DERIVAÇÃO DE UM MODELO PARA ANALISE DE EFEITOS BIOLOGICOS INDUZIDOS POR RADIAÇÃO

CLOVIS DE ARAUJO PERES

Tese apresentada para Concurso de Livre-Docência junto ao Departamento de Estatística do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

- São Paulo, Agosto de 1981

INDICE

CAPÍTULO I -	INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II -	UMA ANÁLISE DOS MODELOS DE DOSE-RESPOSTA USADOS PARA DESCREVER OS EFEITOS GENÉTICOS DA RADIAÇÃO	4
	 2.1 - Elefto Genetico e os primerios moderos de dose-resposta	4 9 15 19
CAPÍTULO III-	<pre>UM MODELO PARA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS 3.1 - Introdução 3.2 - O Modelo Matemático 3.3 - Interpretação dos parâmetros α e β 3.4 - Uso do modelo para outros efeitos biológicos 3.5 - Discussão (Comentários Gerais)</pre>	21 21 22 29 30 32
CAPÍTULO IV -	<pre>APLICAÇÕES</pre>	35 35 36 38
	 tos 0₂ e N₂ 4.3 - Efeito de diferentes regimes de radiação na sobrevivência de ovos de drosófila em estágio 7 irradiados com raio X 4.3.1 - Ajuste do Modelo 4.3.2 - Variações nas estimativas de α e β quando comparamos vários regimes de 	45 46 49
	radiação	52

- i

CAPITULO V -	UM MÉTODO PARA AJUSTAR MODELOS NÃO LINEARES USAN-	
	DO MÍNIMOS QUADRADOS LINEAR PONDERADO 53	3
	5.1 - Introdução 53	3
	5.2 - Estimação dos parâmetros α e β da função	
	$S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ por Modelos lineares 56	5
	5.3 - Comparação de dois processos de ajustamen-	
	to de modelos não lineares nos parâmetros 58	3
		_
REFERENCIAS)

- 0 -

* E

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. David G. Hoel por ter me convidado a participar do seu grupo de pesquisa junto ao "National Institute of Environmental and Health Sciences" no "Research Triangle Park", N.C., onde desenvolvi este trabalho.

Gostaria também de agradecer ao Dr. Robert Jenrick pelas suas discussões especialmente sobre o assunto do último capitulo deste trabalho.

• Gostaria também de agradecer a Lourdes Vaz da Silva pelo excelente trabalho de datilografia.

Por último, mas não menos, agradeço a minha esposa e filhos por me acompanhar com paciência e disposição em mais esta aventura.

- 0 -

CAPÍTULO I

Introdução

A descoberta de Muller(1927) que raios X poderiam induzir variabilidade genética, deu origem a um novo campo de estudo que em nossos dias tem uma importância muito grande. Este campo de estudos reúne contribuições de áreas como Física, Biologia e - Estatística. A contribuição da Estatística é principalmente na criação de modelos probabilisticos de dose-efeito e também na utilização de métodos para estimar os parâmetros destes modelos a partir de experimentos realizados com os diferentes sistemas biológicos. Devido a existência de um número praticamente ilimitado de sistemas biológicos diferentes e de um grande número de diferentes efeitos biológicos induzidos pela radiação é impossível produzir modelos gerais que podem ser usados para as diferentes situações. Por esta razão os modelos existentes na literatura internacional são sugeridos para um certo número de sistemas biológicos semelhantes, mamíferos por exemplo e para um tipo de efeito, mutações dominantes letais, por exemplo. Em geral, estes modelos são sugeridos por resultados experimentais ou derivados a partir de uma teoria e confirmado por experimentos. Como é de se esperar um determinado modelo é usado até que algum fato (teórico ou empírico) contradiz as -] -

suposições básicas do modelo e aí um novo modelo é proposto.

O Capítulo II desta tese mostra este fato acima através de uma análise bibliográfica. Na última seção do Capítulo II, argumentamos a necessidade de se derivar um novo modelo para mutações letais dominantes induzidas por radiação.

No Capítulo III nos derivamos um novo modelo para mutações letais dominantes. A maneira pela qual o modelo é derivado permite separar os parâmetros envolvidos em dois conjuntos. O primeiro formado por parâmetros relacionados com a qualidade da radiação, com o mecanismo de reparo das células. O segundo é formado por parâmetros que relacionam o dano produzido pela radiação (quebras duplas ou simples) e o efeito final observável (mutação letal dominante). Este fato permite a utilização do mesmo modelo para outros efeitos biológicos mudando apenas a interpretação de alguns parâmetros.

No Capítulo IV, aplicamos o modelo a uma série de experimentos. Estas análises mostram que a interpretação dos parâmetros obtida em nossa derivação é consistente com teorias recentes sobre mecanismo de reparo (Resnick, 1976, 1981). Ainda neste capítulo mostramos, por meio de aplicações, que a interpretação dos parâmetros α e β do modelo quadrático para sobrevivência de células (S= $e^{-\alpha D - \beta D^2}$) dada por Leenhouts e Chadwick (1978), não é consistente com as informações acima.

No Capítulo V, é discutido o problema do ajuste do modelo derivado no Capítulo III. Este modelo é não linear nos parâmetros e portanto as estimativas dos parâmetros são obtidas por processos iterativos. Estes processos exigem programas especiais de computador e uma certa habilidade do pesquisador no uso destes pro-

- 2 -

gramas. Em muitas situações o processo iterativo não converge e em outras situações a solução obtida corresponde a um mínimo local quando o que se procura é um mínimo absoluto. Com o objetivo de determinar processos de estimação que não apresentam este problema e que além disto, os cálculos envolvidos possam ser feitos por meio de programas simples de computador ou mesmo por meio de calculadoras portáteis nós conseguimos uma solução do problema que consiste em linearizar o modelo por uma transformação e corrigir o viez introduzido pela transformação por meio de um sistema de pesos. É mostrado no Capítulo V, que este processo apresenta as vantagens:

- (a) produzir resposta única, o que não acontece com o processo clássico;
- (b) os cálculos necessários para obtenção das estimativas podem ser feitos por calculadoras portáteis comuns ou com a utilização de programas simples de computador, gastando um tempo muito reduzido;
- (c) o grau de aproximação entre as estimativas obtidas por este processo iterativo é satisfatório do ponto de vista prático.

CAPITULO II

UMA ANÁLISE DOS MODELOS DE DOSE-RESPOSTA USADOS PARA DESCREVER OS EFEITOS GENÉTICOS DA RADIAÇÃO.

Este capítulo consiste de uma revisão bibliográfica dos principais modelos de dose-resposta utilizados em radiobiologia. Os modelos são apresentados em uma ordem cronológica e a terminologia utilizada é a da época correspondente. A literatura é muito extensa e confusa porque envolve contribuições de pesquisadores de várias áreas de estudo os quais utilizam linguagem própria de suas áreas. Esta revisão representa a nossa interpretação da literatura consultada e não pretende ser completa.

2.1. Efeito Genético e os primeiros modelos de dose-resposta.

De acordo com terminologia utilizada por Müller (1954a e 1954b), reutilizada por Wolff (1961 e 1967) e Abrahamson e Wolff (1976), os efeitos genéticos induzidos por radiação podem ser classificados genericamente em intragênicos e intergênicos. O primeiro tipo é obtido quando ligações químicas são quebradas e a estrutura molecular do gene é modificada (mutações gênicas). O segundo tipo é obtido quando cromossomos são quebrados e reunidos em novas configurações (aberrações cromossômicas). Embora estes dois tipos de efeitos sejam estruturalmente diferentes eles podem, em muitas -4situações, produzir efeitos fenotípicos idênticos. Por exemplo, a adição ou perda de um par básico de DNA, que de acordo com a definição acima é um efeito intragênico, pode conduzir a um efeito fenotípico idêntico a uma aberração cromossômica. Este problema intensificou o estudo de curvas de dose-resposta porque diferenças de estrutura destes dois tipos de efeitos poderiam refletir diferenças na relação dose-efeito e isto poderia trazer um melhor entendimento do mecanismo envolvido.

Os primeiros modelos de dose-resposta que apareceram na literatura desde Müller (1927), foram sugeridos por dados experimentais e não derivados a partir de alguma teoria radiobiológica da ação da radiação sobre células. O modelo linear Y= a+bD foi sugerido para mutações e alguns tipos de aberrações cromossômicas e o modelo quadrático Y= a+cD² para a maior parte das aberrações cromossômicas e algumas mutações letais. Nestes modelos, Y representa a taxa de ocorrência do efeito genético considerado, D representa a dose administrada no sistema biológico utilizado e a, b e c são parâmetros do modelo. As figuras 2.1 e 2.2 mostram alguns exemplos.



Figura 2.1 - Mutações visíveis em Drosófila (Wolff, 1961).

- 5 -



<u>Figura 2.2</u> - Aberrações cromossômicas em drosófila induzidas por raios X. Curva A representa aberrações produzidas por quebras simples; curva B representa aberrações produzidas por quebras duplas. (Wolff, 1961).

Embora um grande número de experimentos com os mais variados sistemas biológicos (cevada, dente de leão, drosófila, fungo, camundongos, etc.) parecessem confirmar a idéia acima, o mecanismo da ação da radiação sobre as células não era suficientemente entendido a ponto de justificar radiologicamente porque para um tipo de efeito a curva deveria ser linear e para outro deveria ser quadrática. Um passo a mais no sentido de entender melhor este mecanismo foi conseguido com experimentos realizados na decada de 1940. Estes experimentos mostraram que a taxa de ocorrência dos efeitos que obedecem a uma relação linear com a dose, não depende da intensidade da radiação, isto é, se um determinado sistema é irradiado, por exemplo, com 150r, a resposta independe da taxa com a qual a radiação é dada (30r/min, 40r/min, 100r/min, etc.), enquanto que para efeitos que obedecem a uma relação quadrática com a dose a taxa de ocorrência varia com a intensidade da dose. As figuras 2.3 e 2.4 ilustram esta afirmação.

- 6 -



<u>Figura</u> 2.3 - Independência de aberrações produzidas por quebras simples com relação a taxa de radiação. O sistema foi irradiado com 150r. (Wolff, 1961)



<u>Figura 2.4</u> - Dependência de aberrações produzidas por quebras duplas com relação a taxa de radiação. Curva A, 160r/min; curva B, 20r/min; curva C 2.7r/min. (Wolff, 1961)

Esta experiência acumulada produziu uma primeira tentativa de entendimento do mecanismo envolvido na ação da radiação sobre as células, conforme o expressa a afirmação abaixo (veja por exemplo Wolff, 1961).

- 7 -

Mutações são produzidas por uma única ionização ou por um conglomerado de ionizações ocorridas dentro ou perto do gene. Isto equivale dizer que mutações constituem o efeito "one-hit". Aberrações cromossômicas e mutações dominantes letais são produzidas por quebras em cromossomas. Se o efeito é causado por uma única quebra, ele é classificado como "one-hit". Se o efeito é causado por mais de uma quebra e a consequente reunião (soldadura) dos fragmentos em novas configurações, ele é classificado como "multi-hit".

A taxa de ocorrência dos efeitos "one-hit" é proporcional à dose, e portanto a curva de dose-resposta será linear, enquanto que para os efeitos "multi-hit" a taxa de ocorrência é proporcional ao quadrado da dose, produzindo curvas de dose-resposta do tipo quadrático.

Embora estes modelos simples se ajustem os dados experimentais para o campo de doses considerado em cada experimento, eles não podem ter significado biológico para o campo de valores possíveis de dose (de zero a infinito). Isto porque desde que Y representa a proporção de unidades experimentais que apresentam o efeito genético, este valor não pode ser maior do que um. Em outras palavras, as curvas de dose-resposta deveriam ter um plateaux para doses grandes.

Modelos com esta propriedade foram derivados a partir de teorias que descrevem a ação da radiação sobre as células. Uma das mais importantes é a "Teoria do Alvo". Embora esta teoria tenha sido introduzida na literatura na década de 1920, ela foi muito bem formalizada por Lea (1946).

- 8 -

2.2. Teoria do Alvo

O sumário que iremos apresentar, embora englobe uma bibliografia extensa, tem como suporte a seguinte referência: Lea (1947), Atwood and Norman (1949), Hollaeender (1954), Hutchinson e Pollard (1961).

Os modelos de dose-resposta derivados sob esta teoria são baseados em duas suposições gerais, uma biológica e outra probabilística.

Suposição Biológica

O sistema biológico em estudo tem um certo número de alvos (targets) os quais contém um grande número de unidades idênticas, cada uma capaz de uma determinada função. Quando o sistema é irradiado, um certo número destas unidades vai ser atingido, tornando-se incapaz de exercer suas funções, e um efeito observável (mutação, aberração cromossômica, ou morte de uma célula) será produzido.

Suposição Probabilistica

O número de unidades que perdem a função (evento simples) quando o sistema é irradiado com uma dose D, segue a distribuição de Poisson com média α D onde α é a probabilidade de ocorrência de um evento simples por unidade de dose de radiação. O parâmetro α indica a taxa de ação da radiação.

O número de eventos simples necessário para produzir um efeito biológico, determina um modelo de dose-efeito específico. Portanto existem na literatura vários modelos. Destes os mais importantes em termos de uso são:

- 9 -

(i) Modelo Exponencial (um alvo, "one-hit")

O sistema biológico tem um alvo, o qual precisa ser danificado para produzir o efeito genético no sistema. O alvo é danificado quando ocorre pelo menos um evento simples. Usando a suposição probabilística acima, temos:

$$Y = 1 - e^{-\alpha D},$$
 (2.1)

onde

Y representa a taxa de ocorrência do efeito biológico em estudo corrigida pelo controle;

 α e D foram definidos acima.

Se o efeito em estudo é letal, a relação dose-resposta é usualmente expressa em termos da probabilidade esperada de sobrevivência S, corrigida pelo controle, Isto é:

$$S = e^{-\alpha D}.$$
 (2.2)

Uma outra maneira de relacionar <u>S</u> e <u>A</u> sem fazer uso da "Teoria do Alvo" \hat{e} , por meio da equação diferencial.

$$\frac{\mathrm{dS}}{\mathrm{S}} = -\alpha \mathrm{dD} \tag{2.3}$$

A equação (2.3) é inspirada em resultados experimentais e expressa a regra de "efeitos iguais para doses iguais", isto é, quantidades iguais de radiação aplicadas sucessivamente produzem acréscimos iguais ao efeito total ou, em outras palavras, quantidades separadas de radiação agem independentemente uma das outras. Este fato traz uma conclusão muito importante. A freqüência de ocorrência de efeitos genéticos que seguem o modelo exponencial, não depende da taxa com a qual o sistema biológico em estudo é irradiado. Portanto, se o cientista quer verificar se um determinado efeito genético é produzido por uma única ionização (passagem de uma única partícula de radiação) e não pela interação de duas ou mais ionizações, ele deve realizar experimentos que permitam concluir que

- (a) a curva dose-resposta é exponencial;
 - (b) o efeito de uma dada dose não depende da intensidade (taxa da dose) com a qual ela é administrada ou da maneira pela qual ela é fracionada.

Os critérios (a) e (b) foram usados por vários geneticistas para verificar que mutações dominantes letais induzidas por raios X em oócitos em estágio 14 de "Drosophila Melanogaster" (terminologia de King (1957)), são produzidas por uma única jonização (one-hit), (ver por exemplo Sankaranarayanan, 1969). Portanto os efeitos genéticos que a priori eram pensados produzir uma curva dose-resposta linear de acordo com esta explanação seguem um modelo exponencial e a relação linear entre o efeito e dose pode agora, ser interpretada como uma aproximação no caso de um campo limitado de doses. Assim moléculas de enzima ou de ácido nucleico, muitos vírus, bactérias e células haploides são inativadas de acordo com o modelo exponencial. Mutações e aberrações cromossômicas produzidas por quebras simples também seguem o modelo exponencial. Este modelo é usado até hoje com muita frequência. O que atualmente se procura é uma melhor interpretação do parâmetro α em termos de novas descobertas radiobiológicas.

(ii) Modelo Multi-hit

O sistema biológico contém um alvo, o qual precisa ser danificado para produzir o efeito genético. O alvo é danificado

- 11 -

quando ocorrem <u>n</u> ou mais eventos simples (n hits). Usando a suposição probabilística do início desta seção, temos:

$$Y = \sum_{j=n}^{\infty} \frac{e^{-\alpha D} (\alpha D)^j}{j!} , \qquad (2.4)$$

a expressão correspondente para sobrevivência é dada por:

$$S = e^{-\alpha D} \sum_{j=0}^{n-1} \frac{(\alpha D)^j}{j!}$$
(2.5)

onde S, Y e α foram definidos para o modelo exponencial.

Este modelo seria apropriado para situações em que o efeito é produzido quando um cromossoma específico é quebrado em <u>n</u> posições diferentes. Este modelo é de interesse teórico e muito pouco uso tem sido feito dele na literatura.

(iii) Modelo de Multiplo Alvo (multi-target)

O sistema biológico contém <u>n</u> alvos e todos devem ser danificados para que o efeito genético seja produzido. Cada alvo é danificado quando ocorre pelo menos um evento simples. Portanto, de acordo com a suposição probabilística acima temos

$$Y = (1 - e^{-\alpha D})^{n}.$$
 (2.6)

Quando o efeito de interesse é letal o modelo é expresso em termos da sobrevivência,

$$S = 1 - (1 - e^{-\alpha D})^n.$$
 (2.7)

S, Y e α foram definidos para o modelo exponencial.

Estas duas expressões são mencionadas na literatura internacional como modelo "multi-target" ou modelo "one-hit, multitarget". O número n, que biologicamente é interpretado com o número de targets, matematicamente é o coeficiente linear (intercepto) da reta assíntota para D $\rightarrow \infty$ e junto com o parâmetro α constitue uma medida da largura do ombro que a curva faz na região de dose pequenas. Formalmente, se $(1 - e^{-\alpha D})^n$ da equação (2.7) é expandido, vemos que quando D cresce os termos contendo $e^{-2\alpha D}$, $e^{-3\alpha D}$,..., etc., tornam-se desprezíveis em comparação com o termo ne^{- αD}. Assim para doses grandes (D $\rightarrow \infty$) podemos escrever

 $\ln S = \ln n(-\alpha D)$

Como vemos, quando extrapolamos esta reta para D=0 encontramos S=n e por esta razão a literatura internacional, muitas vezes referese ao número <u>n</u> como "extrapolation number". A expressão (2.6) para n=2 tem sido usada para aberrações cromossômicas que são produzidas pela interação de duas quebras (Wolff, 1962). A expressão (2.7) para n=2 tem sido usada com muita frequência para mutações letais medidas através da sobrevivência de células. (Veja por exemplo King, 1957). Desta forma a relação quadrática sugerida no início deste capítulo para estes tipos de efeito, pode agora ser interpretada como uma aproximação das expressões (2.6) e (2.7).

O valor n=2 é justificado pelo fato de que a maior parte dos sistemas biológicos, estudados nestes experimentos, é de diplóides e, portanto, identificando-se cada filamento cromossômico com um alvo, o número de alvos será igual a 2.

Quando examinamos a literatura, verificamos que em muitas situações as equações (2.6) e (2.7) para n=2, foram utilizadas

- 13 -

com sucesso em termos de ajuste e consistência com informações constantes da literatura, mas em algumas outras situações parece não haver uma boa concordância entre o modelo e os dados. (Bender e Wolff, 1961; Bender e Cooch, 1961; Tym e Todd, 1964 e outros).

Nestes casos, uma tentativa utilizada por muitos pesquisadores, foi a de usar <u>n</u> como parâmetro livre e estimá-lo a partir dos dados. Quase sempre se obtinha valores muito grandes para <u>n</u>, o que era inconsistente com a interpretação biológica dada para n (número de alvos).

Outra tentativa foi usar algumas extensões da expressão (2.7), mas estas apresentavam a inconveniência de conter um grande número de parâmetros. Abaixo apresentamos algumas delas.

$$S = 1 - \prod_{i=1}^{n} (1 - e^{-\alpha} i^{D})$$
(2.8)

$$S = \prod_{i=1}^{m} (1 - (1 - e^{-\alpha} i^{D})^{n})$$
(2.9)

$$S = \left[1 - (1 - e^{-\alpha D})^n\right]^m$$
(2.10)

A expressão (2.8) é aplicável quando as sensibilidades dos alvos são diferentes. As expressões (2.9) e (2.10) são aplicáveis quando o sistema biológico é composto de m partes e para sobreviver o sistema, cada uma das partes deve sobreviver.

Na década de 1960, com o avanço da técnica citológica, o uso de mamíferos, principalmente roedores, em radiobiologia foi intensificado e o número de situações nas quais o modelos (2.6) e (2.7) e suas extensões não apresentavam bons resultados foi aumentado. Vários experimentadores notaram que tanto os dados relativos a aberrações cromossômicas produzidas pela interação de duas quebras quanto aqueles referentes a mutações letais, pareciam apresentar uma característica comum responsável pelo não ajuste aos modelos citados. Isto pode ser resumido da seguinte forma:

Para as equações (2.6), (2.7) e suas extensões a tangente à curva para D=0 é paralela ao eixo de doses, isto é para valores de dose muito pequenas não há efeito. Isto está de acordo com o princípio de que uma certa quantidade de doses tem que ser acumulada até que o efeito apareça. Porém os dados experimentais para os dois tipos de efeitos mencionados, sugerem que a tangente à curva de dose-resposta tenha um coeficiente angular diferente de zero para D=0.

Com esta motivação apareceu na década de 1960 o modelo de dois componentes que é o assunto da próxima seção.

2.3. Modelo de dois componentes

Este modelo é utilizado para mutações letais dominantes e aberrações cromossômicas e porisso iremos discutir o seu uso separadamente para estes dois tipos de efeitos biológicos.

Mutações Letais

Surgiram na literatura duas correntes de radiobiologistas, uma usando argumentos biológicos (veja por exemplo Bender e Wolff, 1961), e outra usando argumentos radiológicos (veja por exemplo Wideroe, 1966), as quais apresentaram um mesmo modelo de doseresposta para substituir a equação (2.7). Este modelo tem um coeficiente angular diferente de zero para D=0.

O argumento usado pelo primeiro grupo é o seguinte:

- 15 -

"Os modelos obtidos a partir das suposições básicas da "Teoria do Alvo" envolvem um único processo de inativação. Por exemplo; para os modelos (2.6), (2.7) e suas extensões, o sistema só é inativado quando todos os <u>n</u> alvos são danificados. Estudos citológicos mostram que células podem ser inativadas, por um processo misto, isto é, quando somente um alvo é danificado (processo simples) ou quando todos os alvos são danificados (processo múltiplo) (Bender e Wolff, 1961). Então se S₁ = $e^{-\alpha D}$ expressa a sobrevivência pelo processo simples, e S₂ = 1 - $(1 - e^{-\beta D})^n$ representa a sobrevivência pelo processo múltiplo, a sobrevivência depois do sistema ser irradiado com dose D, é dada por:

$$S = S_1 \cdot S_2 = e^{-\alpha D} (1 - (1 - e^{-\beta D})^n).$$
 (2.11)

Este modelo é chamado na literatura de modelo de dois componentes. Embora o modelo seja apresentado para <u>n</u> qualquer ele tem sido usado, na maioria das vezes com n=2. O parâmetro <u>a</u> é interpretado como coeficiente de indução do processo simples ("one-target") e <u>β</u> coeficiente de indução do processo múltiplo ("multi-target")".

O argumento usado pelo segundo grupo é o seguinte:

"Mutações letais são produzidas somente pelo processo múltiplo ("multi-target"), porém a irradiação é composta de dois componentes, com diferentes densidades de ionização. O primeiro, designado pelo parâmetro α , é o componente de alta densidade (High LET, linear energy transfer) e o segundo, designado pelo parâmetro β , é o componente de baixa densidade (low LET). Experimentos realizados com células irradiadas com radiações que contém somente um destes componentes têm mostrado que o componente α produz uma curva de sobrevivência exponencial, isto é,

$$S_{\alpha} = e^{-\alpha D}$$

enquanto que o componente β produz uma curva de sobrevivência do tipo multi-alvo, isto é,

$$S_{\beta} = 1 - (1 - e^{-\beta D})^{n}$$
.

Quando as células são irradiadas com um tipo de radiação composta dos dois componentes, a relação de sobrevivência é dada por

$$S = e^{-\alpha D} (1 - (1 - e^{-\beta D})^{n})$$

o qual foi referido antes como o módelo de dois componentes (expressão (2.11))".

Embora estes dois argumentos conduzam ao mesmo modelo, a interpretação dos parâmetros é diferente e tem implicações biológicas diferentes.

A interpretação dada pelo primeiro grupo parece ser mais consistente com evidências citológicas. Com esta interpretação o modelo de dois componentes para n=2 tem sido usado com muita frequência até recentemente para estudo de dominantes letais induzidos por radiação (ver por exemplo Sankaranayanan,(1969a)).

Aberrações Cromossômicas

Para este tipo de efeito, Neary (1965) elaborando um pouco mais o argumento de que a radiação é composta de dois componentes e usando informações radiológicas recentes para a época, derivou matematicamente o modelo de dois componentes para n=2. Embora o modelo foi derivado especificamente para aberrações cromossômicas Neary (1965) sugeriu que o modelo poderia ser utilizado para mutações letais dominante, porque estas são produzidas por quebras nos cromossomas.

De acordo com a derivação matemática de Neary (1965) a expressão

$$S = e^{-\alpha D} (1 - (1 - e^{-\beta D})^2)$$
 (2.12)

representa a probabilidade de sobrevivência de um específico sítio dentro do núcleo da célula. Por outro lado, existe evidência considerável que a inativação de células está relacionada com quebra de cromossomas o que pode ocorrer em qualquer de vários sítios localizados no núcleo da célula (Wolff, 1961, 1967; Sankaranarayanan, 1969). Portanto o modelo de dois componentes embora apropriado para aberrações cromossômicas específicas, ele não o é para mutações letais dominantes. Com o objetivo de contornar este problema, isto é, apresentar um modelo que dê a probabilidade de sobrevivência de pelo menos um sítio entre todos aqueles relacionados com a inativação da célula, foi sugerido o modelo quadrático cuja expressão é dada abaixo

$$S = e^{-aD - bD^2}$$
(2.13)

onde S é a sobrevivência esperada corrigida pelo controle, D é a dose administrada, a e b são parâmetros cuja interpretação será dada a seguir.

A expressão (2.13) foi derivada de três maneiras diferentes respectivamente por Kellerer e Rossi (1972), Douglas e Fowler (1976) e Leenhouts e Chadwick (1978). Embora as três deduções são

- 18 -

baseadas em argumentos diferentes elas conduzem a mesma interpretação dos parâmetros a e b, que é a seguinte:

- a: representa o coeficiente de quebras duplas produzidas pe la mesma partícula radioativa;
- b: representa o coeficiente de indução de quebras duplas produzidas por duas partículas radioativas independentes.

Isto é uma consequência do fato que as três derivações do modelo quadrático partem da mesma suposição básica, de que a inativação da célula é relacionada com um único tipo de dano, quebra dupla. Portanto o modelo quadrático obtida a partir desta suposição, assim como o modelo de dois componentes (expressão (2.12)) derivado por Neary (1965) não consideram a existência de um processo misto de inativação de células, isto é, não levam em conta que a célula pode ser inativada a partir de quebras simples (quando há perda de fragmentos) ou a partir de quebras duplas (quando fragmentos quebrados se reunem em novas configurações).

2.4. Comentários finais

Quando examinamos a literatura radiobiológica com ênfase na utilização do modelo de dois componentes e do modelo quadrático para relacionar mutação letal dominante com dose de radiação, verificamos que na maior parte das situações experimentais os dois modelos se ajustam igualmente bem aos dados observados, mas quando extrapolamos os resultados para doses pequenas, onde o interesse prático é estimar riscos, obtemos resultados muito diferentes (Peres e Koo, 1981). Além disso os modelos são derivados independentemente tornando-se impossível relacioná-los a fim de decidir qual dos dois modelos seria apropriado para um específico efeito biológico.

Por outro lado, mesmo aceitando que o modelo quadrático é apropriado para mutações letais dominantes, a interpretação dada aos parâmetros, a qual é uma conseqüência das suposições básicas utilizadas, não é consistente com descobertas recentes sobre o mecanismo de reparo das células segundo o qual estas são capazes de reparar os danos produzidos pela radiação antes que o efeito observável seja produzido.

Nos capítulos 3 e 4 desta tese apresentamos a dedução de um modelo para mutações letais dominantes, induzidas por radiação o qual pode ser aproximado ao modelo quadrático, porém com uma nova interpretação dos parâmetros, a qual é consistente com as descobertas recentes sobre mecanismo de reparo. Além disso o processo probabilístico utilizado permite concluir que o modelo de dois componentes, com uma nova interpretação dos parâmetros, é apropriado para aberrações cromossômicas específicas e não é apropriado para mutações letais dominantes. Uma outra conclusão importante, é que podemos estender o uso do modelo obtido para outros efeitos biológicos, induzidos pela radiação, tais como câncer.

CAPÍTULO III

UM MODELO PARA SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS

3.1. Introdução

Conforme foi mencionado anteriormente, quando o efeito biológico de interesse é mutação letal é conveniente expressar a relação dose-efeito por meio de curvas de sobrevivência. Neste capítulo derivamos um modelo para sobrevivência de células,o qual não apresenta nenhum dos inconvenientes apresentados no final do capítulo anterior.

A dedução matemática do modelo é orientada em uma ordem cronológica de eventos que ocorrem desde a chegada das partículas radioativas no núcleo da célula até a produção do efeito biológico de interesse, que neste caso é a perda da habilidade que a célula possue, de se reproduzir, isto é, "morte" da célula. Neste processo distinguimos duas etapas. Na primeira ocorrem uma série de eventos que descrevem toda a ação da radiação sobre a célula, até a produção de um defeito na estrutura celular, o qual com certa probabilidade irá bloquear a capacidade reprodutiva da célula. Com base em evidências experimentais discutidas no capítulo anterior assumiremos que quebras simples na estrutura cromossômica ou interação de duas quebras simples, uma em cada uma das cromátides (quebras duplas) constituem o defeito estrutural que com certa probabilidade anulam a habilidade reprodutora da célula, ou em outras - 21 -

palavras, constituem o defeito estrutural responsável pela "morte" da célula. Os eventos que ocorrem desde a produção do defeito estrutural até o efeito biológico observável constituem a segunda etapa. Portanto teremos um conjunto de parâmetros relacionados com a primeira etapa e outro conjunto de parâmetros relacionados com a segunda. Estes parâmetros serão definidos em um sequência durante a derivação do modelo.

Veremos no final do capítulo que a identificação destas duas etapas descritas acima permite estender a aplicação do mesmo modelo a outros efeitos biológicos como câncer, mutações, etc. A suposição básica é que todos estes éfeitos biológicos são produzidos a partir do mesmo defeito estrutural produzido pela ação da radiação no núcleo da célula.

As idéias discutidas acima são formalizadas a seguir. As suposições radiobiológicas utilizadas na derivação do modelo são suportadas por evidências experimentais que foram discutidas no Capítulo 2.

3.2. O Modelo Matemático

Consideremos as seguintes suposições

- (a) No núcleo da célula existem N sítios tais que quando afetados podem causar a "morte" da célula.
- (b) Quebras simples ou quebras duplas são os danos induzidos pela radiação, em cada sítio, considerados críticos para a "morte" da célula.
- (c) Embora uma quantidade pequena destas quebras são produzidas pela ação direta da radiação sobre as moléculas de DNA que compõe os cromossomas, a maioria destas quebras são produzidas por

- 22 -

ação indireta através de radicais de água que são criados pela radiação em regiões muito perto do DNA.

- (d) As quebras duplas, uma em cada cromátide, podem ser produzidas por dois modos distintos de ação da radiação:
 - (i) as duas quebras, uma em cada cromátide, são produzidas pela passagem de uma mesma partícula radioativa em uma vizinhança pequena do DNA.
 - (ii) as duas quebras, uma em cada cromátide, são produzidas pe la ação de duas partículas radioativas independentes pas sando em uma vizinhança peguena do DNA. (Veja Figura 3.1).



Figura 3.1 - Dois modos de ação da radiação para a produção de quebras duplas.

(e) O número de partículas radioativas que atingem um sítio, as quais são capazes de produzir quebras seguem a uma distribuição de Poisson com média ωD , onde <u>D</u> é a dose em uma determinada unidade de medida (rads em geral) e $\underline{\omega}$ é a probabilidade por unidade de dose que uma partícula radioativa passe perto do DNA.

A notação será introduzida durante a derivação do mode-

Seja <u>k</u> a probabilidade que uma partícula radioativa passando nas vizinhanças do DNA em um sítio, produza uma quebra em uma cromátide. Este parâmetro depende da qualidade da radiação (tipo de raio, γ , X, etc.) e da situação química no núcleo da célula.

Seja <u>Ω</u> a probabilidade que uma partícula radioativa passando perto das moléculas de DNA que compõe a "primeira" cromátide passe também perto daqueles que compõe a "segunda" cromátide, isto é, a probabilidade de uma mesma partícula ter potencial para produzir quebras duplas. Este parâmetro depende da qualidade da radiação e também da geometria das moléculas de DNA.

Portanto, depois da aplicação de uma dose D, o número médio de partículas radioativas com potencial para produzir quebras em uma cromátide, mas não na outra é $(1-\Omega)\omega D$ e o número médio de partículas radioativas com potencial para produzir quebras nas duas cromátides é $\Omega\omega D$. Assim após o sistema ter sido submetido a uma dose D de radiação, a probabilidade por sítio, de termos <u>x</u> partículas radioativas que podem produzir quebras na "primeira" cromátide, mas não na "segunda", <u>y</u> partículas radioativas que podem produzir quebras na "segunda" cromátide mas não na "primeira" e <u>z</u> partículas radioativas que podem produzir quebras simultâneas nas duas

$$P_{x,y,z} = \frac{e^{-2(1-\Omega)\omega D}((1-\Omega)\omega D)^{x+y} e^{-\Omega\omega D}(\Omega\omega D)^{z}}{x' y' z'}$$
(3.1)

Seja P₁ a probabilidade, por sítio, que somente uma das duas cromátides apresente quebra (quebra simples) e P₂ a probabilidade, por sítio, que as duas cromátides apresentam quebras (quebra dupla). Então temos:

- 24 -

$$P_{1} = 2 \sum_{x=0}^{\infty} \sum_{y=0}^{\infty} \sum_{z=0}^{\infty} P_{x,y,z} \left[1 - (1-k)^{x+z} \right] \left[(1-k)^{y+z} \right]$$

е

$$P_{2} = \sum_{x=0}^{\infty} \sum_{y=0}^{\infty} \sum_{z=0}^{\infty} P_{x,y,z} \left[1 - (1-k)^{x+z} \right] \left[1 - (1-k)^{y+z} \right].$$

Usando a expressão para $P_{x,y,z}$ dada em (3.1) e executando as somas indicadas temos as seguintes expressões:

$$P_{1} = 2(e^{-k\omega D} - e^{-2k\omega D + k^{2}\Omega\omega D})$$
(3.2)

е

$$P_{2} = 1 - e^{-k^{2}\Omega\omega D} + e^{-k^{2}\Omega\omega D} (1 - e^{-k\omega D + k^{2}\Omega\omega D})^{2}.$$
 (3.3)

A expressão (3.3) pode ser escrita como

 $P_2 = 1 - e^{-aD}(1 - (1 - e^{-bD})^2),$

onde a = $k^2 \Omega \omega$ e b = $k(1-k\Omega)\omega$. Portanto $1-P_2$ é o modelo de dois componentes para sobrevivência de células apresentado no Capítulo 2. Gostariamos de enfatizar aqui que mesmo sob a suposição de que o único defeito estrutural que conduz a "morte" da célula é a quebra dupla, a expressão $1-P_2$ não seria apropriada para a sobrevivência da célula, pois ela representa apenas a probabilidade de que um sitio não tenha quebra nas duas cromátides.

Procurando nos localizar na seqüência de eventos que ocorrem desde o início da radiação atê a produção do efeito biológico final ("morte" da célula), podemos dizer que a obtenção das expressões (3.2) e (3.3) nos coloca no ponto em que o defeito estrutural (quebras duplas ou simples) está produzido. Para que estas

- 25 -

quebras constituam defeito estrutural com potencial para a produção do efeito final é preciso que permaneçam não reparadas (não reconstituídas), isto é, é preciso que resistam a capacidade da célula de reparar o dano produzido. Portanto, em seguida definiremos parâmetros relacionados com o mecanismo de reparo.

Seja f_o a proporção de quebras duplas não reparadas. Seja f₁ a proporção de quebras simples na "primeira" cromátide que não são reparadas antes que uma quebra na "segunda" cromátide converta esta em quebra dupla. Seja f₁^{*} a proporção de quebras simples não reparadas com potencial para causar "morte" da célula. Estes parâmetros dependem da atividade metabólica da célula, do estágio em que a célula se acha e do tempo disponível para o reparo.

Com estes elementos podemos então calcular o número médio de sítios com defeito estrutural crítico, isto é, com quebras simples ou duplas que não são reparadas e portanto que estão prontos para produzir o efeito biológico final ("morte" da célula). Este número médio é obtido introduzindo nas expressões (3.2) e (3.3) os parâmetros que acabamos de definir e é dado por:

$$N \left[f_{0} (1 - e^{-k^{2} \Omega \omega D}) + f_{0} f_{1} e^{-k^{2} \Omega \omega D} (1 - e^{-k(1 - k\Omega) \omega D})^{2} + 2f_{1}^{*} (e^{-k\omega D} - e^{-2k\omega D + k^{2} \Omega \omega D}) \right].$$
(3.4)

A expressão (3.4) nos coloca no final da primeira etapa do processo de ação de radiação sobre a célula, isto é, no ponto em que o defeito estrutural crítico é produzido. A seguir definiremos parâmetros relacionados com a segunda etapa do processo.

- 26 -

Seja p₁ probabilidade de que a "morte" da célula seja causada por quebras em uma única cromátide (quebras simples). Seja p₂ a probabilidade de que a "morte" da célula seja causada pela interação de duas quebras uma em cada cromátide (quebras duplas). Estes parâmetros dependem do tipo de célula e do sistema biológico em estudo. Diferenças nas condições da radiação não devem refletir nenhuma mudança nestes parâmetros. Introduzindo estes novos parâmetros na expressão (3.4) podemos calcular o número médio de sítios que causam a "morte" da célula, o qual é dado por

$$u = N \left[p_2 f_0 (1 - e^{-k^2 \Omega \omega D}) + p_2 f_0 f_1 e^{-k^2 \Omega \omega D} (1 - e^{-k(1 - k\Omega) \omega D})^2 + (3.5) + 2p_1 f_1^* (e^{-k\omega D} - e^{-2k\omega D + k^2 \Omega \omega D}) \right]$$

Finalmente se assumirmos que o número de sítios que causam a "morte" da célula segue uma distribuição de Poisson com média μ, obtemos a seguinte expressão para a probabilidade esperada de sobrevivência <u>S</u> corrigida pelo controle.

$$S = e^{-\mu}$$
 (3.6)

onde μ é dado em (3.5).

Examinando cuidadosamente a expressão (3.6) verificamos que é impossível do ponto de vista prático ajustar esta função a dados experimentais porque envolve um número muito grande de parâmetros. Portanto o próximo passo é aproximar esta função a uma expressão mais simples com um número reduzido de parâmetros.

Para valores pequenos de k ω D o segundo membro da expressão (3.5) pode ser aproximada tomando-se os primeiros termos do desenvolvimento em série de Taylor dos exponenciais para a seguinte expressão reduzida

$$\mu \simeq N \left[p_2 f_0 k^2 \Omega \omega D + p_2 f_0 f_1 (1 - k^2 \Omega \omega D) (k (1 - k\Omega) \omega D)^2 + 2p_1 f_1^* ((1 - k\omega D) - (1 - 2k\omega D + k^2 \Omega \omega D)) \right].$$
(3.7)

Desprezando o termo em $(k \omega D)^3$ e substituindo na expressão (3.6) μ por este valor temos

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$
(3.8)

onde

$$\alpha = N(2p_{1}f_{1}^{*} k(1-k\Omega)\omega + p_{2}f_{0}k^{2}\Omega\omega)$$

$$\beta = N(p_{2}f_{0}f_{1}k^{2}(1-k\Omega)^{2}\omega^{2}).$$
(3.9)

A expressão (3.8) tem apenas dois parâmetros; estes parâmetros constituem funções dos parâmetros originais que apresentam interpretação biológica coerente com todo o processo de ação da radiação sobre as células como veremos abaixo; esta expressão conserva propriedades importantes do modelo original (ver comentários gerais (3.5)); esta expressão se ajusta muito bem a dados experimentais de vários sistemas biológicos (drosófila, rato, etc.) (Ver capítulo 4); as variações obtidas nas estimativas dos parâmetros α e β , quando comparamos diferentes situações experimentais, (radiação contínua e radiação fracionada, diferentes tratamentos administrados após a radiação e que ativam o mecanismo de reparo) são consistentes com a interpretação dada a estes parâmetros a qual é consequência da maneira como α e β estão relacionados com os parâmetros anteriores. Isto não acontece com a interpretação de α e β dada por outros autores que tem usado o modelo (3.8) antes. (Ver Capítulo 4).

3.3. Interpretação dos parâmetros $\alpha \in \beta$.

O parâmetro α , definido em (3.9) dá a contribuição, ao efeito biológico observável, correspondente a quebras em uma única cromátide ou interação de duas quebras (uma em cada cromátide) produzidas por uma mesma partícula radioativa. Em outras palavras, α dá a contribuição de defeitos na estrutura do núcleo da célula produzidos pela ação de uma única partícula radioativa. Isto é melhor entendido se examinarmos cada termo envolvido na definição de α .

O primeiro termo de α pode ser escrito como soma de duas parcelas, isto é,

$$2p_{1}f_{1}^{*} k(1-k\Omega)\omega = 2p_{1}f_{1}^{*} k(1-\Omega)\omega + 2p_{1}f_{1}^{*} k(1-k)\Omega\omega.$$

A primeira parcela é a probabilidade, por unidade de dose, que uma partícula radioativa, passando nas vizinhanças de uma cromátide produza uma quebra e que esta não seja reparada e cause a "morte" da célula. A segunda parcela é a probabilidade, por unidade de dose, que uma mesma partícula radioativa, passando nas vizinhanças de ambas as cromátides produza quebra em uma delas mas não produza quebra na outra e que esta quebra não seja reparada e cause "morte" da célula.

O segundo termo de α , $p_2 f_0 k^2 \Omega \omega$ é a probabilidade, por unidade de dose, que uma partícula passando na vizinhança de ambos os filamentos de DNA produza quebra nos dois e que esta quebra dupla não seja reparada e cause "morte" da célula. O parâmetro β , definido em (3.9) dá a contribuição, ao efeito biológico observável, correspondente a interação de duas quebras (uma em cada cromátide) produzidas por duas partículas radioativas independentes. Isto é facilmente verificado se escrevermos β da seguinte forma.

$$\beta = N p_2 f_0 f_1 \left[k (1-\Omega) \omega + k (1-k) \Omega \omega \right]^2.$$

Vemos que $f_1 \left[k(1-\Omega)\omega + k(1-k)\Omega\omega \right]$ é a probabilidade, por unidade de dose, de quebra em uma cromátide (veja interpretação do primeiro termo de α) e que esta quebra não seja reparada antes que uma quebra na outra cromátide a transforme em quebra dupla. Portanto $p_2 f_0 f_1 \left[k(1-\Omega)\omega + k(1-k)\Omega\omega \right]^2$ é a probabilidade por unidade ao quadrado de dose que duas quebras (uma em cada cromátide) sejam produzidas por duas partículas independentes e que esta quebra dupla não seja reparada e cause a "morte" da célula.

3.4. Uso do modelo para outros efeitos biológicos

Podemos distinguir na expressão (3.8), proposta aqui como um modelo para sobrevivência de células, dois conjuntos de parâmetros. O primeiro é composto pelos parâmetros ω , k, f_o, f₁, f₁^{*}, Ω e N que correspondem a primeira etapa do processo da ação da radiação sobre as células, isto é, parâmetros relacionados com a produção do defeito estrutural produzido pela radiação no núcleo da célula, com potencial para causar a morte da célula. O segundo é composto dos parâmetros p₁ e p₂ que correspondem a segunda etapa do processo, isto é, relacionam o defeito estrutural potencial ao efeito biológico observável ("morte" da célula neste caso). Portanto a expressão (3.8) pode ser usada para qualquer outro efeito biológico produzido a partir da quebra em uma única cromátide ou da interação de quebras nas duas cromátides. O único ajuste que deve ser feito é redefinir os parâmetros $p_1 e p_2$ para cada efeito biológico em estudo. Podemos então generalizar o uso do modelo (3.8) para outros efeitos biológicos além de sobrevivência de células, mas para isto temos que modificar a definição de $p_1 e p_2$ dizendo que além de dependerem do tipo de célula e tipo de sistema biológico em estudo, dependem também do efeito biológico sob consideração.

Em muitas situações é conveniente expressar o modelo em termos de incidência do efeito biológico do que em termos de sobrevivência. Por exemplo, suponha que Y(D) seja a probabilidade esperada de um determinado tipo de cancer induzido pela dose D de radiação. Suponha que o defeito estrutural na célula, responsável pela produção de cancer é quebra simples ou dupla definidas acima. Então da expressão (3.8) obtemos

$$Y(D) = 1 - e^{-\alpha D - \beta D^2}$$
(3.10)

onde α e β são dados por (3.9). Este modelo é chamado na literatura estatística de "modelo de dois estágios". Foi apresentado formalmente por Armitage e Doll (1961) e tem sido usado muito intensamente em estudos de incidência de câncer induzido por químicos desde então. A derivação da expressão (3.10) dada por Armitage e Doll (1961) é baseada em argumentos diferentes daqueles usados nesta tese e os parâmetros α e β não são expressos como função de parâmetros que descrevem o mecanismo da ação da radiação sobre as células. Crump (1979) apresenta uma revisão sobre modelos de doseresposta usados em carcinogenes e comenta o fato de que novas descobertas sobre mecanismo de reparo deveriam ser incorporados nos modelos. Consideramos a derivação dos modelos (3.8) e (3.10) apresentadas neste trabalho uma primeira tentativa, neste sentido, para o caso de efeitos biológicos (não somente câncer) induzidos por radiação, pois os parâmetros α e β de acordo com (3.9) são expressos como função de vários parâmetros inclusive parâmetros relacionados com o mecanismo de reparo.

3.5. Discussão (Comentários Gerais)

1. A expressão (3.8) proposta neste trabalho como modelo de sobrevivência em estudos com radiação é uma aproximação da expressão (3.6), a qual foi obtida a partir de suposições probabilísticas e biológicas consistentes com evidências experimentais. Como consequência do processo de aproximação utilizado as duas expressões (3.6) e (3.8) tem o mesmo coeficiente angular da tangente a curva no ponto D=0. Isto é a derivada de S com relação a D, nas duas expressões, no ponto D=0 é dada por

$$N(2p_1f_1^*k(1-k\Omega)\omega + p_2f_0k^2\Omega\omega).$$

Este parâmetro é muito importante quando estamos interessados em estudar riscos de radiação para doses pequenas e portanto conservar este parâmetro do modelo original é uma propriedade importante do modelo aproximado.

2. A expressão (3.8) tem sido recentemente usada com muita freqüência em radiobiologia como modelo de sobrevivência e se ajusta muito bem a dados experimentais em vários sistemas biológicos (veja por exemplo Alper (1974)). A maioria dos radiologistas que usam a expressão (3.8) fazem referência aos trabalhos que passare-
a discutir.

Kellerer e Rossi (1971, 1972 e 1978), assumem que a ação primária da radiação sobre as células é produzir "sub-lesões". Estas sub-lesões se interagem em pares e produzem as "lesões" que irão determinar o efeito observável (Teoria da radiação dual). Baseado em evidências experimentais e suportado pela teoria de radiação dual (Kellerer e Rossi (1972)) é assumido que o número médio esperado de lesões por celula e uma função linear quadrática da dose $(\alpha D + \beta D^2)$. A partir desta suposição e usando distribuição de Poisson o modelo (3.8) é obtido. Os parâmetros α e β são interpretados respectivamente como coeficientes de indução de lesões por um evento simples de radiação (uma única partícula radioativa) e coeficiente de indução de lesões produzidas pela interação de dois eventos simples (duas partículas radioativa). Verificamos que esta interpretação coincide com a interpretação global de α e β dada na seção 3.3 desta tese. A diferença fundamental é que α e B dado por (3.9) são funções de parâmetros relacionados com o mecanismo da ação da radiação, o que permite melhor interpretação dos resultados como veremos nos exemplos do Capítulo 4.

Leehouts e Chadwick (1978) assumem que as lesões críticas para a produção do efeito observável (morte da célula) são quebras duplas nos filamentos de DNA e que o número esperado destas quebras é uma função linear quadrática da dose ($\alpha D + \beta D^2$). Usando distribuição de Poisson o modelo (3.8) é obtido. O parâmetro α é interpretado como coeficiente de indução de quebras duplas produzidas pela ação de uma mesma partícula radioativa. O parâmetro β é interpretado como coeficiente de indução de quebras duplas produzidas pela ação de duas partículas radioativas independentes. Notamos que nesta derivação do modelo (3.8), ao contrário daquela apresentada por Kellerer e Rossi, foi especificada o tipo de lesão que produz o efeito observável (quebra dupla nos filamentos de DNA). A interpretação dada acima para o parâmetro β coincide com aquela dada na seção 3.3 deste trabalho, porém o parâmetro α não inclue a contribuição de quebras simples como danos capazes de produzirem morte da célula. Desta forma podemos considerar o modelo (3.8) com a interpretação de α e β dada por Leenhouts e Chadwick como um caso particular do modelo (3.8) derivado nesta tese para $p_1=0$, isto é α e β seriam respectivamente dados por:

 $Np_2 f_0 k^2 \Omega \omega = Np_2 f_0 f_1 k^2 (1 - \Omega k)^2 \omega^2$.

Alguns exemplos no Capítulo 4 mostram que a interpretação do parâmetro α dada por Leenhouts e Chadwick não é consistente com evidências de que reparo de quebras duplas é menos eficiente do que reparo de quebras simples (Remick e Martin (1976)). No entanto a composição paramétrica dos parâmetros α e β dada em (3.9) é consistente.

CAPÍTULO IV

APLICAÇÕES

4.1. Introdução

Neste capítulo iremos aplicar o modelo $S/S_0 = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ derivado no capítulo anterior a dados experimentais apresentados por Sankaranarayanan (1969a) e por Sankaranarayanan e Volkers (1980). Estes dados correspondem a experimentos realizados como oócitos de Drosophila Melanogaster em estágio 7 de desenvolvimento submetidos a diferentes doses de raio X. Seis destes experimentos estudam a influência de oxigênio e nitrogênio na sobrevivência, usados como pós-tratamento (Sankaranarayanan, 1969a). Outros três estudam a influência de diferentes regimes de radiação (radiação fracionada) na sobrevivência. Escolhemos este conjunto de dados porque permite mostrar dois fatos importantes. O primeiro é que o modelo se ajusta muito bem a várias situações experimentais. O segundo é que as situações experimentais envolvidas em cada grupo são comparáveis e isto permite interpretar as variações dos parâmetros α e β em termos do mecanismo da ação da radiação sobre as células. Além disto, mostra que variações nas estimativas de α e β quando comparamos pos-tratamentos no primeiro grupo de experimentos ou quando comparamos regimes de radiação no segundo grupo de experimentos, são consistentes com a interpretação dos parâmetros a e ß dada neste trabalho, porém o mesmo não acontece com a interpretação de α e β 35

dada por Leenhouts e Chadwick (1978).

Nas duas próximas seções apresentamos os resultados da análise estatística dos dados dos dois grupos de experimentos mencionados acima.

4.2. Efeito de pos-tratamentos na sobrevivência de ovos de drosofilas em estágio 7 irradiados com raio X.

Os experimentos que compõe este grupo formam 3 séries de experimentos. Na primeira as unidades experimentais são irradiadas em nitrogênio e dois pos-tratamentos (N2 e 02) são usados (Tabela 4.1). Na segunda as unidades experimentais são irradiadas em oxigênio e os mesmos dois pos-tratamentos são usados (Tabela 4.2). Na terceira as unidades experimentais são irradiados em ar e dois postratamentos (N2 e Ar) são usados (Tabela 4.3). O número de unidades experimentais examinadas e o número delas que sobrevivem, correspondentes a cada dose e ao controle é o total obtido em 4 repetições.

TABELA 4.1

Efeito dos pos-tratamentos N2 e O2 sobre a sobrevivência de oócitos de drosófila (estágio 7) irradiados em uma atmosfera de nitrogênio.

Dose	N ₂ (Pós-tratamento)			O ₂ (Pos-tratamento)				
em	Nº de	Ovos	Sobrev.	Sobrev.	Nº de	Ovos	Sobrev.	Sobrev.
	Total	Nasc.	8	Corrig.	Total	Nasc.	3	Corrig.
0	4511	4198	93,1		4445	4141	93,2	
1000	4531	3911	86,3	92,7	4649	4098	88,1	94,5
0	4389	4068	92,7		4302	3992	92,8	
2000	4715	3681	78,1	84,3	4812	3988	82,9	89,3
0	4550	4149	91,1		4824	4452	92,3	
3000	4890	2887	59.1	64,9	4616	3308	71,7	77,7
0	4864	4461	91,7		5125	4752	92,7	
4000	4517	2383	52.8	57,6	4958	3461	69,8	75,3
0	3578	3304	92.3		3703	3424	92,5	
5000	3148	1396	44,3	48,0	3665	2141	58,4	63,1
0	4261	3974	93,3		4612	4298	93,2	
6000	2083	798	38,3	41,1	3557	1925	54,1	58,0
0	5410	5043	93.2		5212	4866	93,4	
7000	3234	1035	32.0	34,3	3169	1313	41,4	44,3
0	4540	4263	93.9		5109	4790	93,8	
8000	2109	453	21.5	22,9	2799	861	30,8	32,8
0	3809	3035	92,8		3864	3678	92,6	
9000	2364	352	14,9	16.1	2296	573	25,0	27,0
0	4217	3869	91,7		4085	3750	91,8	
10000	3835	538	14.0	15,3	3009	677	22,5	24,5
0	3598	3295	91,6		3678	3395	92,3	
12000	2194	229	10,4	11,4	2263	347	15,3	16,6
0	3315	3027	91,3		4008	3662	91,4	
14000	1195	66	5,5	6,0	1377	163	11,8	12.9

TABELA 4.2

Efeito dos pós-tratamentos $N_2 e O_2$ sobre a sobrevivência de ovos de drosófila (estágio 7) irradiados em uma atmosfera de oxigênio.

Dose	N ₂ (Pós-tratamento)			0 ₂ (Pós-tratamento)				
em	Nº de	Ovos	Sobrev.	Sobrev.	Nº de	Ovos	Sobrev.	Sobrev.
	Total	Nasc.	00	Corrig.	Total	Nasc.	0 0	Corrig.
0	3439	3174	92,3		3893	3618	92,9	
1000	4006	3764	69,0	74,8	3393	2606	76,8	82,7
0	3343	3103	92,8		3471	3239	93,3	
2000	2612	1211	46,4	50,0	2832	1698	60,0	64,3
0	2898	2682	92,5		3817	3548	93,0	
3000	1693	399	23,6	25,5	2199	856	39,0	41,9
0	3098	2862	92,4	3.	3850	3568	92,7	
4000	1661	211	12,7	13,7 *	1874	396	21,1	22,8
0	3913	3648	93,2		3796	3530	93,0	
5000	1422	68	4,8	5 - 2	1435	168	11,7	12,6

TABELA 4.3

Efeito dos pós-tratamentos $N_2 \in O_2$ sobre a sobrevivência de ovos de drosófila (estágio 7) irradiados em Ar.

Dose	N ₂ (Pós-tratamento)			Ar (Pós-tratamento)				
em	Nº de	Ovos	Sobrev.	Sobrev.	Nº de	Ovos	Sobrev.	Sobrev.
	Tota1	Nasc.	0 Ó	Corrig.	Total	Nasc.	0 0	Corrig.
0	3403	3164	93,0		3201	2979	93,1	
1000	4177	3172	75,9	81,6	3979	3211	80,7	86,7
0	3656	3428	93,8		3111	2918	93,8	
2000	3253	1919	59,0	62,9	3276	2321	70,8	75,5
0	3631	3390	93,4		2863	2664	93,0	
3000	2647	1116	42,2	45,2	2583	1477	57,2	61,5
0	3630	3372	92,9		2864	2660	92,9	
4000	2278	641	28,1	30,2	2390	1000	41,8	45,0
0	3174	2931	92,3		3096	2860	92,4	
5000	2133	359	16,8	18,2	1550	447	28,8	31,2
0	3918	3625	92,5		3321	3064	92,3	
6000	1423	125	8,8	9,5	1827	395	21,6	23,4
0	3754	3457	92,1		3099	2865	92,4	
7000	957	55	5,7	6,2	1048	117	11,2	12,1
0	3548	3265	92,3	2	3134	2887	92,1	
8000	1573	67	4,3	4,7	1858	156	8,4	9,1

4.2.1. Ajuste do Modelo

O modelo $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ foi ajustado aos dados de cada um dos 6 experimentos descritos acima pelo método de mínimos quadrados <u>não linear</u>. Desde que a variável resposta (proporção de ovos nascidos) é binomial, os parâmetros do modelo acima foram estimados, primeiro por mínimo quadrado não linear, ponderado pelo inverso da variância e em seguida por mínimos quadrados não linear não ponderado. As estimativas de α e β assim como seus respectivos desvios padrões foram praticamente iguais pelos dois processos por isso os resultados da análise que apresentamos aqui correspondem àqueles obtidos por mínimos quadrado não linear, não ponderado.

A Tabela 4.4 apresenta as estimativas de α e β com os respectivos desvios padrões, a soma de quadrado dos resíduos e a estatística de χ^2 (Good of fitness) para cada uma das seis situações experimentais.

Analisando todos os elementos da Tabela 4.4, verificamos que o modelo se ajusta extremamente bem em todas as situações experimentais. A probabilidade de se encontrar um valor de χ^2 maior do que aquele da Tabela 4.4 é maior do que 0,99 para cada caso, o que mostra um ajustamento praticamente perfeito. Uma visão gráfica deste ajuste é dada na Figura 4.1, 4.2, 4.3. Com o objetivo de verificar as suposições básicas do modelo foi feita uma análise detalhada dos resíduos para cada caso e podemos afirmar que não existe nenhum fator que sugira desvios das suposições básicas do método de mínimos quadrados. Selecionamos, para apresentar aqui, a análise gráfica des de acordo com a teoria normal (Figuras 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9).

TABELA 4.4

Estimativas de α e β nas diferentes condições experimentais.

Estimativas e D.P.		Soma de Quadrado dos	Estatística para o Ajustamento	
α	β	Residuos	χ²	g.1.
0,095069 ± 0,011635	0,009657±0,001816	0,008666	0,04145	10
0,043296 ± 0,009777	0,009849 ± 0,001382	0,010299	0,05097	10
0,206325 ± 0,020202	0,076590 ± 0,007939	0,000498	0,00179	3
0,108401 ± 0,017379	0,061907 ± 0,005855	0,000674	0,00143	3
0,164258 ± 0,008678	0,034377 ± 0,002357	0,000540	0,01195	6
0,088906 ± 0,010701	0,027405 ± 0,002436	0,001598	0,00559	6
	α 0,095069 ± 0,011635 0,043296 ± 0,009777 0,206325 ± 0,020202 0,108401 ± 0,017379 0,164258 ± 0,008678 0,088906 ± 0,010701	Estimativas e D.P. α β 0,095069 ± 0,0116350,009657 ± 0,0018160,043296 ± 0,0097770,009849 ± 0,0013820,206325 ± 0,0202020.076590 ± 0,0079390,108401 ± 0,0173790.061907 ± 0,0058550,164258 ± 0,0086780.034377 ± 0.0023570,088906 ± 0,0107010.027405 ± 0,002436	Estimativas e D.P.Soma de Quadrado dos Residuos α β 0,0095069 ± 0,0116350,009657 ± 0,0018160,0086660,043296 ± 0,0097770,009849 ± 0,0013820,0102990,206325 ± 0,0202020.076590 ± 0.0079390.0004980,108401 ± 0,0173790.061907 ± 0.0058550,0006740,164258 ± 0.0086780.034377 ± 0.0023570.0005400,088906 ± 0.0107010.027405 ± 0.0024360.001598	Estimativas e D.P.Soma de Quadrado dos ResíduosEstatístic o Ajustame χ^2 α β $0,0095069 \pm 0,011635$ $0,009657 \pm 0,001816$ $0,0086666$ $0,04145$ $0,043296 \pm 0,009777$ $0,009849 \pm 0,001382$ $0,010299$ $0,05097$ $0,206325 \pm 0,020202$ $0,076590 \pm 0,007939$ $0,000498$ $0,00179$ $0,108401 \pm 0,017379$ $0.061907 \pm 0,005855$ $0,000674$ $0,00143$ $0,164258 \pm 0,008678$ $0,034377 \pm 0,002357$ $0,000540$ $0,00195$ $0,088906 \pm 0,010701$ $0,027405 \pm 0,002436$ $0,001598$ $0,00559$

ł

Observação

Para as figuras 4.1, 4.2 e 4.3 a legenda é a seguinte:

Pós-tratamento	Sobrevivência Observada Esperad		
	(pontos isolados)	(curvas)	
Oxigênio	×	1.1.1. (100) - 1.1.1.	
Ar	×	1010 1000 1000 1000	
Nitrogênio			

. .



Figura 4.1 - Oócitos irradiados em Nitrogênio. Pós-tratados com Nitrogênio e Oxigênio.



<u>Figura</u> <u>4.2</u> - Oócitos irradiados em Oxigênio. Pós-tratados com Nitrogênio e Oxigênio.



Figura 4.3 - Oócitos irradiados em Ar. Pós-tratados com Nitrogênio e Ar.

- 41 -



Figura 4.4 - Relação entre resíduos observados e esperados pela Teoria Normal. Oócitos irradiados em Nitrogênio e pos-tratados com Nitrogênio.



<u>Figura</u> 4.5 - Relação entre resíduos observados e esperados pela Teoria Normal. Oócitos irradiados em Nitrogênio e pos-tratados com Oxigênio.

- 42



<u>Figura</u> 4.6 - Relação entre resíduos observados e esperados pela Teoria Normal. Oócitos irradiados em Oxigênio e pos-tratados com Nitrogênio.



Figura 4.7 - Relação entre resíduos observados e esperados pela Teoria Normal. Oócitos irradiados em Oxigênio e pós-tratados com Oxigênio.

- 43 -



<u>Figura</u> <u>4.8</u> - Relação entre resíduos observados e esperados pela Teoria Normal. Oócitos irradiados em Ar e pós-tratados com Nitrogênio.



Figura 4.9 - Relação entre resíduos observados e esperados pela Teoria Normal. Oócitos irradiados em Ar e pós-tratados com Ar.

- 44 -

4.2.2. Variações nas estimativas de α e β quando comparamos os pos-tratamentos $\underline{0}_2$ e \underline{N}_2 .

Quando diferentes tratamentos (Oxigênio, Nitrogênio, etc.) são administrados após a irradiação é esperado uma alteração na capacidade de reparo das células e como conseqüência uma mudança na sobrevivência. Para verificar as variações esperadas em $\alpha \in \beta$ quando realizamos este tipo de estudo recordamos aqui a definição dos parâmetros $\alpha \in \beta$ dada no Capítulo 3.

$$\alpha = N(2p_1f_1^* k(1-k\Omega)\omega + p_2f_0k^2\Omega\omega)$$

$$\beta = N(p_2f_0f_1k^2(1-k\Omega)^2\omega^2).$$

Os parâmetros relacionados com o mecanismo de reparo são f_0 , f_1 e f_1^* . De acordo com evidências de que quebras simples no DNA reparam mais facilmente do que quebras duplas (Resnick e Nortin,1976) devemos esperar alterações maiores em f_1 e f_1^* do que em f_0 quando usamos fatores que alteram a capacidade de reparo, por que f_0 é relacionado com quebra dupla e f_1 e f_1^* são relacionados com quebra simples. Além disso, de acordo com a definição de f_1 e f_1^* como é permitido um tempo maior de reparo para as quebras simples relacionadas com f_1^* do que para as quebras simples relacionadas com f_1 e speramos alterações maiores em f_1^* do que f_1 .

Os dados das Tabelas 4.1 e 4.2 e figuras 4.1 e 4.2, mostram um aumento na sobrevivência quando usamos Oxigênio como pos-tratamento no lugar de Nitrogênio. Este fato sugere que o pos-tratamento Oxigênio aumenta a capacidade de reparo das células com relação ao pos-tratamento Nitrogênio. Portanto, de acordo com a nossa discussão acima, devemos esperar que os valores de α e β do modelo $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ decresçam quando usamos Oxigênio no lugar de Nitrogênio e que a taxa com que decresce seja maior para α do que para β . As estimativas de α e β na Tabela 4.4 confirmam o que acabamos de afirmar. Com relação aos dados da Tabela 4.3 e Figura 4.3, as conclusões são exatamente as mesmas quando substituímos o pós-tratamento Oxigênio por Ar.

Gostariamos de chamar a atenção neste ponto, que de acordo com a interpretação de α e β dada por Leenhouts e Chadwick (1978) é concluido por eles que em estudos de pos-tratamentos deveriamos esperar variações em α e β na mesmá proporção. Esta conclusão além de não ser apoiada pelos resultados da Tabela 4, é contra evidências de que quebras simples são reparadas mais facilmente do que quebras duplas.

4.3. <u>Efeito de diferentes regimes de radiação na sobrevivência de</u> ovos de drosófila em estágio 7 irradiados com raio X.

Os dados que serão analisados neste seção correspondem a três experimentos. No primeiro as diversas doses de radiação foram administradas continuamente sem interrupção (Tabela 4.5) . No segundo cada dose foi administrada em duas frações iguais separadas por 60 minutos (Tabela 4.6). No terceiro cada dose foi administrada em três frações iguais separadas por 60 minutos (Tabela 4.7) . O número de unidades experimentais examinados e os sobreviventes, correspondentes a cada dose e ao controle é o total obtido em um certo número de repetições expecificadas nas tabelas.

TABELA 4.5

Efeito de radiação contínua de raio X sobre sobrevivência de ovos em estágio 7 de drosófila.

Dose em Radios	Número de Repetições	Número de Ovos Total	Número de Ovos Não Nascidos	Sobrevivência Corrigida
0	5	2740	251	
500	5	3727	486	95,8
0	5	3944	354	
750	5	3458	595	91,8
0	8	7076	616	
1000	8	6558	1423	85,8
0	4	3166	302	
1250	4	2835	696	83,3
0	6	5186	498	
1500	6	3806	1201	76,6
0	7	6565	613	
2000	7	4564	1721	68,7
0	. 4	4464	399	
2250	4	3467	1552	60,6
0	5	3165	260	
2500	5	4418	2236	53,8
0	7	7037	600	
3000	7	5296	3122	44,8
0	3	2444	223	
40°00	3	1868	1395	27,8
0	3	2999	265	
4500	3	2237	1727	25,0
0	8	6519	545	
5000	8	7315	5945	20,6
0	6	5027	418	
6000	6	5434	4831	12,1

TABELA 4.6

Efeito de radiação fracionada (duas frações) de raio X sobre sobrevivência de ovos em estágio 7 de drosófila.

Dose em Radios	Número de Repetições	Número Total de Ovos	Número de Ovos Não Nascidos	Sobrevivência Corrigida %
0	3	2268	206	
2x 500	3	1389	229	91, 9
0	3	1796	165	
2x 750	3	1187	276	84,5
0	3	3376	314	
2x1000	3	2166	651	77,1
0	3	3394	279	
2x1250	3	2008	754	68,1
0	3	3390	333	
2x1500	3	1460	~ 710	57,0
0	5	4527	427	
2x2000	5	3474	2230	39, 5
0	3	3212	296	
2x2250	3	2492	1706	34, 7
0	4	3656	295	
2x2500	4	3097	2233	30,4
0	4	4227	342	
2x3000	4	3300	2692	20, 1

TABELA 4.7

Efeito de radiação fracionada (três frações) de raio X sobre sobrevivência de ovos em estágio 7 de drosófila.

Dose em Radios	Número de Repetições	Número Total de Ovos	Número de Ovos Não Nascidos	Sobrevivência Corrigida
0	3	1996	156	
3x 500	3	3444	638	88,4
0	4	3566	277	
3x 750	4	2994	744	81,6
0	3	3139	264	
3x1000	3	2678	1067	65,7
0	4	3091	267	
3x1500	4	3148	1924	42,6
0	5	4246	370	
3x2000	5	3440	2535	28,8

- 48 -

4.3.1. Ajuste do Modelo

O modelo $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ foi ajustado aos dados de cada um dos 3 experimentos pelo método de mínimos quadrados não linear ponderado e não ponderado. Usando a mesma justificativa dada na seção anterior apresentamos aqui somente os resultados da análise correspondente ao método de mínimos quadrados não linear, não ponderado. Os resultados desta análise estão na Tabela 4.8.

TABELA 4.8

. .

Estimativas de α e β nos diferentes regimes de radiação.

Regimes	Estimativa	us e D.P.	Soma de	Estatísticas p/o Ajuste	
Radiação	α	β	Residuos	χ²	g.1.
Contínua	0,106686±0,013529	0,047696±0,004610	0,005683	0,020005	11
2 Frações	0,062127±0,012197	0,037711±0,003396	0,002795	0,008062	7
3 Frações	0,036752±0,019823	0,031045±0,006158	0,002605	0,005706	3

Examinando os elementos da Tabela 4.8, verificamos mais uma vez que o modelo se ajusta muito bem nas três situações experimentais. Figura 4.10 dá uma visão gráfica deste ajuste.

Como no caso do primeiro grupo de experimentos fizemos para este uma análise detalhada dos resíduos e as mesmas conclusões foram obtidas. Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 mostram a relação entre os resíduos observados e esperado pela teoria normal.





Legenda

Regimes de	Sobrevivência					
Radiação	Observada (po	ontos) Esperada	(curva)			
Continua						
· Duas frações	\times					
Três frações	0	Ø 9				







<u>Figura</u> <u>4.12</u> - Relação entre resíduos observados e esperados segundo a Teoria Normal. Radiação fracionada. Duas frações.



Figura 4.13 - Relação entre resíduos observados e esperados segundo a Teoria Normal. Radiação fracionada. Três frações.

4.3.2. <u>Variações nas estimativas de α e β quando comparamos vários</u> regimes de radiação.

Os dados das Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 e Figura 4.4 mostram um aumento de sobrevivência quando aumentamos o número de frações sob as quais é administrada cada dose. Este aumento de sobrevivência é explicado pelo aumento da capacidade de reparo quando a dose é fracionada. Portanto de acordo com o discutido antes esperamos que α e β decresçam com o número de frações e que as variações em α sejam maiores do que em β . As estimativas de α e β nas três situações experimentais apresentadas na Tabela 4.8 confirmam este resultado. No entanto de acordo com Leenhouts e Chadwick (1978) deveríamos esperar variação maior em β do que em α , o que não é confirmado por estes experimentos.

CAPÍTULO V

UM METODO PARA AJUSTAR MODELOS NÃO LINEARES USANDO MÍNIMOS QUADRADOS LINEAR PONDERADO

5.1. Introdução

O modelo que foi proposto nos capítulos anteriores para estudo de efeitos biológicos induzidos por radiação é não linear nos parâmetros α e β . Os estimadores de mínimos quadrados de α e β são funções das observações que minimizam a seguinte soma de quadrados

$$S_{1} = \sum_{i=1}^{n} (y_{i} - e^{\alpha d_{i} - \beta d_{i}^{2}})^{2}$$
(5.1)

onde, $y_i \in a$ sobrevivência observada correspondente a dose d_i , e n é o número de doses diferentes utilizadas no experimento. Embora o modelo com o qual estamos trabalhando seja muito simples, a minimização da soma S_1 não é um problema simples e só é conseguida por processos iterativos. Estes processos iterativos exigem, em geral, o uso do computador e programas especiais a fim de obter resultados satisfatórios. Mesmo dispondo destes elementos a utilização dos programas deve ser feita com muito cuidado e com uma certa habilidade por parte do operador porque muitas vezes o processo iterativo utilizado não converge dentro daquele tempo estipulado ao computador ou as vezes converge para valores dos parâmetros que constituem apenas um mínimo local da soma S_1 e não o mínimo absoluto exi-- 53 - gido. Passamos a descrever um exemplo desta situação.

Considere o problema de ajustar o modelo S = $e^{-\alpha D - \beta D^2}$ aos dados da tabela abaixo.

TABELA 5.1

Dados obtidos da Tabela 4.1 eliminadas as 5 últimas linhas.

Doses dadas em Kr (d _i)	Уi
1 2 3 4 5 6 7	0,927 0,843 0,649 0,576 0,480 0,411 0,343

O ajuste do modelo será feito por meio do programa BMDP3R, o qual minimiza a soma de quadrados (5.1) pelo processo iterativo de Newton Gauss. A utilização deste processo exige que o operador especifique, para cada parâmetro, valor máximo, valor mínimo e valor inicial. Para mostrar a influência dos valores especificados pelo operador nos resultados finais consideremos dois casos. Os valores especificados em cada um dos dois casos estão na Tabela 5.2.

TABELA 5.2

Especificações iniciais para a aplicação de mínimos quadrados não linear aos dados da Tabela 5.1.

Casos	Parâ-	Valor				
04303	metros	Minimo	Máximo	Inicial		
1	α	0	1	0,05		
*	β	0	1	0,10		
2	α	-0,10	1	0,10		
2	β	-0,10	1	0,10		

As estimativas dos parâmetros com os respectivos desvios padrões e a soma dos quadrados dos resíduos correspondente a cada análise estão na Tabela 5.3.

TABELA 5.3

Resultados das Análises dos dados da Tabela 5.1.

Caso	Estimativas α	dos Parâmetros β	Soma de Quadrado dos Resíduos
1	0,140 0,008	0,000 0,000	0,012765
2	0,094 0,018	0,009 0,004	0,005302

A Tabela 5.3 nos mostra que uma pequena alteração nas especificações iniciais pode produzir resultados diferentes. Um fato interessante que nos chamou a atenção é que no caso 1 a especificação sobre o valor mínimo para os parâmetros (min α = min β = 0) é compatível com a teoria, segundo a qual os parâmetros α e β devem ser não negativos. Porém usando estas especificações o processo iterativo produz como estimativa de β o valor da fronteira. Para corrigir isto nós ampliamos o campo de valores possíveis dos parâmetros (caso 2 na Tabela 5.2).

Como vimos no exemplo acima a minimização da soma de quadrados (5.1) não é um problema trivial, mesmo dispondo de programas especiais como o BMDP3R. Por outro lado, quando o modelo é linear nos parâmetros a solução de mínimos quadrados é obtida sem a utilização de processos iterativos o que evita os problemas citados acima, diminue significantemente o tempo de computação envolvido e quando o número de parâmetros é pequeno (3 no máximo) os cálculos envolvidos podem ser executados por meio de calculadoras portáteis comuns. Portanto uma primeira tentativa é linearizar o modelo por meio de transformações. Verificamos facilmente que o modelo S = $e^{-\alpha D - \beta D^2}$ é linearizado pela transformação ℓn (logarítmo neperiano). Com esta transformação os estimadores de mínimos quadrados dos parâmetros α e β são os valores de α e β que minimizam a seguinte soma de quadrados.

$$S_{2} = \sum_{i=1}^{n} (\ln y_{i} + \alpha D_{i} + \beta D_{i}^{2})^{2}$$
(5.2)

As estimativas de α e β obtidas por este processo diferem daquelas obtidas pela minimização da soma de quadrados (5.1) de tal modo que as curvas estimadas são muito diferentes nas regiões de doses pequenas. Estas diferenças nas estimativas de α e β obtidas pelos dois processos são consequências do fato de que as somas de quadrados S₁ dada por (5.1) e S₂ dada por (5.2) são diferentes. A solução do problema deve então ser conduzida tentando-se produzir uma soma de quadrados que seja bem próxima da soma S₁ e que a minimização desta nova soma de quadrados envolva apenas equações lineares nos parâmetros. Esta idéia é desenvolvida na seção seguinte deste capítulo.

5.2. Estimação dos parâmetros $\alpha \in \beta$ da função $S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ por modelos lineares.

Seja f_i o valor da função S para o valor de dose d_i, isto é, f_i = $e^{-\alpha d_i - \beta d_i}$. Portanto o nosso problema é determinar $\alpha \in \beta$ tais que minimizam a soma S₁ de quadrados que com esta notação é expressa por

$$S_1 = \sum_{i=1}^{n} (y_i - f_i)^2,$$

onde y_i é a sobrevivência observada correspondente a dose d_i. Podemos escrever S₁ da seguinte forma

$$S_{1} = \sum_{i=1}^{n} y_{i}^{2} (1 - \frac{f_{i}}{y_{i}})^{2} = \sum_{i=1}^{n} y_{i}^{2} (1 - e^{-(\ell n y - \ell n f_{i})})^{2}.$$

Desde que f_i representa o valor de sobrevivência esperado correspondente a dose d_i e y_i representa o valor observado de sobrevivência correspondente a dose d_i , os valores das diferenças $lny_i - lnf_i$ são próximos de zero quando supomos o modelo verdadeiro. Portanto tomando-se o primeiro termo da expansão do exponencial em série de Taylor a soma de quadrados S₁ pode ser aproximada por

$$S_1 \simeq S_3 = \sum_{i=1}^{n} y_i^2 (\ln y_i - \ln f_i)^2.$$
 (5.3)

A função lnf_i é linear nos parâmetros. Então o problema ficou agora transformado em um problema de mínimos quadrados ponderados onde os pesos são funções muito simples das observações (y_i^2) . Os valores de α e β que minimizam a soma de quadrados acima são dados pelas expressões.

$$\hat{\alpha} = \frac{(\sum y_{i}^{2} d_{i}^{3}) (\sum y_{i}^{2} Z_{i} d_{i}^{2}) - (\sum y_{i}^{2} Z_{i} d_{i}) (\sum y_{i}^{2} d_{i}^{4})}{(\sum y_{i}^{2} d_{i}^{2}) (\sum y_{i}^{2} d_{i}^{4}) - (\sum y_{i}^{2} d_{i}^{3})^{2}}$$

$$\hat{\beta} = \frac{(\sum y_{i}^{2} d_{i}^{3}) (\sum y_{i}^{2} Z_{i} d_{i}) - (\sum y_{i}^{2} d_{i}^{2}) (\sum y_{i}^{2} Z_{i} d_{i}^{2})}{(\sum y_{i}^{2} d_{i}^{2}) (\sum y_{i}^{2} d_{i}^{4}) - (\sum y_{i}^{2} d_{i}^{3})^{2}}$$
(5.4)

O fato de reduzirmos o problema de minimizar uma soma de quadrados que envolve equações não lineares a um problema que envolve equações lineares dispensa a utilização dos processos iterativos e não apresenta os inconvenientes citados na seção 5.1. Além disso a solução dada por este processo é única e pode ser obtida com programas simples de computador ou mesmo com uma calculadora comum. Para avaliar o grau de aproximação da solução proposta aqui é suficiente verificar que a diferença entre a soma de quadrados original S₁ e a aproximada S₃ é expressa em termos de produtos do tipo $y_i^2 (ln y_i - ln f_i)^r \text{ com } r \ge 3$. Desde que $0 < y_i < 1$ estes termos serão muito pequenos em relação ao termo $y_i^2 (ln y_i - ln f_i)^2$ se as diferenças (ln y_i - ln f_i) são menores do que 1 em valor absoluto. Estas diferenças representam os resíduos os quais serão bem pequenos quando o modelo se ajusta bem. Para verificar que a aproximação é satisfatória, apresentamos a seguir a comparação de estimativas dos parâmetros α e β obtidas pelo processo iterativo de Newton Gauss e pelo processo aproximado proposto aqui, assim como estimativas das somas de quadrados S₁ obtidas pelos dois processos, para uma série de exemplos.

5.3. <u>Comparação de dois processos de ajustamento de modelos não</u> lineares nos parâmetros.

Para comparar os dois processos de estimação, mínimos quadrados não linear e mínimos quadrados linear ponderado, vamos utilizar dois tipos de curvas de dose resposta que são muito utilizadas em radiobiologia,

 $S = e^{-\alpha D - \beta D^2} e S = e^{-\alpha D}.$

Para a primeira função utilizaremos os dados apresentados nas tabelas 4.1, 4.2, 4.3, 4.5, 4.6 e 4.7 e os dados correspondentes a experimentos discutidos em Targa e Peres (1979), tabelas 5.4 e 5.5. Para a segunda função utilizaremos os dados publicados por Sankaranarayanan (1969b), tabelas 5.6, 5.7 e 5.8.

A comparação é feita por meio das estimativas dos parâmetros e da soma de quadrados $S_1 = \sum (y_i - f_i)^2$ obtidas pelos dois processos, tabelas 5.9 e 5.10.

TABELA 5.4

Sobrevivência de oócitos de mosca doméstica em estágio 7 irradiados com raios γ .

Dose em Kr	Sobrevivência corrigida pe- lo controle	Dose em Kr	Sobrevivência corrigida pe- lo controle	Dose em Kr	Sobrevivência corrigida pe- lo controle
0,5 0,5 0,5 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 1,5 2,0 2,0	0,960 0,920 0,840 0,901 0,830 0,860 0,870 0,800 0,913 0,825 0,770 0,760 0,580 0,580 0,770 0,580 0,770 0,650 0,670	2,0 2,0 2,0 2,0 2,0 2,0 2,0 2,5 2,5 2,5 2,5 2,5 2,5 2,5 2,5 3,0 3,0 3,0 3,0 3,0 3,0 3,0 3,0 3,0	0,780 0,560 0,440 0,520 0,670 0,756 0,584 0,610 0,370 0,410 0,650 0,561 0,350 0,300 0,420 0,300 0,420 0,300 0,420 0,550 0,450	3,0 3,5 3,5 3,5 3,5 3,5 3,5 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,0 4,5 4,5 4,5 5,0 5,0	0,417 0,290 0,230 0,260 0,500 0,418 0,220 0,260 0,260 0,320 0,230 0,480 0,338 0,235 0,230 0,240 0,240 0,240 0,240 0,245 0,245 0,149
2,0	0,750	3,0	0,477	-	_

- 59 -

Dose em Kr	Sobrevivência corrigida pe- lo controle	Dose em Kr	Sobrevivência corrigida pe- lo controle	Dose em Kr	Sobrevivência corrigida pe- lo controle
0,5	1,000	2.0	0,403	3.0	0,245
0,5	0,854	2,0	0,583	3,0	0,171
1,0	0,804	2,0	0,441	3,0	0,345
1,0	0,853	2,0	0,433	3,0	0,307
1,0	0,732	2,0	0,404	3,5	0,147
1,0	0,784	2,0	0,355	3,5	0,118
1,0	0,804	2,0	0,482	4,0	0,134
1,0	0,799	2,5	0,329,	4,0	0,110
1,0	0,927	2,5	0,363	4,0	0,054
1,0	0,750	3,0	0,230	4,0	0,062
1,5	0,709	3,0	0,219	4,0	0,105
1,5	0,600	3,0	0,171	4,0	0,141
2,0	0,419	3,0	0,160	-	

TABELA 5.5

Sobrevivência de oócitos de mosca doméstica em estágio 14 irradiados com raios γ .

TABELA 5.6

Efeitos dos pos-tratamentos nitrogênio e oxigênio na sobrevivência de oócitos de drosofila (estágio 14) irradiados em nitrogênio.

Dose	Sobrevivência corrigida pelo controle				
em Kr	N ₂ (Pós-tratamento)	0 ₂ (Pós-tratamento)			
0,3	0,760	0,836			
0.6	0,567	0,678			
0,9	0,427	0,559			
1,2	0,348	0,451			
1,5	0,272	0,380			
1,8	0,229	0,319			
2,1	0,164	0,251			
2,4	0,129	0,198			
2,7	0,098	0,166			
3,0	0,076	0,141			

TABELA 5.7

Efeitos dos pos-tratamentos nitrogênio e oxigênio na sobrevivência de oócitos de drosófila (estágio 14) irradiados em oxigênio.

Dose	Sobrevivência corri	gida pelo controle
em Kr	N ₂ (Pos-tratamento)	0 ₂ (Pós-tratamento)
0,15 0,30 0,45	0,625 0,407 0,249	0,714 0,479 0,321
0,60	0,157 0,104	0,215 0,150

TABELA 5.8

Efeitos dos pós-tratamentos nitrogênio e oxigênio na sobrevivência de oócitos de drosófila (estágio 14) irradiados em ar.

Dose em	Sobrevivência corri	gida pelo controle
Kr	$\frac{1}{2}$ (FOS-CLATATINETICO)	10_2 (F0S-tratamento)
0,15	0,693	0,764
0,30	0,444	0,541
0,45	0,306	0,393
0,60	0,215	0,292
0,75	0,150	0,219
0,90	0,093	0,169

Estimativas dos parâmetros do modelo $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ por dois processos: Minimos quadrados não linear (MQNL) e Minimos quadrados linear ponderado (MQLP).

Fonte dos	Processo	Estimativas			Curvas
dados observados	de Estimação	α	. β	$\sum (y_i - e^{-\alpha d_i - \beta d_i^2})^2$	de dose- resposta
Tab.4.1(Pos-trat.N.)	MQNL	0,095069	0,009657	0,008666	Fig. 5.1
2	MQLP	0,097375	0,008964	0,008913	0
Tab.4.1(Pos-trat.0.)	MQNL	0,043296	0,009849	0,010299	Fig. 5.2
2,	MQLP	0,046557	0,009093	0,010807	
Tab.4.2(Pos-trat.N.)	MQNL	0,206325	0,076590	0,000498	Fig. 5.3
2,	MQLP	0,206561	0,076147	0,000500	
Tab. 4. 2($Pos-trat.0_{-}$)	MQNL	0,108401	0,061907	0,000674	Fig. 5.4
	MQLP	0,108060	0,061878	0,000674	
Tab.4.3(Pos-trat.N.)	MQNL	0,164258	0,034377	0,000540	Fig. 5.5
1401110(105 014011.2)	MQLP	0,167847	0,033065	0,000573	116. 0.0
Tab.4.3(Pos-trat.Ar)	MQNL	0,088906	0,027405	0,001598	Fig. 5.6
3	MQLP	0,089570	0,027089	0,001609	
Tabela 4.5	MQNL	0,106686	0,047696	0,005683	Fig. 5.7
	MQLP	0,108680	0,046301	0,005771	0
Tabela 4.6	MQNL	0,062127	0,037711	0,002795	Fig. 5.8
	MQLP	0,063007	0,037193	0,002841	-0
Tabela 4.7	MQNL	0,036752	0,031045	0,002605	Fig. 5.9
	MQLP	0,037156	0,030660	0,002624	0
Tabela 5.4	MQNL	0,155102	0,038427	0,476852	Fig.5.10
	MQLP	0,144924	0,033641	0,524266	
Tabela 5.5	MQNL	0,104379	0,133238	0,132561	Fig.5.11
	MQLP	0,110144	0,120692	0,142600	

TABELA 5.10

Estimativas do parâmetro do modelo $S = e^{-\alpha D}$ por dois processos: (MQNL) e (MQLP).

Contraction of the second state of the second			
Processo de Estimação	Es α	timativa $\sum_{i=1}^{n} (y_i - e^{-\alpha d_i})^2$	Curvas de dose- resposta
MQNL	0,882683	0,001993	Fig.5.12
MQLP	0,879439	0,002005	
MQNL	0,652252	0,000519	Fig.5.13
MQLP	0,651792	0,000519	
MQNL	3,062036	0,000134	Fig.5.14
MQLP	3,060831	0,000134	
MQNL	2,480130	0,000815	Fig.5.15
MQLP	2,476339	0,000816	
MQNL	2,597879	0,000575	Fig.5.16
MQLP	2,594712	0,000576	
MQNL	2,019272	0,000840	Fig.5.17
MQLP	2,017228	0,000841	
	Processo de Estimação MQNL MQLP MQNL MQLP MQNL MQLP MQNL MQLP MQNL MQLP MQNL MQLP	Processo de Estimação Es MQNL 0,882683 MQLP 0,879439 MQNL 0,652252 MQLP 0,651792 MQNL 3,062036 MQLP 3,062036 MQLP 2,480130 MQLP 2,476339 MQNL 2,597879 MQLP 2,019272 MQNL 2,019272 MQNL 2,017228	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $

As figuras de 5.1 à 5.17 mostram as curvas de dose-resposta correspondente aos dois processos de estimação para cada conjunto de observações considerado. Em cada uma das figuras a linha contínua corresponde ao processo de estimação MQNL e a linha pontilhada corresponde ao MQLP. Estas figuras são identificadas nas Tabelas 5.9 e 5.10.

- 63 -

- 64 -







Figura 5.2







Figura 5.4







Figura 5.6





Figura 5.8

- 67 -

- 68 -







Figura 5.10






Figura 5.12







Figura 5.14

- 70 -



Figura 5.15



Figura 5.16

< - 71 -

Para verificar a influência do peso y_i² nas estimativas foi calculado, para cada conjunto de dados referidos nas tabelas 5.9 e 5.10, as estimativas dos parâmetros pelo método de mínimos quadrados linear não ponderado, isto é, os valores dos parâmetros que minimizam a soma de quadrados

 $\sum_{i=1}^{n} (\ln y_i - \ln f_i)^2$

onde $f_i = e^{-\alpha d_i - \beta d_i^2}$ para as situações experimentais consideradas na tabela 5.9 e $f_i = e^{-\alpha d_i}$ para aquelas consideradas na Tabela 5.10. Estes resultados estão nas tabelas 5.11 e 5.12.

TABELA 5.11

Estimativa dos parâmetros do modelo $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ por mínimos quadrados linear não ponderado.

Fonte dos dados	Estimativas	
observados	αβ	
Tabela 4.1 (Pós-trat. N ₂)	0,129058 0,005242	
Tabela 4.1 (Pos-trat. 0_2)	0,078547 0,066841	
Tabela 4.2 (Pos-trat. N_2)	0,207579 0,206580	
Tabela 4.2 (Pos-trat. 0_2)	0,111424 0,108752	
Tabela 4.3 (Pós-trat. N_2)	0,225557 0,210517	
Tabela 4.3 (Pós-trat. Ar)	0,092041 0,092329	
Tabela 4.5	0,147797 0,035107	
Tabela 4.6	0,088453 0,030793	
Tabela 4.7	0,056666 0,026082	
Tabela 5.4	0,191594 0,029315	
Tabela 5.5	0,176398 0,105939	

TABELA 5.12

Estimativas do parâmetro do modelo $S = e^{-\alpha D}$ por mínimos quadrados linear não ponderado.

Fonte dos dados obsérvados			Estimativa α	
Tabela	5.6	(Pós-trat.	N ₂)	0,859333
Tabela	5.6	(Pós-trat.	$0_{2}^{-})$	0,657697
Tabela	5.7	(Pós-trat.	N_2)	3,049917
Tabela	5.7	(Pós-trat.	$0_{2})$	2,527529
Tabela	5.8	(Pós-trat.	N_2)	2,595480
Tabela	5.8	(Pós-trat.	Ar)	2,013512
			,	-

Examinando os resultados apresentados acima concluímos que o processo de ajustamento (MQLP) proposto nesta tese para ajustar modelos não lineares nos parâmetros constitue uma boa aproximação do (MQNL). Como o método envolve uma transformação na variável dependente ($ln y_i$) é preciso verificar se as suposições básicas do método de mínimos quadrados estão satisfeitas. Para isto foram feitas análises de resíduos correspondente a cada exemplo e mostraram que podemos aceitar as suposições básicas como verdadeiras. Não vamos apresentar estes resultados aqui para não alongar muito o trabalho. Selecionamos apenas as análises apresentadas nas figuras 5.18 e 5.19 correspondentes aos dados das tabelas 5.4 e 5.5 as quais mostram que a suposição de normalidade dos resíduos é satisfeita.

Finalmente concluímos que embora acreditemos no método de ajustamento proposto neste trabalho, reconhecemos que mais trabalho deverá ser feito para comprovar sua eficiência.

- 73 -



 $\frac{\text{Figura 5.18}}{\text{ajuste do modelo S} = e^{-\alpha D - \beta D^2}} \text{ aos dados da Tabela 5.1 pelo método MQLP.}$



 $\frac{\text{Figura}}{\text{do modelo}} \frac{5.19}{\text{S}=\text{e}} - \text{Gráfico de Normalidade dos resíduos produzidos pelo ajuste do modelo S = e}^{-\alpha D} - \beta D^2}$ aos dados da Tabela 5.2 pelo método MQLP.

REFERÊNCIAS

- Abrahamson, S. and Wolff, S. (1976). Re-analysis of radiation-induced specific locus mutation in mouse. Nature 264, 716-719.
- Altman, K. I., Geber, G. B. and Okada, S. (1970). <u>Radiation Biochemistry</u>, Volume 1. Academic Press, New York.
- Armitage, P. and Doll, R. (1961). Stochastic models for carcinogenesis. <u>Fourth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Proba-</u> <u>bility</u>. University of California Press, Berkeley, California 19-38. Atwood, K. C. and Norman, A. (1949). On the interpretation of multihit survival curves. <u>Proceedings of the National Academy of Sciences</u> 35, 696-709.
- Barendsen, G. W. (1961). Damage to the reproductive capacity of human cells in tissue culture by ionizing radiations of different linear energy transfer. In <u>The Initial Effects of Ionizing Radiation on</u> <u>Cells. R. J. C. Harris (ed.)</u>, Academic Press, London, 183-194.
- Bender, M. A. and Gooch, P. C. (1962). The kinetics of X ray survival of mamalian cells <u>in vitro</u>. <u>International Journal of Radiology and</u> Biology 5(2), 133-145.
- Bender, A. M. and Wolff, S. (1961). X ray-induced chromosome aberrations and reproductive death in mammalian cells. <u>The American Naturalist</u> 95(880), 39-52.
- Breween, J. G. and Payne, H. S. (1979). X ray stage sensitivity of mouse oocytes and its bearing on dose-response curves. <u>Genetics</u> 91, 149-161.

- Chadwick, K. H. and Leenhouts, H. P. (1973). A molecular theory of cell survival. Phys. Med. Biol. 18(1), 78-87.
- Chadwick, K. H. and leenhouts, H. P. (1975). The effect of an asynchronous population of cells on the initial slope of dose-effect curves. In <u>Cell Survival After Low Doses of Radiation: Theoretical and Clinical Implications</u>. <u>Proceedings of the Sixth L. H. Gray Conference</u>. T. Alper (ed.), The Institute of Physics and John Wiley and Sons, New York, 57-63.
- Cohen, L. (1975). Cell population kinetics in radiation therapy. Relationship of cellular surviving fraction to RBE and OER. Radiology 114, 213-217.
- Crump, K. S. (1979). Dose Response Problems in Carcinogenesis. <u>Biometrics</u> 35, 157-167.
- Deen, D. F. and Williams, M. E. (1979). Isobologram analysis of X ray-BCNU interaction <u>in vitro</u>. <u>Radiation Research</u> 79, 483-491.
 Douglas, B. G. Fowler, J. F., Denekamp, J., Harris, S. R., Ayres, S. E., Fairman, S., Hill, S. A., Sheldon, P. W. and Stewart, F. A. (1975). The effect of multiple small fractions of X rays on skin reaction in the mouse. In <u>Cell Survival After Low Doses of Radiation: Theoretical and Clinical Implications</u>. <u>Proceedings of the Sixth L. H. Gray Conference</u>. Tikvah Alper (ed.), The Institute of Physics and John Wiley and Sons, New York, 351-361.
- Douglas, B. G. and Fowler, J. F. (1976). The effect of multiple small doses of X rays on skin reaction in the mouse and a basic interpretation. Radiation Research 66, 401-426.
- Dutreix, J. and Wambersie, A. (1974). Cell survival curves deduced from nonquantitative reactions of skin, intestinal mucosa and lung. In <u>Cell Survival After Low Doses of Radiation</u>. Proceedings

of the Sixth L. H. Gray Conference. T. Alper (ed.), The Institute of Physics and John Wiley and Sons, New York, 335-341.

- Franko, A. J. and Sutherland, R. M. (1979). Radiation survival of cells from spheroids grown in different oxygen concentrations. Radiation Research 79, 454-467.
- Goldstein, L. S., Meneses, J. and Pedersen, R.A. (1978). Dose-response relationship for X ray-induced dominant lethal mutations detected in mouse embryos in vitro. <u>Mutation Research</u> 51, 55-59.
- Hollaender, A. (1954). <u>Radiation Biology, Volume 1</u>: <u>High Energy</u>. McGraw Hill, New York.
- Hutchinson, F. and Pollard E. (1961). <u>Target Theory and Radiation</u> <u>Effects on Biological Molecules in Mechanisms in Radiobiology</u>, <u>Volume 1</u>. M. Errero and A. Forssberg (eds.), Academic Press, New York.
- Katz, R., Ackerson, B., Homayoonfar, M. and Sharma, S. C. (1971). Inactivation of cells by heavy ion bombardment. <u>Radiation Research</u> <u>47</u>, 402-425.
- Kellerer, A. M. and Rossi, H. H. (1971). RBE and the primary mechanism of radiation action. Radiation Research 47, 15-34.
- Kellerer, A. M. and Rossi, H. H. (1972). The theory of dual radiation action. Current Topics in Radiation Research Quarterly 8,85-158.
- King, R. C. (1957). The problem of dominant lethals in <u>Drosophila</u> <u>melanogaster</u> females. <u>Proceedings of the National Academy of</u> <u>Sciences</u> <u>43(5)</u>, 282-285.
- Lea, D. E. (1947). <u>Actions of Radiation on Living Cells</u>. Cambridge University Press, London (The Macmillan Company, New York).
- Lyon, M. F., Phillips, R. J. S. and Bailey, H. J. (1972a). Mutagenic effects of repeated small radiation doses to mouse spermatozonia,

I. Specificlocus mutation rates. <u>Mutation Research 15</u>, 185-191. Lyon, M. F., Papworth, D. G. and Phillips, R. J. S. (1972b). Doserate and mutation frequency after irradiation of mouse spermatozonia, <u>Nature New Biology 238</u>, 101-104.

- Lyon, M. F. and Phillips, R. J. S. (1975). Specific locus mutation rates after repeated small radiation doses to mouse oocytes, <u>Mu-</u> tation Research 30, 375-382.
- Muller, H. J. (1927). Artificial transmutation of the gene. <u>Science</u>, <u>66</u>, 84-87.
- Muller, H. J. (1954a). The nature of the genetic effects produced by radiation. In <u>Radiation Biology</u>, 351-473. Alexander Hollaender, McGraw-Hill, New York.
- Muller, H. J. (1954b). The manner of productions of mutations by radiation. In <u>Radiation Biology</u>, 475-626. Alexander Hollaender, Edts. McGraw-Hill, New York.
- Neary, G. J. (1965). Chromosome aberrations and the theory of RBE. International Journal of Radiology and Biology 9, 477-502.
- Peres, C. A. e Koo, J. O. (1981). A comparison of two-component and quadratic models to access survival of irradiated stage 7 oocytes of Drosophila Melanogaster. Mutation Research 91, 341-346.
- Resnick, M. A. e Martin, P. (1976). The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisae</u> and its genetic control. <u>Molecular General Genetics</u> <u>143</u>, 119-129.
- Russel, W. L. (1965). Evidence from mice concerning the nature of the mutation process. In <u>Genetics Today</u>, Volume 2. S. J. Geetrs (ed.), Pergammon Press, Oxford, 257-264.

Sankaranaraynan, K. (1969a). The effects of oxigen and nitrogen posttreatments on the mortality of Drosophila eggs irradiated as stage

- 78 -

7 oocytes. Mutation Research 7, 357-368.

- Sankaranarayanan, K. (1969b). The effects of oxigen and nitrogen posttreatments on the survival of irradiated stage 14 oocytes and a possible basis for sensitivity differences between stage 7 and stage 14 oocytes of <u>Drosophila melanogaster</u>. <u>Mutation Research</u> 7, 369-383.
- Searle, A. G. (1974). Mutation induced in mice. In <u>Advances in Ra-</u> <u>diation Biology, Volume 4</u>. J. T. Lett, H. Alder and M. Zelle (eds.), Academic Press, New York, 131-207.
- Takahashi, E., Hirai, M., Tobari, I. and Nakai, S. (1979). Dose-response relations for dicentric yields in Go Lymphocytes of man and crab-eating monkey following acute and chronic γ-radiations. Mutation Research 60, 357-365.
- Targa, H. J. and Peres, C. A. (1979). Radiation induced dominant lethal mutations in oocytes of musca domestica. <u>Mutation Research</u> 63, pgs. 153-160.
- Tym, R. and Todd, P. W. (1964). The sensitization by iododeoxyridine of cultured human cells to the lethal effect of X rays and heavy ions. <u>International Journal of Radiology and Biology 8(6)</u>, 589-604.
- United Nations (1972). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Ionizing Radiation: Levels and Effects, Volume 2, New York.
- United Nations (1977). Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation: Annex H. Genetic Effects of Radiation, New York.

Wilderöe, R. (1966). High-energy electron therapy and the two-com-

ponent theory of radiation. <u>Acta Radiologica</u> <u>4(4)</u>, 257-278. Wilderöe, R. (1968). New conceptions in radiobiology and radiotherapy. Radiology and Clinical Biology 36, 308-322.

- Wilderöe, R. (1971). Quantitative and qualitative aspects of radiobiology and their significance in radiation therapy. <u>Acta Radio-</u> logico Ther. Ph. Biology 10, 605-624.
- Wolff, S. (1961). Radiation Genetics. In <u>Mechanisms in Radiobiolo-</u> <u>gy</u>. M. Errera and A. Forsberg (eds.), Academic Press, London, 419-475.
- Wolff, S. (1962). The kinetics for two-break chromosome exchange. Journal of Theoretical Biology 3, 304-314.
- Wolff, S. (1967). Radiation Genetics. In <u>Annual Review of Genetics</u>, <u>Volume 1</u>. H. L. Roman, L. M. Sandler and G. S. Stent (eds.), Academic Press, London, 221-243.