòxics agressius. Els autors analitzen els efectes de l'irradiació corporal total (ICT) en un model murí, amb l'objectiu d'establir la corba de mortalitat secundària a l'ICT per mort hematològica, la seva variació en relació a la taxa de dosi amb que s'administra el tractament i l'eficàcia del factor estimulant del creixement cel·lular G-CSF en el rescat dels animals exposats a una dosi letal 95%. Els resultats de l'estudi mostren que les tècniques d'irradiació habilitades tenen un error de $\pm 1\%$, que la disminució de la taxa de dosi de 50 a 1 cGy/min fa augmentar la DL_{50} de 948 (938-959) cGy a 1280 (1266-1294) cGy i que la major eficàcia del factor G-CSF s'obté quan s'administra a la dosi de 1 mg/kg durant les primeres 24 hores que segueixen a l'exposició a les radiacions.

PARAULES CLAU:

Irradiació corporal total, ratolí, dosi letal, taxa dosi, factor de creixement cel·lular, G-CSF.

INTRODUCCIÓ

El teixit hematopoètic és l'origen de la major part de la toxicitat aguda, secundària a l'administració de tractament citolític sistèmics. Això implica una important limitació a l'hora de fer tractaments antineoplàstics agressius, i

per tant disminueix les possibilitats de guariment d'un gran nombre de malalts (1,2,3).

Les raons biològiques que sustenten la gran sensibilitat d'aquest teixit als tractaments citotòxics es troben en la

CORRESPONDENCIA: Dr. A. Valls, Servei de Radioteràpia, Hospital de l'Esperança.

Sant Josep de la Muntanya, 12. 08024 Barcelona. Telèfon: 285 02 00, extensió 2142. Fax: 219 00 03.

seva intensa activitat proliferativa i especialment en la seva limitada capacitat per a reparar el dany subletal (4,5,6,7).

Un major coneixement dels mecanismes de compensació-reparació d'aquest teixit, podria comportar modificacions en les pautes de tractament amb implicacions terapèutiques d'interès.

La cooperació ja existent en l'àmbit clínic, entre els equips de Radioteràpia de l'Hospital de l'Esperança i els de Recerca Biològica, abans de l'Hospital de Sant Pau i en l'actualitat de l'Hospital Duran i Reynals, ens varen permetre obtenir un ajut econòmic del FISS i d'AMYS per a iniciar un programa de recerca en animals de laboratori. La seva finalitat era comprovar l'efecte de la irradiació corporal total (ICT) sobre el sistema immunopoètic i l'acció dels anomenats factors de creixement cel·lular, com a tractament de rescat en animals exposats a una dosi letal d'irradiació.

A continuació exposem els resultats obtinguts en els tres àmbits estudiats: anàlisi de les tècniques de tractament dels animals; efectes de l'ICT en el sistema hemopoètic; i eficàcia del factor G-CSF en la recuperació hematològica dels animals irradiats.

TÈCNiques D'IRRADIACIÓ

Els problemes tècnics que s'havien de resoldre per irradiar els animals de laboratori consistien en: com tractar al mateix temps un nombre considerable de ratolins (entre 25 i 30), aconseguir que el repartiment de la dosi fos homogeni entre els animals, independentment de la seva posició respecte a l'eix; comprovar si el repartiment de la dosi en cada animal era acceptable, és a dir, que no hi haguessin diferències substancials entre la dosi absorbida en

el cap i a l'abdomen de cada animal; i finalment, que la irradiació no bloquejés la unitat de tractament durant massa estona per no destorbar l'assistència dels malalts.

Finalment, i com a conseqüència de les mesures practicades per a cada una de les tècniques proposades, vàrem decidir acceptar dues modalitats d'irradiació: per les taxes de dosi "altes" (10-50 cGy/min) els ratolins es tractarien en grups de 25 animals, disposats en unes capsas de fusta compartimentades, per un sol camp, i a una distància focus-pla mig dels animals de 100 cm. En aquestes condicions, per cada sèrie d'experiències, es poden tractar els grups de forma successiva amb unes diferències màximes entre la dosi calculada i la rebuda inferior a $\pm 1\%$.

Per les taxes de dosi "baixes" (1-5 cGy/min) vàrem habilitar una tècnica a 350 cm de distància, que permetia el tractament de quatre capsas de 25 ratolins cadascuna al mateix temps. Donat que en aquestes condicions el repartiment de la dosi no era òptim, vàrem habilitar una seqüència de pauses i rotacions de les capsas que aconseguia, novament, una bona homogeneïtat, amb un error inferior al $\pm 1\%$.

EXPERIÈNCIES DE RADIOBIOLOGIA

El primer pas va consistir en determinar, per la soca de ratolí objecte de la nostra experiència, quina era la corba de mortalitat en relació a la dosi d'ICT administrada i, com a conseqüència de la seva obtenció, conèixer la dosi letal 50% (DL_{50}) per mort hematològica, és a dir, la mortalitat observada durant el període (7-30 dies) que segueix a l'exposició.

Amb aquesta finalitat vàrem utilitzar 125 ratolins femella, de la soca $B_6D_2F_1$, de 8 setmanes d'edat i un pes mig de 20 g, que varen ésser establats a la

unitat corresponent de l'Hospital de Sant Pau. Transcorreguda una setmana d'aclimatació i quarantena, els ratolins varen ésser agrupats en lots de 25 animals cadascún, transportats al Servei de Radioteràpia de l'Hospital de l'Esperança, i irradiats amb una font de Co-60 i una taxa de dosi de 50 cGy/min, fins a les dosis totals següents: 900-925-950-975 i 1.000 cGy. A continuació varen ésser transportats de nou a l'estabulari, on varen romandre durant tot el període d'observació, en una habitació estèril (aire filtrat) amb pinso estèril i aigua que contenia cotrimoxazol i neomicina sense limitacions.

Durant el període d'observació es varen comptabilitzar les morts esde-

vingudes en cada grup. Les dades obtingudes varen ésser tractades estadísticament pel mètode de Litchfield-Wilcoxon per la determinació de la DL_{50} i construcció de la corba de mortalitat.

Els resultats obtinguts amb el mètode exposat es recullen en la Taula I i la Figura 1. Com es pot veure, per aquesta soca de ratolí i en les nostres condicions d'experimentació, la $DL_{50/30}$ per una taxa de dosi de 50 cGy/min és de 948 cGy (938-959).

A continuació, varem determinar la variació de la $DL_{50/30}$ en relació a la disminució de la taxa de dosi amb que s'administra l'ICT. Amb les mateixes condicions: tipus de ratolí, estabulació i irradiació, es varen tractar els animals, agrupats tal com es recull en la

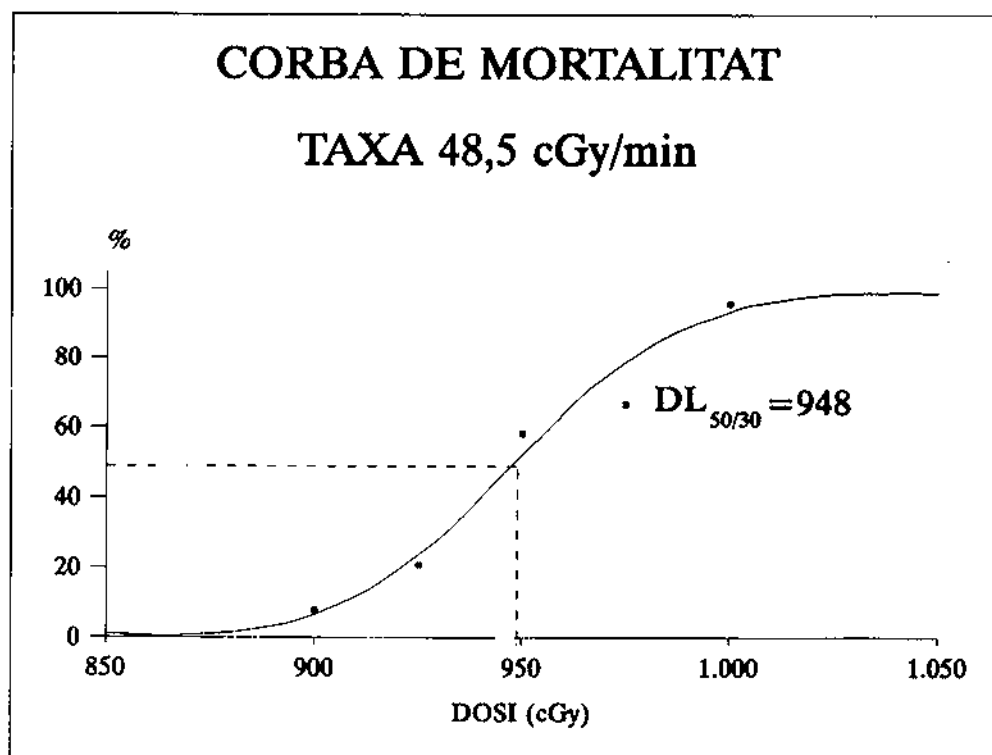


Figura 1
Corba de mortalitat hematològica obtinguda amb dosis creixents d'ICT per una taxa de dosi de 50 cGy/min.

TAULA I. MORTALITAT EXPERIMENTAL I TEORICA PER A LA TAXA DE DOSI DE 50 cGy/min.

DOSI	(n)	MORTALITAT EXPERIMENTAL	LITCHFIELD-WILCOXON
900 cGy	25	8,0 %	6,7%
925 cGy	24	20,8%	23,8%
950 cGy	24	58,3%	52,2%
975 cGy	24	66,7%	78,9%
1000 cGy	25	96,0%	93,7%

TAULA II. GRUPS PER A DETERMINAR LA VARIACIÓ DE LA DL_{50/30}

TAXA	GRUPS	(n)
50 cGy/min	5	122
10 cGy/min	4	99
4 cGy/min	6	149
1,5 cGy/min	5	124

TAULA III. VARIACIÓ DE LA DL_{50/30} EN FUNCIÓ DE LA TAXA DE DOSI.

TAXA	DL _{50/30}	INTERVAL
48,5 cGy/min	948	938-959
10,4 cGy/min	1024	1008-1041
4,2 cGy/min	1084	1053-1116
1,6 cGy/min	1280	1266-1294

VARIACIO DE LA $DL_{50/30}$ AMB LA TAXA DE DOSI

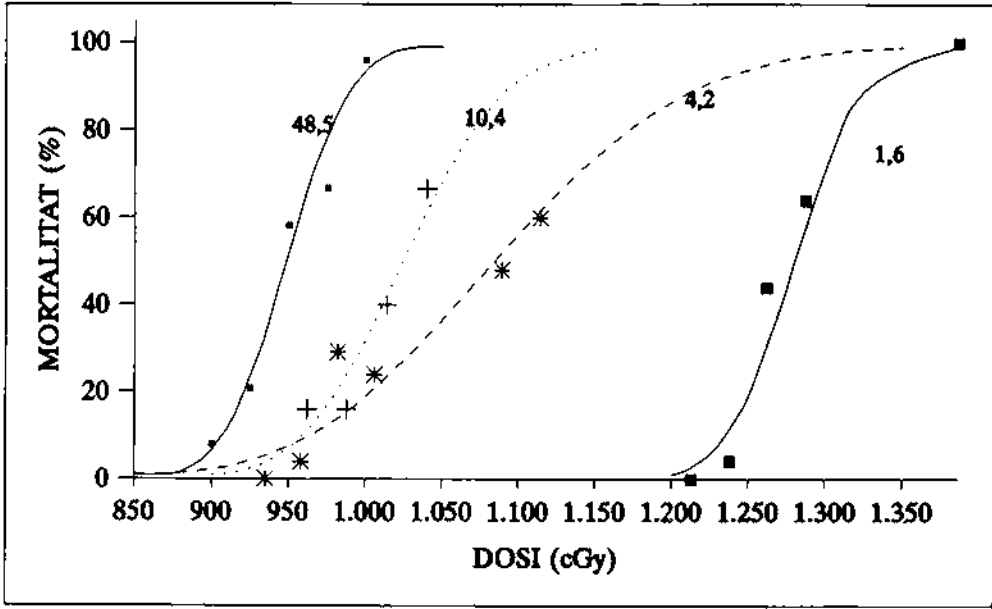


Figura 2
Desplaçament vers la dreta de les corbes de mortalitat hemològica a mesura que la taxa de dosi disminueix de 50 a 1 cGy/min.

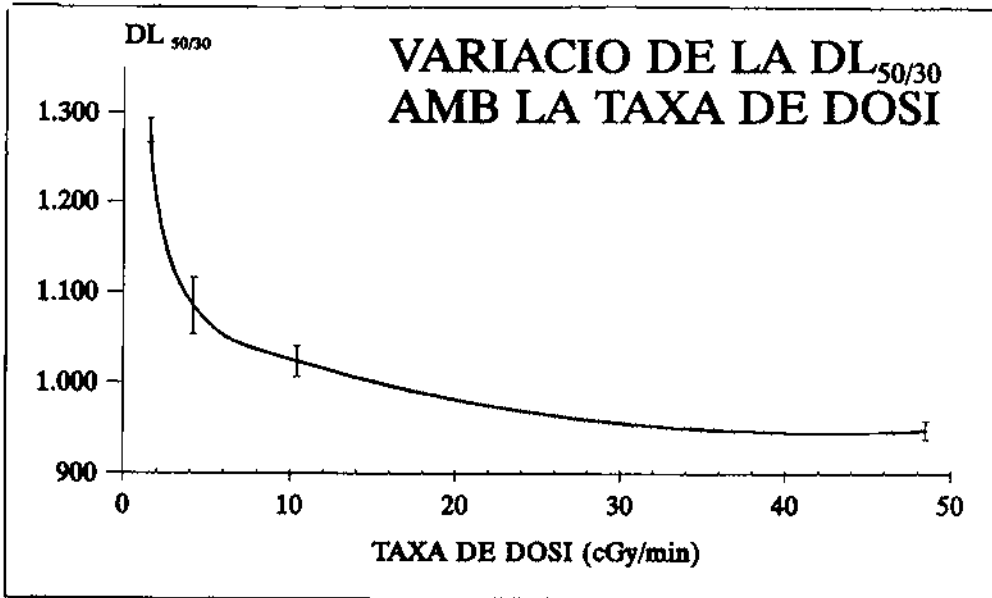


Figura 3
Corba que relaciona la variació de la $DL_{50/30}$ amb la taxa de dosi.

Taula II per les quatre taxes de dosi estudiades. Tal i com es pot veure en la Taula III, la $DL_{50/30}$ augmenta a mesura que la taxa de dosi emprada disminueix, i la corba de mortalitat obtinguda (Figura 2) es desplaça cap a la dreta. En la Figura 3 es recull l'evolució de la $DL_{50/30}$ en relació a la taxa de dosi.

CAPACITAT DE RESCAT DE LA MORT HEMATOLÒGICA DEL FACTOR DE CREIXEMENT CEL·LULAR G-CSF

Una vegada coneguda la sensibilitat del teixit hemopoètic d'aquesta soca de ratolí, a través de la corba de mortalitat i de la seva variació en funció de la taxa de dosi emprada, vàrem poder iniciar la utilització de factors estimulants de l'hemopoesi, amb l'objectiu de conèixer la seva capacitat de rescat de la mort hematològica.

Els problemes plantejats eren fonamentalment dos: quina era la dosi més eficaç i quin era el moment d'administració òptim en relació a la irradiació de l'animal.

En base a les dades de la literatura i al resultat de les experiències de tanteig realitzades, vàrem iniciar l'estudi per a la determinació de la dosi de G-CSF òptima.

Amb aquesta finalitat vàrem utilitzar un total de 100 ratolins de la mateixa soca, sexe, edat i pes mig que en experiències prèvies, que varen ésser mantinguts en les mateixes condicions d'estabulació e irradiats amb la $DL_{95/30}$ prèviament determinada (1.000 cGy a 50 cGy/min). A continuació varen ésser distribuïts en cinc grups de 20 animals. El grup control va rebre sèrum fisiològic. Els altres quatre, G-CSF per via intraperitoneal a les dosi següents: 0,25-0,50-1 i 2 mg/kg durant les tres hores que varen seguir a la irradiació.

Al igual que en les experiències prèvies, durant el període d'observació

vàrem comptabilitzar les morts esdevingudes en cada grup, que ulteriorment varen ésser comparades utilitzant el mètode de la *chi* al quadrat o la prova de la probabilitat exacta de Fisher quan fou necessari.

Tal com es pot comprovar en la Taula IV, qualsevol de les quatre dosi de G-CSF emprades, rescata de la mort hematològica un nombre significatiu d'animals respecte al grup control. Ara bé, comparant l'eficàcia de les diferents dosis entre sí, s'observa que l'administració de dosis "altes" (1-2 mg/Kg) rescata un nombre d'animals significativament superior que les dosis "baixes" (0,25-0,50 mg/Kg) (Taula V). La conclusió obtinguda d'aquesta experiència és que la dosi de G-CSF òptima és de 1 mg/Kg.

El següent pas va ésser la determinació de la seqüència d'administració òptima en relació al moment de l'ICT. Per esbrinar-ho, vàrem utilitzar 214 ratolins de les mateixes característiques i en les mateixes condicions d'estabulació i tractament que en experiències prèvies. Una vegada administrada l'ICT amb la dosi letal 95% (1.000 cGy a 50 cGy/min), els animals varen ésser distribuïts en 9 grups. Dos grups de control varen rebre; l'un sèrum fisiològic, l'altre $4,5 \times 10^8$ cél·lules mononucleades hemopoètiques singèniques, que per experiències prèvies sabiem, rescataven el 90% dels animals de la mort hematològica radioinduida. Els altres 7 grups varen rebre la dosi de G-CSF òptima (1 mg/Kg de pes) per via intraperitoneal amb els següents intervals després de l'ICT: 2 hores, 24 hores i als 2, 3, 5, 7 ó 9 dies. Al igual que en les experiències prèvies, durant el període d'observació vàrem comptabilitzar les morts esdevingudes en cada grup, que varen ésser comparades mitjançant els mètodes estadístics esmen-

TAULA IV. SUPERVIVENCIA EN CADA GRUP.
DIFERENCIES RESPECTE AL CONTROL.

GRUPS	MORTS	VIUS	SIGNIFICACIO RESPECTE AL GRUP CONTROL
Grup control	18	2	
0,25 mg/kg	11	9	p=0,01
0,50 mg/kg	9	11	p=0,002
1 mg/kg	4	16	p<0,0001
2 mg/kg	7	13	p<0,0001

TAULA V. SUPERVIVENCIES AGRUPANT DOSIS
BAIXES *versus* DOSIS ALTES DE G-CSF (p=0,03).

GRUPS	MORTS	VIUS
DOSIS BAIXES ≤ 0,5 mg/kg	20	20
DOSIS ALTES > 0,5 mg/kg	11	29

tats.

Tal i com es recull en la Taula VI i en la Figura 4, la supervivència, és a dir, el nombre d'animals rescatats de la mort hematològica, disminueix a mesura que l'administració del factor de creixement s'allunya de l'ICT. Tan sols l'administració a les 2-24 i 48 hores rescata un nombre significatiu d'animals respecte al grup control (sèrum fisiològic). Ara bé, donada la diferència percentual observada entre els grups de 2-24 hores i el de 48 hores, vàrem comparar ambdós grups, per tal de saber si les supervivències obtingudes eren diferents. Tal com es pot veure en la Taula VII, la diferència percentual és estadísticament significativa, demostrant que l'administració del factor de crei-

DETERMINACIO DE LA SEQUENCIA D'ADMINISTRACIO OPTIMA DE G-CSF

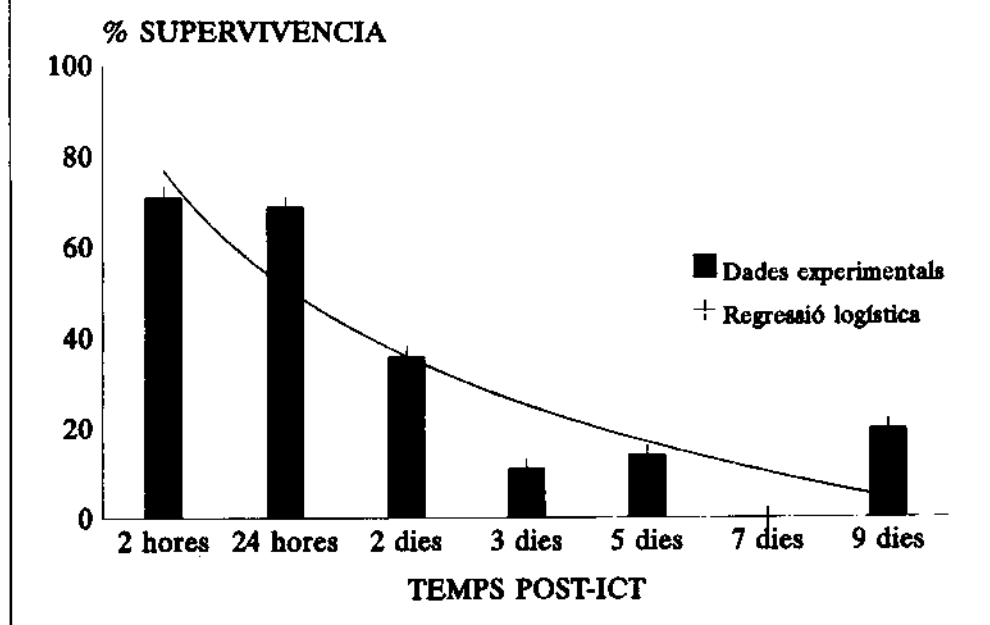


Figura 4
Disminució de l'eficàcia de 1 mg/kg de G-CSF a mesura que la seva administració s'allunya de l'ICT.

xement a les 48 hores rescata un menor nombre d'animals que quan s'administra a les 2 ó 24 hores.

Finalment, vàrem comparar les supervivències obtingudes amb el factor G-CSF amb la pròpia de la infusió de cèl·lules hemopoètiques. Tal com es recull en la Taula VIII, no hi ha diferències entre els dos grups. D'aquesta experiència vàrem constatar que el moment d'administració òptim del factor de creixement cel·lular es troba entre les 2 i 24 hores post ICT, i que la seva eficàcia és comparable a l'obtinguda quan s'administra un trasplantament de cèl·lules hemopoètiques singèniques.

DISCUSSIO

El teixit immunopoètic és molt sensible als agents citotòxics sistèmics, utilitzats en el tractament del càncer. Aquesta sensibilitat extrema comporta una toxicitat aguda greu, que limita la utilització d'aquests mitjans, i per tant la seva eficàcia (1,2,3).

Un major coneixement del mecanisme d'acció d'aquests agents sobre el teixit, així com una millora en els mecanismes de recuperació podrien comportar un avenç terapèutic significatiu.

En l'àmbit de la clínica, el trasplantament de moll d'os, o qualsevol de les seves varietats amb precursors hemo-

TAULA VI. SUPERVIVENCIA EN CADA GRUP. DIFERENCIES RESPECTE AL CONTROL (serum fisiològic).

GRUPS	(n)	VIUS (%)	SIGNIFICACIO RESPECTE AL CONTROL
Grup control	61	7	
2 hores	28	71	$p < 0,0001^*$
24 hores	26	69	$p < 0,0001^*$
2 dies	14	36	$p = 0,002$
3 dies	27	11	$p = 0,492^*$
5 dies	14	14	$p = 0,385^*$
7 dies	14	0	$p = 0,429^*$
9 dies	15	20	$p = 0,158^*$

* Prova de la probabilitat exacta de Fisher

TAULA VII. SUPERVIVENCIA AMB G-CSF. ≤ 24 versus 48 HORES ($p = 0,0165^*$).

GRUPS	(n)	VIUS (%)
2-24 hores	54	70
48 hores	14	36

* Prova de la probabilitat exacta de Fisher.

TAULA VIII. SUPERVIVENCIA AMB G-CSF (≤ 24 i > 24 hores)
RESPECTE AL GRUP CONTROL (CHMS).

GRUPS	(n)	VIUS (%)	SIGNIFICACIO RESPECTE AL CONTROL
Control CHMS	15	93	
2-24 hores	54	70	p=0,0689*
> 24 hores	84	16	p<0,0001*

* Prova de la probabilitat exacta de Fisher.

poiètics, ha representat un avenç important (8). Darrerament, la utilització dels anomenats factors estimulants del creixement cel·lular o citoquines, està demostrant una gran eficàcia com estimulant de l'hemopoesi residual, en pacients sotmesos a tractaments citotòxics agressius (9,10).

Els objectius del projecte eren múltiples. Es tractava d'aprofundir en aquest camp de la biologia per extreure conclusions d'aplicació clínica, especialment en l'àmbit del rescat hematològic en individus sotmesos a una irradiació de cos sencer, tal com es practica en el tractament de la leucèmia amb transplantament de medul·la òssia.

En aquests treballs hem exposat els problemes que vàrem haver de resoldre i les solucions habilitades. Inclouen, des de la posta a punt de les tècniques d'irradiació més adients, d'acord amb les nostres disponibilitats, fins els resultats obtinguts amb el factor de creixement cel·lular.

Les tècniques d'irradiació, una vega-

da comprovada la seva exactitud i homogeneïtat en el repartiment de la dosi, han quedat estandaritzades i es poden utilitzar, amb petites variants, per altres tipus d'experiències. Unes diferències de $\pm 1\%$ entre les dosis calculades i les mesurades és perfectament assumible (11,12). Els resultats biològics obtinguts posteriorment, confirmen que l'error està dintre dels marges de confiança.

Les experiències de radiobiologia eren bàsiques abans d'iniciar la darrera fase. Que l'efecte biològic de la radiació varia amb la taxa de dosi és un fet conegut (13). Però, les cèl·lules hemopoètiques, sempre han estat conegudes per la seva escassa capacitat per recuperar el dany subletal. En conseqüència, era previsible una escassa modificació de la mortalitat amb la variació de la taxa de dosi (14). No obstant, tal i com s'ha pogut veure en els resultats, la $DL_{50/30}$ varia amb un factor de 1,35 quan passem d'una taxa de dosi de 50 cGy/min a 1 cGy/min. La corba obtinguda (Figura 3) ens permet

ajustar la dosi que hem d'administrar per obtenir un 50% de supervivents en funció de qualsevol taxa de dosi disponible entre 1 i 50 cGy/min.

Una vegada conegut aquest extrem, podem irradiar els animals amb una gran fiabilitat respecte el nombre d'animals que moriran com a conseqüència del tractament, i, per tant, aplicar els factors de creixement com a mitjà de rescat hematològic.

En quan a l'aplicació d'aquestes citocines, importava saber quina era la dosi més adient i el moment òptim d'administració, per tal de rescatar els animals mitjançant l'estímul de l'hemoepesi residual.

Els resultats indiquen que la dosi més petita que rescata un major nombre d'animals és de 1 mg/kg de pes, i que el moment òptim per la seva administració es troba durant les primeres 24 hores que segueixen la irradiació. El perquè l'eficàcia del factor estimulador disminueix a mesura que la seva administració s'allunya de la ICT és un fet que estem explorant amb experièn-

cies que tenen a veure amb la cinètica de recuperació del moll de l'os i que encara no podem oferir.

En resum, els objectius fixats inicialment han estat assolits satisfactòriament. Les tècniques emprades per la irradiació són segures i fiables. Coneixem la mortalitat que obtindrem per cada dosi i taxa de dosi utilitzada. Finalment, sabem que el factor de creixement estudiat, si s'administra la dosi de 1 mg/kg per via intraperitoneal durant les 24 hores que segueixen la irradiació, rescata de la mort hematològica un nombre d'animals comparable al trasplantament de cèl·lules hemopoètiques mononuclears singèniques.

AGRAÏMENTS

Aquest treball ha estat realitzat en part gràcies a les beques: FISS 90/0264-2-D i AMYS-90. Agraïm a tot el personal del Servei de Radioteràpia de l'Hospital de l'Esperança i de la Unitat de Recerca de l'Hospital Duran i Reynals la seva desinteressada col·laboració.

BIBLIOGRAFIA

1. BEARMAN S.I., APPELBAUM F.R., BUCKNER C.D., et al. Regimen related toxicity in patients undergoing bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.*, 1988; 6: 1562-1568.
2. BEARMAN S.I., APPELBAUM F.R., BACK A., et al. Regimen related toxicity and early post-transplant survival in patients undergoing marrow transplantation for lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 1989; 7: 1288-1294.
3. BUCKNER C.D., CLIFT R.A., APPELBAUM F.R., et al. Effects of treatment regimens in patients allografted for acute chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transpl.*, 1991; 7 (Suppl. 2): 6-8.
4. EVANS R.J. Radiobiological considerations in magna field irradiation. *Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys.*, 1983; 9: 1907-1911.
5. GALE R.P., BUTTURINI A., BORTIN MM. What does total body irradiation do in bone marrow transplants for leukemia? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1991; 20: 631-634.

6. PETERS L.J., WHITERS H.R., CUNDIFF J.A., DICKE V.A. Radiobiological considerations in the use of total body irradiation for bone marrow transplantation. *Radiology*, 1979; 131: 243-247.
7. PETERS L.J. The radiobiological basis of TBI. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1980; 6: 785-787.
8. THOMAS E.D. Total body irradiation regimens for marrow grafting. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1990; 19: 1285-1288.
9. CLARK S.C., KAMEN R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*, 1987; 236: 1229-1237.
10. METCALF D. The molecular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature*, 1989; 339: 27-39.
11. FUSHIKI M., ONO K., SASAI K., et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on granulocytopenia in mice induced by irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1990; 18: 353-357.
12. TARBELL N.J., AMATO D.A., DOWN J.D., et al. Fractionation and dose rate effects in mice: a model for bone marrow transplantation in man. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1987; 13: 1065-1069.
13. BARENSEN G.W. Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationships for normal tissue responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1982; 8: 1991-1997.
14. TRAVIS E.L., PETERS L.J., MCNEIL J., THAMES H.D., KAROLIS C. Effect of dose rate on total body irradiation. Late mortality and pathologic findings. *Radiother. Oncol.*, 1985; 4: 341-351.