

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

EDBERGUE VENTURA LOLA COSTA

Fractais e suas aplicações em processos vasculares

Recife-PE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

EDBERGUE VENTURA LOLA COSTA

Fractais e suas aplicações em processos vasculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Biociência Animal

Orientador: Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Recife-PE

2014

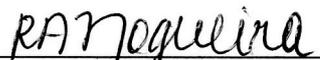
EDBERGUE VENTURA LOLA COSTA

Fractais e suas aplicações em processos vasculares

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Biociência Animal

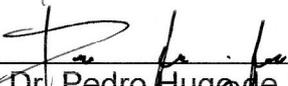
Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 6 de junho de 2014

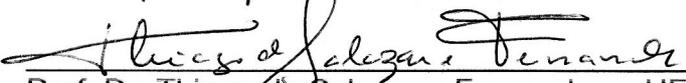
Banca examinadora

  
Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira (orientador) - UFRPE

  
Prof. Dr. Fabricio Bezerra de Sá – UFRPE

  
Prof. Dr. George Chaves Jimenez- UFRPE

  
Prof. Dr. Pedro Hugo de Figueiredo – UFRPE

  
Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes – UFPE

Recife-PE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas oportunidades e pelas lições.

Agradeço aos meus pais Silvio e Helena, pelo o amor e assistência constante.

Aos meus irmãos Cibhergue e Timbhergue, pela companhia e apoio fraterno.

A todos meus familiares e amigos.

Aos professores Dr. Romildo A. Nogueira e Dr. George C. Jimenez pela paciência e orientação em minha vida acadêmica.

## RESUMO

A vasculogênese e angiogênese são responsáveis pela formação da rede de vasos sanguíneos. Estes dois mecanismos não estão apenas relacionados ao desenvolvimento do embrião, como também estão ocorrendo em outras condições fisiológicas e algumas enfermidades. O processo de ramificação vascular determina a autossimilaridade na rede vascular o que o caracteriza como um objeto fractal. Sendo assim capaz de ser avalizado pelos métodos fractais, que têm potencial para mensurar alterações uma vez que descrevem o grau de complexidade da rede vascular. Por meio da retinografia (imagem do fundo de olho), a rede vascular retiniana pode ser avaliada pelos métodos fractais com a finalidade de se averiguar alterações acarretadas por algumas enfermidades. Também este procedimento morfométrico pode ser utilizado para analisar a ação do campo magnético (CM) na rede vascular sanguínea, uma vez que a literatura especializada descreve vários efeitos deste agente físico sobre a rede vascular. Alguns modelos experimentais têm sido propostos para se estudar tanto doenças como possíveis efeitos de agentes físicos, químicos sobre o processo vascular, pode-se entre eles citar a membrana do saco vitelínico (MSV) do embrião de aves e o fundo de olho de mamíferos. Um ótimo modelo para estudar a ação de CM sobre os vasos sanguíneos é a MSV do embrião de codorna, que é um órgão extraembrionário bastante vascularizado. Por outro lado, um protocolo adequado para se estudar as doenças vasculares da retina é a observação e registro do fundo de olho.

A conclusão desta tese é dividida em duas partes. Primeiramente, os métodos fractais e a contagem de pontos de bifurcação mostraram que não houve diferença entre a rede vascular retiniana de pacientes diabéticos com e sem sinais da retinopatia diabética não proliferativa (RDNP). Em segundo, a lacunaridade e análise multifractal foram capazes de revelar uma inibição da vasculogênese e angiogênese da rede vascular MSV de embrião de codorna, devido a atuação de um CM de intensidade de 1 mT com frequência de 60 Hz. Além disso, tanto a rede vascular das regiões retinianas como da MSV apresentaram multifractalidade.

Palavras-chave: vasculogênese, angiogênese, retina, membrana do saco vitelínico, fractal.

## **ABSTRACT**

The vasculogenesis and angiogenesis are responsible for the formation of the blood vessels network. These two processes are not only related to the embryonic development, as are also occurring in physiological conditions and some other diseases. The process of the vascular branching determines the self-similarity in the vascular network itself characterizing as a fractal object. Thus the vascular network is able to be evaluated by fractal methods, these methods have the potential to measure changes since that describe the degree of complexity of the vascular network. Through the retinography (eye fundus image), retinal vascular network can be evaluated by fractal methods in order to ascertain changes promoted by some diseases. This fractal methods can be used to examine the action of the magnetic field (CM) in the blood vascular network, since the literature describes various physical effects of this agent on the vascular network. Some experimental models have been proposed to study both diseases as possible effects of physical, chemical on the vascular process, among them are the yolk sac membrane (YSM) of the birds embryo and the mammals retina. A great model for studying the action of CM on blood vessels is the MSV of quail embryo, which is an extraembryonic organ very vascularized. On the other hand, a suitable protocol to study the retinal vascular diseases is the observation and recording of the eye fundus. This thesis concluded, first, that the fractal methods and the counting of bifurcation points showed that there was difference between the retinal vasculature of diabetic patients with and without signs of non-proliferative diabetic retinopathy. Second, the lacunarity and multifractal analysis were able to reveal an inhibition of vasculogenesis and angiogenesis of the vascular network of the YSM of quail embryo due the MF action of 1 mT intensity with a 60 Hz frequency. Moreover, both vascular networks of YSM and of retinal regions showed a multifractal behavior.

Keywords: vasculogenesis, angiogenesis, retina, yolk sac membrane, fractal.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Fractais: uma visão geral .....	17
2.2 Exemplos de fractais.....	19
2.2.1 Fractais gerados por sistemas de funções iteradas.....	19
2.2.2 Fractais gerados por agregação .....	26
2.2.3 Fractais na natureza .....	27
2.3 Os métodos fractais e suas aplicações fisiológicas .....	29
2.3.1 Os métodos de obtenção da dimensão fractal.....	29
2.3.2 Fractais e sistemas complexos .....	40
2.4 Rede vascular sanguínea .....	42
2.4.1 Composição estrutural e classificação dos vasos sanguíneos .....	42
2.5 Formação da rede vascular sanguínea.....	48
2.5.1 Vasculogênese .....	48
2.5.2 Angiogênese.....	50
2.5.3 Matriz extracelular e moléculas de adesão na rede vascular sanguínea...53	
2.5.4 Fatores de crescimento na rede vascular sanguínea .....	54
2.6 Ação de campo magnético na rede vascular sanguínea .....	56
2.7 Membrana do saco vitelínico do embrião de aves : um modelo para o estudo da vasculogênese e da angiogênese .....	58
2.8 Rede vascular retiniana e a retinopatia diabética não proliferativa.....61	
2.9 Aplicações dos métodos de dimensão fractal na avaliação da complexidade da rede vascular sanguínea.....	65
3. OBJETIVOS .....	68
3.1 Objetivo geral .....	68
3.2 Objetivos específicos.....	68
4.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	69
CAPÍTULO II .....	85
RESUMO .....	86
INTRODUÇÃO .....	87
MATERIAIS E MÉTODOS .....	88
RESULTADOS.....	95
DISCUSSÃO .....	103
CONCLUSÃO .....	106
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	107
CAPÍTULO III .....	110
RESUMO .....	111
INTRODUÇÃO .....	112
MATERIAIS E MÉTODOS .....	114
RESULTADOS.....	118
DISCUSSÃO.....	123
CONCLUSÃO .....	126
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	126
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	131
APÊNDICES .....	132
APÊNDICE I.....	132

ABSTRACT .....	133
INTRODUCTION.....	134
MATERIAL AND METHODS.....	135
RESULTS .....	143
DISCUSSION.....	150
CONCLUSION .....	154
REFERENCES.....	154
GUIDE FOR AUTHORS.....	157
APÊNDICE II.....	168
ABSTRACT .....	169
INTRODUCTION.....	170
MATERIAL AND METHODS.....	172
RESULTS .....	177
DISCUSSION.....	182
CONCLUSION .....	185
REFERENCES.....	186
GUIDE FOR AUTHORS.....	190

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras do Capítulo I

Figura 1. Formação do Conjunto de Cantor até a sexta iteração.....	20
Figura 2. Construção da curva de Koch até o nível 4 de iteração.....	21
Figura 3. Floco de neve de Koch até o quinto nível de iteração.....	21
Figura 4. Curva de Peano até a terceira iteração.....	22
Figura 5. Triângulo de Sierpinski até a quinta iteração.....	24
Figura 6. Tapete de Sierpinski até a quarta iteração.....	25
Figura 7. Esponja de Sierpinski-Menger.....	25
Figura 8. Difusão limitada por agregação.....	26
Figura 9. Formação de dedos viscosos.....	26
Figura 10. Modelo de junção de agregados.....	27
Figura 11. Ramificação brônquica pulmonar.....	29
Figura 12. Brócolis romanesco.....	29
Figura 13. Conjunto de Cantor até a 2 <sup>o</sup> iteração utilizando dois fatores.....	32
Figura 14. Atrator de Lorenz.....	41
Figura 15. Capilar contínuo, capilar fenestrado e capilar sinusóide.....	44
Figura 16. Representação geral das túnicas para artérias e veias.....	47
Figura 17A. Vasculogênese.....	52
Figura 17B. Angiogênese.....	52
Figura 18. Membrana do saco vitelínico de embrião de codorna (72 hora de incubação).....	61
Figura 19. Saco vitelínico e outras estruturas extraembrionárias.....	61
Figura 20. Esquema anatômico do globo ocular.....	64
Figura 21. Ilustração histológica da retina de rato representando as camadas retinianas.....	64
Figura 22. Tipos de células da retina.....	64
Figura 23. Imagem de fundo de olho de um indivíduo com RDNP.....	64

## **Figuras do capítulo II**

Figura 1.....	89
Figura 2.....	92
Figura 3.....	97
Figura 4.....	101
Figura 5.....	102

## **Figuras do capítulo III**

Figura 1.....	115
Figura 2.....	120
Figura 3.....	122

## LISTA DE TABELA

### Tabelas do capítulo II

Tabela 1.....	96
Tabela 2.....	98
Tabela 3.....	99
Tabela 4.....	100
Tabela 5.....	103

### Tabelas do capítulo III

Tabela 1.....	119
Tabela 2.....	121
Tabela 3.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

CADASIL – Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infacts and leukoencephalopathy (arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia)

CM – Campo magnético

CEM – Campo eletromagnético

CEVUH – Células endoteliais de veias umbilicais humanas

CM-FEB – Campo magnético de frequência extremamente baixa

CPE – Células progenitoras endoteliais

eNOS – Endothelial nitric oxide synthase (óxido nítrico sintase endotelial)

FGF – Fibroblast growth factor (fator de crescimento fibroblástico)

G-CSF – Granulocyte colony stimulating factor (fator estimulador de colônia de granulócito)

HGF – Hepatocyte growth factor (fator de crescimento de hepatócito)

ICAM – Intercellular adhesion molecule (molécula de adesão intercelular)

IGF – Insulin like growth factor (fator de crescimento semelhante à insulina)

IL – Interleucina

Inf – Interferon

MCA – Membrana corioalantóide

MEC – Matriz extracelular

MSV – Membrana do saco vitelínico

PDGF – Platelet-derived growth factor (fator de crescimento derivado de plaqueta)

PHD – Prolyl hydroxylase domain (domínio de prolil-hidroxilase)

PLGF – Placental growth factor (fator de crescimento placentário)

PVC – Polyvinyl chloride (cloreto de polivinila)

RDNP – Retinopatia diabética não proliferativa

RDP – Retinopatia diabética proliferativa

SV – Saco vitelínico

TGF – Transforming growth factor (fator de crescimento de transformação)

TNF – Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

VCAM – Vascular cell adhesion molecule (molécula de adesão de célula vascular)

VEGF – Vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)

VEGFR – Vascular endothelial growth factor receptor (receptor de fator de crescimento endotelial vascular)

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

A forma e a dinâmica de alguns órgãos dos seres vivos podem ser descritos através de métodos fractais. Um dos vários exemplos de objeto fractal nos seres vivos é a rede vascular sanguínea (MANDELBROT, 1983; MANDELBROT, 1991; BASSINGTHWAIGHTE *et al*, 1994; LIEBOVITCH, 1998).

Um objeto fractal é caracterizado por propriedades como autossimilaridade e dependência de escala. O crescimento da rede vascular se faz através de ramificações, onde os vasos maiores geram novos vasos cada vez menores. No entanto, o processo de ramificação em qualquer escala observada ocorre de maneira semelhante. Esta dinâmica define a rede vascular como uma estrutura autossimilar, que é uma característica de uma estrutura fractal (BASSINGTHWAIGHTE *et al*, 1994; LIEBOVITCH, 1998; NUSSENZVEIG, 1999).

O desenvolvimento da rede vascular pode ser resumido em dois processos: vasculogênese e angiogênese. Na vasculogênese embrionária, os hemangioblastos, precursores dos angioblastos e das células hematopoiéticas surgem no mesoderma do saco vitelínico (SV) e formam as ilhotas sanguíneas. As ilhotas se agrupam para formar a parede vascular do plexo capilar primitivo (FLAMME *et al.*, 1997; FERGUSON *et al.*, 2005).

No período pós-natal, a vasculogênese ocorre em algumas condições fisiológicas e patológicas. Porém este processo não é mais caracterizado por células provenientes do folheto embrionário e sim por células geradas pelas células tronco do tecido hematopoiético, conhecidas como células progenitoras endoteliais- CPE (URBICH; DIMMELER, 2004; ASAHARA *et al.*, 2011).

O surgimento de vasos a partir de vasos preexistentes é denominado de angiogênese e que está relacionada à ontogênese do indivíduo, porém também pode ocorrer em algumas enfermidades (FOLKMAN, 2007, EMMETT *et al.*, 2011). Assim, após ocorrer a degradação proteolítica da matriz extracelular (MEC) as células endoteliais migram por quimiotaxia, sofrem adesão, proliferam e diferenciam-

se formando um novo túbulo endotelial onde ocorrerá o fluxo sanguíneo (RISAU, 1997; DING *et al.*, 2006).

A geometria fractal é capaz de identificar alterações na rede vascular retiniana promovidas por doenças (LANDINI *et al.*, 1995; AVAKIAN *et al.*, 2002; CHEUNG *et al.*, 2009; DOUBAL *et al.*, 2010; CAVALLARI *et al.*, 2011). A geometria fractal também tem sido usada na avaliação da angiogênese influenciada pela atuação de moléculas extrínsecas ao sistema vascular (PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b; MCKAY *et al.*, 2008; VÝBOH *et al.*, 2010) e avaliação da vasculogênese e angiogênese submetidas a ação de agentes físicos como o campo magnético - CM (COSTA *et al.*, 2013).

Algumas enfermidades podem apresentar a vasculogênese e a angiogênese decorrentes de desordens orgânicas (DIAS *et al.*, 2002; CARMELIET, 2003; BOSCOLO; BISCHOFF, 2009; ZHUANG *et al.*, 2014). A retinopatia diabética é uma doença que possui um estágio em que a angiogênese é evidenciada (retinopatia diabética proliferativa - RDP). No estágio precoce da retinopatia diabética (retinopatia diabética não proliferativa - RDNP), a angiogênese não é uma característica, no entanto, as alterações nesta fase contribuem para o surgimento da neovascularização (ANTONETTI *et al.*, 2006; CRAWFORD *et al.*, 2009; TREMOLADA *et al.*, 2012).

A rede vascular retiniana pode ser avaliada através da análise fractal da imagem de fundo de olho (retinografia) e pode ser usada como ferramenta para diagnóstico da RDNP (AVAKIAN *et al.*, 2002; CHEUNG *et al.*, 2009). Uma vez identificada a RDNP, terapias podem ser utilizadas evitando-se que o estágio da doença avance para uma RDP.

A angiogênese pode ser observada através da retinografia, quando a retina manifesta a RDP. Mas tanto a angiogênese quanto a vasculogênese podem ser estudadas através de modelos animais. Um bom modelo para análise destes processos fisiológicos é a rede vascular da membrana do saco vitelínico (MSV) de aves (DIAS *et al.*, 2008a; DIAS *et al.*, 2008b; STRASSMANN *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; MENEGHELLI *et al.*, 2013) sendo uma estrutura de fácil acesso, visualização e manipulação da vascularização. Este modelo de abordagem dos

vasos sanguíneos permite o estudo de substâncias que influenciam o processo de angiogênese e vasculogênese (DIAS *et al.*, 2008a; DIAS *et al.*, 2008b), bem como o estudo da atuação do CM sobre o desenvolvimento da rede vascular (COSTA *et al.*, 2013). A ocorrência ou não de alterações na vascularização promovidas pela ação do CM pode ser avaliada por procedimentos morfométricos, sendo a geometria fractal uma excelente opção (COSTA *et al.*, 2013).

Kunick *et al* (2009) não têm identificado alteração na dimensão fractal da rede vascular em imagens segmentada de indivíduos com RDNP em relação a indivíduos diabéticos sem a retinopatia. Por outro lado, Avakian *et al.* (2002) e Cheung *et al.* (2009) usando imagens esquelizadas (todos os vasos tendo uma única espessura fina) observaram diferença significativa entre os indivíduos normais e com RDNP.

Costa *et al.* (2013) têm utilizado os mesmos métodos de obtenção da dimensão fractal usados por Kunick *et al* (2009), observando uma inibição dos processos de formação da rede vascular da MSV de embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*), quando expostos a determinadas doses de um CM de intensidade de 1 mT com frequência de 60 Hz por diferentes intervalos de tempos.

A dimensão fractal descreve quanto do espaço é preenchido pelo objeto analisado. No entanto, entre os métodos fractais se encontra um parâmetro complementar chamado de lacunaridade que descreve como o espaço esta sendo preenchido pelo objeto (GOULD *et al.*, 2011); também existe um procedimento designado de análise multifractal, que caracteriza um objeto multifractal através de seu espectro de dimensões fractais (STÖSIĆ; STÖSIĆ, 2006).

A finalidade desta tese é testar se os métodos fractais podem ser usados como ferramenta no diagnóstico das enfermidades relacionadas à morfologia da rede vascular retiniana. Além disso, testar se esses mesmos métodos são capazes de identificar possíveis alterações no desenvolvimento da rede vascular promovidas pela ação de um campo magnético.

O primeiro objetivo desta tese é verificar se a dimensão de contagem por caixas, dimensão de informação, parâmetro de lacunaridade e análise multifractal (dimensões generalizadas e espectro de singularidade) são capazes de diagnosticar a RDNP em imagens esquelizadas da rede vascular retiniana de pacientes diabéticos.

O segundo objetivo é avaliar se a lacunaridade e a análise multifractal possuem sensibilidade para identificar possíveis efeitos de um CM de baixa frequência sobre a rede vascular da MSV do embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*), que tem sido um dos objetos de estudo em nosso laboratório.

No primeiro capítulo desta tese, é apresentada uma revisão sobre a geometria fractal, os vasos sanguíneos e seus processos de formação. Além disso, há uma breve descrição sobre os efeitos do CM em vasos sanguíneos; MSV de embrião de aves, a retina e a retinopatia diabética.

O segundo capítulo é referente ao primeiro objetivo da tese, ele relata, em forma de artigo científico, os métodos fractais aplicados nas imagens esqueletizadas do leito vascular retiniano obtidas em retinografias de pacientes com diabetes, alguns deles já apresentando os sinais da RDNP.

Concernente ao outro objetivo da tese, o terceiro capítulo descreve, num artigo científico, a utilização da lacunaridade e análise multifractal em imagens adquiridas do leito vascular do MSV do embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) exposto por diferentes intervalos de tempos a um CM com intensidade de 1 mT e frequência de 60 Hz.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fractais: uma visão geral

Por muito tempo a geometria euclidiana tem sido utilizada para representar as formas de muitos objetos existentes. No entanto, sabe-se da inadequação desta geometria para descrever as formas irregulares encontradas na natureza. Uma abordagem desta questão pode ser encontrada na medida da extensão da fronteira entre países ou da costa marítima de um país (MANDELBROT, 1991).

Sendo a costa de um país uma linha bastante sinuosa, a sua medida pode ser realizada considerando-se uma escala adequada e usando-se um compasso com uma abertura de determinado comprimento  $l$ , iniciando cada passo no ponto em que o anterior finalizou até percorrer toda a extensão costeira num mapa. O valor da abertura  $l$  (escala) multiplicado pelo número de passos  $n$  necessários para percorrer o mapa da costa tem um comprimento total aproximado  $L$ , assim

$$L(l)=nl \quad (1).$$

O método representado pela equação 1 pode ser repetido com aberturas cada vez menores e se observa que  $L(l)$  tende a aumentar sem limite definido. O método descrito acima para mensurar o comprimento da costa é uma tentativa de medir a dimensão de um objeto com uma forma demasiadamente irregular. Quanto menor o valor de  $l$ , mais detalhes são observados e com isso mais irregularidades aparecerão. Então, pode-se deduzir que o comprimento da costa no mapa vai depender da escala utilizada para medi-la. Lewis Fry Richardson mostrou que

$$L(l)=l^\alpha \quad (2),$$

onde o expoente  $\alpha$  depende das irregularidades da costa. Assim,  $\alpha$  terá diferentes valores quando forem usadas diferentes escalas (MANDELBROT, 1991).

A geometria da natureza não é absoluta, ou melhor, não há uma geometria intrínseca à natureza, o homem é que acaba escolhendo a geometria em função de

sua comodidade e da maior adequação a descrição dos fenômenos em estudos (NUSSENZVEIG, 1999). Assim, Benoît Mandelbrot (1924-2010) sistematizou e aperfeiçoou vários estudos matemáticos visando uma melhor representação da geometria irregular encontrada na natureza. Ele criou o termo fractal, durante a década de 70, cuja acepção etimológica procede do radical *fractus* proveniente do verbo latino *frangere* que significa produzir pedaços irregulares, fragmentados, quebradiços. Ele introduziu esta palavra para designar estruturas que possuem uma forma extremamente irregular ou fragmentada e que repete geometricamente ou estaticamente a mesma estrutura em diferentes escalas (SILVA *et al.*, 2003; CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2004).

Esses objetos são caracterizados por algumas propriedades: 1) autossimilaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo são semelhantes ao objeto ou processo todo; 2) dependência de escala (scaling), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual foi medida; 3) dimensão fractal, a qual provê uma descrição quantitativa da autossimilaridade e dependência de escala e 4) as propriedades estatísticas anômalas das grandezas fractais, que se caracterizam pela inexistência de média e variância dos objetos e processos fractais (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994; LIEBOVITCH, 1998, NUSSENZVEIG, 1999).

O objeto fractal pode ser caracterizado em especial por sua autossimilaridade geométrica ou estatística e dependência de escala. As demais características são inerentes a estas duas propriedades. Os objetos fractais podem possuir irregularidades ou fragmentações ao extremo, significando que os recursos iterativos ou as formas semelhantes observadas em diferentes escalas podem tender ao infinito para uma estrutura fractal altamente complexa (NUSSENZVEIG, 1999; ASSIS *et al.*, 2008).

Muitos objetos ou processos naturais têm propriedades próximas aos dos fractais, em particular a simetria de escala, portanto podem ser descritos pela geometria fractal, pelo menos em determinados domínios (NUSSENZVEIG, 1999). Para estruturas biológicas, suas partes não são cópias reduzidas fiéis à estrutura inteira (DEVILHA *et al.*, 2013). Elas possuem certa semelhança podendo ser designada de autossimilaridade estatística, isto é, as propriedades estatísticas das partes da estrutura são proporcionais às propriedades estatísticas da estrutura

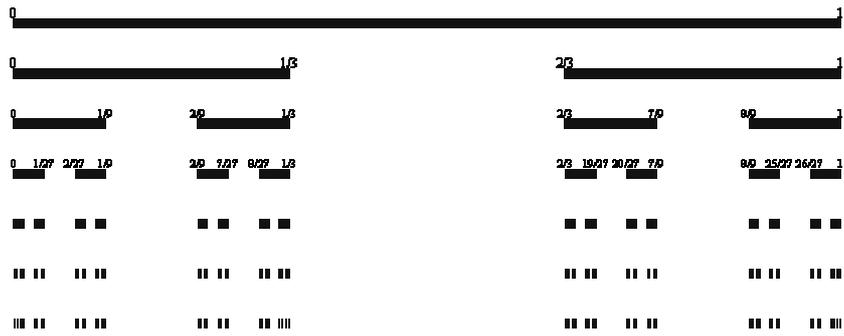
inteira. Podemos tomar como exemplo a taxa média de ramificação dos grandes vasos sanguíneos que pode ser semelhante à taxa de ramificação dos pequenos vasos (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

## **2.2 Exemplos de fractais**

### **2.2.1 Fractais gerados por sistemas de funções iteradas**

Os fractais podem ser encontrados na natureza ou serem construídos matematicamente. Existem métodos de geração de estruturas fractais por agregação ou pelos sistemas de funções iteradas. Estes sistemas de funções iteradas são procedimentos baseados em operações da geometria clássica. Por meio dos sistemas de funções iteradas, podem-se construir vários objetos fractais. A autossimilaridade da forma geométrica é especificada por meio de um algoritmo que instrui como criar o objeto fractal (NUSSENZVEIG, 1999).

Uma estrutura matemática, com características de um objeto conhecido atualmente como fractal, foi proposta por Georg Cantor há cerca de 150 anos. Essa estrutura denominada de conjunto de Cantor pode ser construída geometricamente pelos seguintes procedimentos: um segmento de reta é dividido em três segmentos iguais, no qual é retirado o seguimento intermediário. A seguir, os dois segmentos restantes são divididos em três segmentos e novamente os seus segmentos intermediários são removidos, como apresentado na Figura 1 (MANDELBROT, 1983; FALCONER, 1990; MANDELBROT, 1991; BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994; NUSSENZVEIG, 1999; ASSIS *et al.*, 2008). Este processo segue *ad infinitum*. O conjunto de Cantor é o conjunto de pontos restantes após infinitas operações terem sido realizadas.



**Figura 1. Formação do Conjunto de Cantor até a sexta iteração. Dividindo o segmento de reta em três partes iguais e removendo o terço médio são obtidos dois segmentos, que ao repetir a instrução empregada várias vezes darão origem ao conjunto de Cantor. Fonte: <http://www.im.ufrj.br/~risk/diversos/tamanho.html>**

Outra estrutura fractal é a curva de Koch, um exemplo padrão usado para ilustrar que uma curva pode ter uma dimensão fractal  $D > 1$ , apesar de sua dimensão topológica ser unitária. Este fractal é construído a partir da divisão de um segmento de reta em três segmentos de igual medida. O terço médio da reta é substituído por dois segmentos de  $1/3$  do comprimento da reta anterior, que formam com o terço médio do segmento removido um triângulo equilátero sem base. Este procedimento resulta numa figura de tamanho igual a quatro segmentos de retas de comprimentos iguais a  $1/3$  do segmento de reta inicial (MANDELBROT, 1983; FEDER, 1988; FALCONER, 1990).

O algoritmo é repetido de maneira que na segunda iteração, cada segmento originado é dividido novamente em três partes e o terço médio é substituído por dois segmentos de um terço do segmento anterior. Desta forma, são obtidos quatro segmentos de um terço para cada um dos quatro segmentos originais, resultando num total de 16 segmentos com comprimento de  $1/9$  da reta original (FEDER, 1988). Assim, sucessivamente, o algoritmo vai sendo repetido até que uma estrutura semelhante à Figura 2 seja obtida.

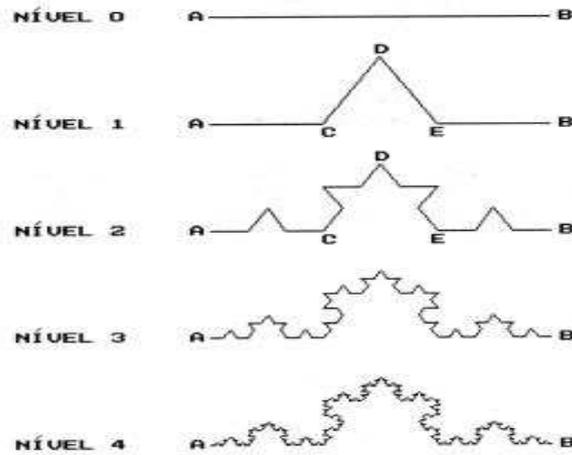


Figura 2. Construção da curva de Koch até o nível 4 de iteração. A estrutura é formada pela divisão do segmento de reta em três partes iguais e substituindo o terço médio por dois segmentos de um terço do segmento de reta original, formando um triângulo equilátero sem base sobre o segmento anterior. Fonte: <http://www.inf.ufsc.br/~visao/2000/fractais/>

O mesmo algoritmo poderá ser empregado para cada lado do triângulo, gerando o designado floco de neve de Koch (MANDELBROT, 1983; FALCONER, 1990; BASSINGTHWAIGHTE *et al*, 1994; ASSIS *et al.*, 2008), como visto na Figura 3.

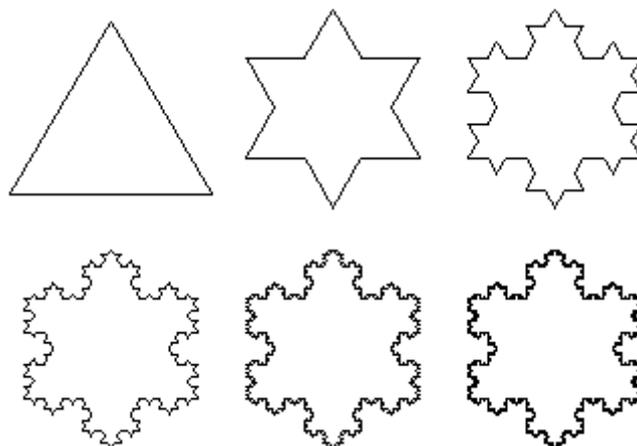
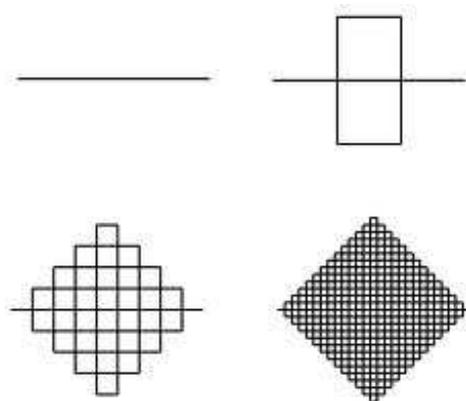


Figura 3. Floco de neve de Koch até o quinto nível de iteração. Na construção desta imagem fractal é usado o mesmo algoritmo empregado para gerar a curva de Koch, sendo este começando a partir de um triângulo. Fonte: [http://www.jayrus.art.br/Apostilas/7\\_UPE/Fractais\\_Natureza.htm](http://www.jayrus.art.br/Apostilas/7_UPE/Fractais_Natureza.htm)

Lieberman-Aiden *et al.* (2009) mostraram, usando uma técnica molecular, que a compactação do DNA segue uma geometria semelhante à curva de Peano. A estrutura formada por esse processo foi denominada de “fractal globule”. A curva de Peano é uma estrutura fractal que tem a capacidade de preencher o plano partindo de um segmento de reta (FEDER, 1988). O processo consiste em criar nove segmentos sendo cada um deles equivalentes a um terço da reta original, mantendo-se todos eles integrados a reta original (MANDELBROT, 1983; FEDER, 1988; PEITGEN *et al.*, 1992). Dividindo a reta em três partes iguais, sobre terço médio serão acrescentados três segmentos no sentido superior e três no sentido inferior, de modo a formar um quadrado na região superior e inferior da reta (segunda imagem da Figura 4). Para cada segmento da segunda imagem repete-se o método resultando na terceira imagem e a última imagem é o terceiro nível de iteração.



**Figura 4. Curva de Peano até a terceira iteração. Como mostrado na figura é gerado seis segmentos de um terço do segmento de reta de origem, formando dois quadrados opostos com um lado em comum que é o segmento de reta original. Fonte:<http://www.avaad.ufsc.br>**

Hans Meinhardt (2009), em seu livro *a beleza algorítmica das conchas do mar*, mostra semelhanças entre estruturas geradas em computador (o triângulo de Sierpinski) com conchas do mar.

O triângulo de Sierpinski é gerado por um algoritmo que em cada iteração remove um triângulo que tem um quarto da área do triângulo anterior (FALCONER, 1990; BASSINGTHWAIGHTE *et al*, 1994). Cada novo triângulo é formado dividindo-se os lados do triângulo equilátero em dois segmentos (1/2 comprimento de cada lado) e unido os pontos médios de cada um desses lados, gerando um objeto correspondente a área de três novos triângulos com metade dos lados originais (Figura 5).

A área do triângulo equilátero é  $\frac{l^2\sqrt{3}}{4}$ , dividindo-o em quatro novos triângulos, o triângulo central removido terá a área de  $\frac{l^2\sqrt{3}}{4^2}$ . Assim na primeira iteração ( $n=1$ ), a figura formada terá uma área correspondente a três triângulos de áreas iguais ao triângulo retirado ou  $\frac{3l^2\sqrt{3}}{4^2}$ . Na segunda iteração, os três novos triângulos centrais removidos terão a área quatro vezes menor, ou seja, 1/16 da área do triângulo original, ou seja,  $\frac{l^2\sqrt{3}}{4^3}$ . Na terceira iteração, os nove triângulos centrais retirados terão uma área de  $\frac{l^2\sqrt{3}}{4^4}$ . A cada iteração o número de triângulos removidos é representado por  $q$ , onde

$$q = 3^{n-1} \quad (3).$$

Na equação 3,  $n$  é o número de iterações. A área de cada triângulo removido corresponderá a uma fração cujo denominador é uma potência de base quatro. Sendo  $n$  o número de iterações, a área do triângulo equilátero removido (*Área*) pode ser calculada através da expressão 4:

$$\text{Área} = \frac{l^2\sqrt{3}}{4^{n+1}} \quad (4).$$

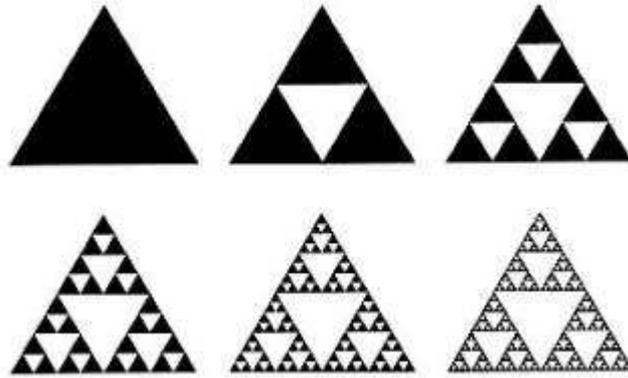


Figura 5. Triângulo de Sierpinski até a quinta iteração. A cada  $n$  iteração  $3^{n-1}$  triângulos invertidos são removidos dos centros dos triângulos anteriores. Fonte: <http://www.inf.ufsc.br/~visao/2000/fractais/>

Também se pode aplicar um algoritmo parecido para o quadrado, dividindo-o em nove quadrados congruentes e removendo o quadrado central. Estas iterações sucessivamente resultarão no chamado tapete de Sierpinski. O novo quadrado retirado será correspondente a  $1/3$  do comprimento do lado  $l$  do quadrado original, assim sua área será nove vezes menor do que área do quadrado original  $\frac{l^2}{9}$ . Na primeira iteração o polígono terá a área de oito quadrados de área  $\frac{l^2}{9}$ . Realizando a segunda iteração, os oitos quadrados a serem removidos terão  $1/9$  do comprimento do lado  $l$  do quadrado original, resultando numa área de  $\frac{l^2}{81}$ . O número e a área dos quadrados que serão subtraídos da imagem original são expressos respectivamente pelas equações

$$q = 8^{n-1} \quad (5)$$

e

$$\text{Área} = \frac{l^2}{9^n} \quad (6),$$

onde  $q$  é o número de quadrados a serem removidos e  $n$  é o número de iterações.

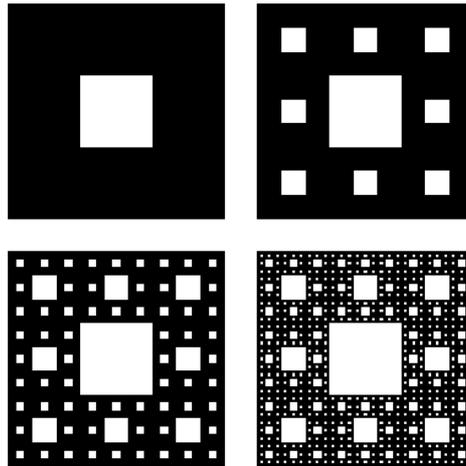


Figura 6. Tapete de Sierpinski até a quarta iteração. O quadrado é dividido em 9 quadrados iguais, sendo removido o quadrado central. A cada  $n$  iteração,  $8^{n-1}$  quadrados são removidos do centro do quadrado anterior. Fonte: <http://professorandrios.blogspot.com.br>

O procedimento iterativo aplicado para gerar o tapete de Sierpinski pode ser usado em um cubo, originando um fractal tridimensional chamado de esponja de Sierpinski-Menger. Esta figura após infinitas iterações tende para um volume nulo e o perímetro total dos seus buracos é infinito (MANDELBROT, 1991; ASSIS *et al.*, 2008).

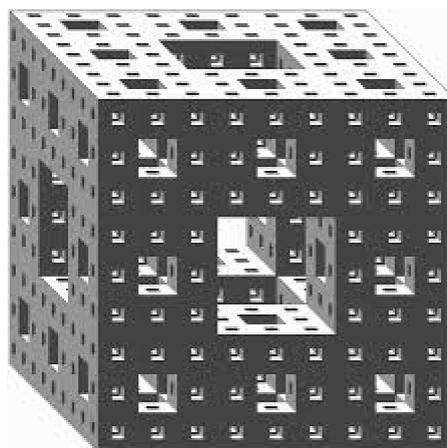


Figura 7. Esponja de Sierpinski-Menger. Para a construção da esponja é utilizado o mesmo algoritmo para gerar o Tapete de Sierpinski. Fonte: <http://loversofmath.blogspot.com.br/2008/05/fractais.html>

### 2.2.2 Fractais gerados por agregação

São vários os processos de agregação que ocorrem na natureza: a eletrodeposição, partículas de fumaça e formação de colônias de bactérias (NUSSENZVEIG, 1999). Um modelo computacional bem conhecido na literatura especializada é o DLA (Diffusion-Limited Aggregation), que é uma difusão de partículas que tem como limite um processo de agregação a uma partícula fixa (semente), ou seja, a difusão para no instante que a partícula se agrega. No momento da agregação de uma partícula, outra partícula inicia a sua difusão numa região do espaço onde o processo está ocorrendo. Este algoritmo após repetição de um grande número de vezes forma um agregado de partículas que depende do número de repetições do processo. Este algoritmo criado por Witten e Sander (1983) permite gerar um DLA (Figura 8) e tem sido usado para mimetizar um grande número de processos: depósito de metais no catodo pela passagem de corrente elétrica, ruptura dos dielétricos quando submetidos à alta voltagem, agregação de coloides e crescimento de cristais. Este modelo também representa um fenômeno que acontece no deslocamento de fluidos com diferentes viscosidades (Figura 9), conhecido como dedos viscosos (FEDER, 1988).

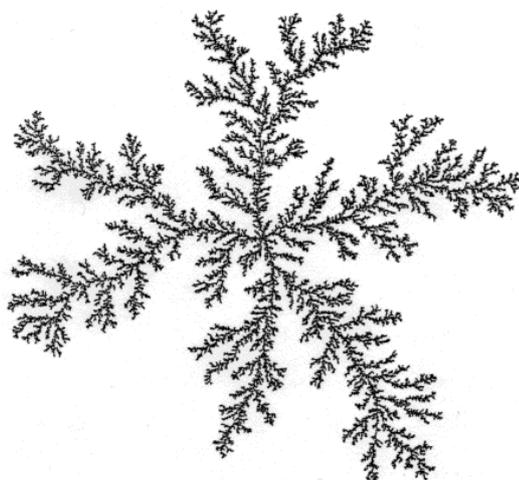


Figura 8. Difusão limitada por agregação é capaz de representar alguns fenômenos que ocorre na natureza como o fenômeno de formação de dedos viscosos representado pela ilustração ao lado. Fonte: <http://classes.yale.edu/fractals/panorama/phys>

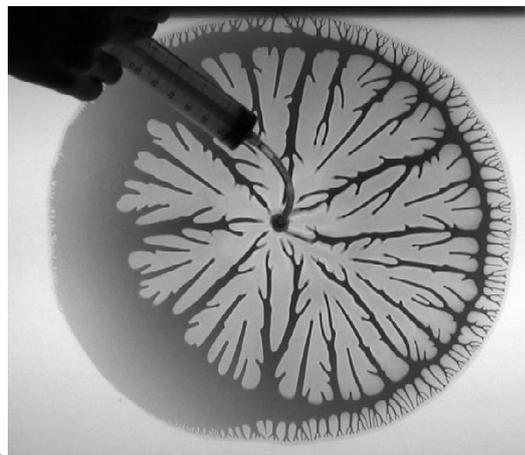
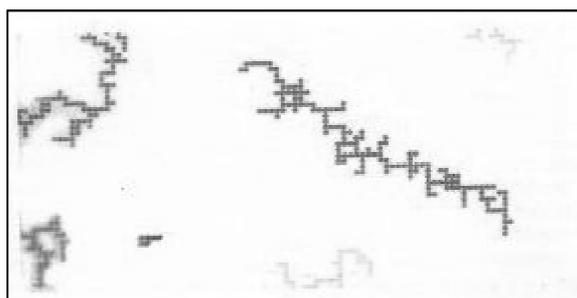


Figura 9. Formação de dedos viscosos promovido pelo experimento de Hele-Shaw Cell usando glicerina, ar e água. Fonte: <http://n-e-r-v-o-u-s.com/blog/?tag=viscous-fingering>

A outra forma de agregação é o modelo de junção de agregados criado por P. Meakin, M. Kolb, R. Botet e R. Julien, em 1983. Partículas estão deslocando aleatoriamente sobre uma rede de pontos, quando se encontram formam agregados que se tornam cada vez maiores. Esse processo tem importância em alguns fenômenos, como a da absorção e dispersão da luz (NUSSENZVEIG, 1999).



**Figura 10. Modelo de junção de agregados. Diferente do DLA, este processo não possui as partículas denominadas de semente, ocorrendo a agregação de partículas de forma dispersa como apresentado acima. Fonte: <http://www.ced.ufsc.br>**

### **2.2.3 Fractais na natureza**

Os fractais apresentados anteriormente são fractais que possuem autossimilaridade geométrica e seu padrão iterativo é expresso através de um algoritmo. Os fractais gerados por agregação tentam representar alguns dos fenômenos físicos e químicos (NUSSENZVEIG, 1999), como ilustrado na Figura 9. Diferentemente, os fractais biológicos possuem autossimilaridade estatística, por suas partes não serem réplicas reduzidas morfológicamente autênticas a estrutura inteira (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

A hierarquia de repetição é bastante limitada nas estruturas ou processos biológicos, não seguindo ao infinito ou não tendo um número grande de iterações

como acontece com um fractal modelado computacionalmente (COSTA, BIANCHI, 2002). A rede vascular sanguínea da retina (FAMILY *et al.*, 1989; MAINSTER, 1990; MASTERS, 2004; MENDONÇA *et al.*, 2007; JELINEK *et al.*, 2010; GOULD *et al.*, 2011; ŤÁLU; GIOVANZANA, 2012), e a vascularização extraembrionária do embrião de galinha e de codorna (vasos da membrana do saco vitelínico e membrana corioalantóide dos mesmos embriões) (KURZ *et al.*, 1994; KIRCHNER; VICO *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b; VÝBOH *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013) são alguns dos exemplos de fractais existentes na biologia. O padrão de ramificação vascular segue as propriedades de autossimilaridade estatística e dependência de escala. Os vasos de grande calibre vão se ramificando em vasos de diâmetros menores até chegarem a capilares, este comportamento permite que o processo de bifurcação seja observado em poucas diferentes escalas. O mesmo pode ser observado em muitas árvores e na ramificação brônquica pulmonar (Figura 11) (PEITGEN *et al.*, 1992; NUSSENZVEIG, 1999).

As medições registradas de um sistema fisiológico em função do tempo também podem ser um processo fractal. Por meio do registro de sinais da cinética de canais iônicos realizado pelo método do patch-clamp, podem ser observados *bursts* estatisticamente autossimilares dentro de outros *bursts* (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

Na biologia, ainda podem ser citados como exemplo de estruturas fractais: colônias de fungos e bactérias (NUSSENZVEIG, 1999; GOLINSKI *et al.*, 2008), vegetais que possuem hierarquia de repetição como *Davalia fejeensis* (samambaia pé de coelho) e *Brassica oleracea var. botrytis italica* (brócolis romanesco – Figura 12). Nas geociências, podem ser considerados: linha costeira de uma ilha ou país, rio com seus afluentes, contornos topográficos de montanhas, descontinuidade de rochas, evolução dos terrenos e objetos fragmentados como carvão. Na física e estruturas da matéria: distribuição de galáxias no universo, nuvens (projeção do perímetro), raios, formação de metais no cátodo e formação de dedos viscosos. Outros exemplos podem ser encontrados ainda na área da economia e na ecologia (FALCONER, 1990; NUSSENZVEIG, 1999; ASSIS *et al.*, 2008).

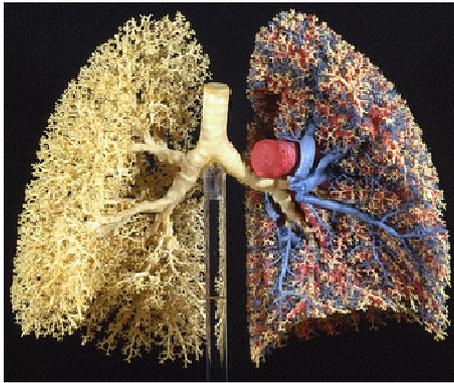


Figura 11. Ramificação brônquica pulmonar com a ramificação das artérias e veias pulmonares. Fonte: [http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/28\\_fractal/construir\\_b.html](http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/28_fractal/construir_b.html)



Figura 12. Brócolis romanesco. Fonte: [http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/28\\_fractal/construir\\_b.html](http://www.ced.ufsc.br/men5185/trabalhos/28_fractal/construir_b.html)

## 2.3 Os métodos fractais e suas aplicações fisiológicas

### 2.3.1 Métodos de obtenção da dimensão fractal

A dimensão é fundamental na determinação de um objeto no espaço, podendo ser relacionado a duas diferentes medidas: dimensão cartesiana e a dimensão topológica. A dimensão cartesiana, proposta por Descartes é caracterizada pelas coordenadas necessárias para localizar um objeto no espaço. A dimensão topológica discutida por Poincaré em 1911 estabelece que uma estrutura contínua tenha dimensão  $n$  quando pode ser dividida por outra estrutura contínua de dimensão  $(n-1)$ . Então a reta terá dimensão 1 porque poderá ser separada por um ponto (que tem dimensão zero); o plano terá dimensão 2 porque poderá ser separado por uma reta e o espaço usual terá dimensão 3 porque poderá ser separado por um plano. A dimensão topológica esta relacionada à noção de vizinhança entre os pontos de um conjunto, permitindo a definição de continuidade (NUSSENZVEIG, 1999).

A dimensão fractal pode apresentar, ao contrário da dimensão euclidiana e topológica, valores fracionários variando entre a dimensão do ponto e da reta  $0 < D < 1$ ; entre dimensão da reta e do plano  $1 < D < 2$  e entre a dimensão do plano e do espaço  $2 < D < 3$ . Por exemplo, o DLA mostrado na Figura 8, tem a dimensão fractal de aproximadamente 1,70. O valor da dimensão fractal é uma medida proporcional ao espaço realmente ocupado por uma estrutura irregular (SILVA *et al.*, 2003).

### Dimensão de autossimilaridade

A dimensão é fundamental na determinação de um objeto no espaço. Assim as propriedades de autossimilaridade e dependência de escala podem ser avaliadas de forma quantitativa por meio da dimensão fractal (descrita acima como terceira propriedade). Há vários métodos de calcular a dimensão fractal ou fracionária, sendo uma delas designada de dimensão de autossimilaridade. Esta dimensão mede quantas novas partes similares geometricamente ao objeto inteiro são observadas quando examinadas em determinada resolução. Sendo assim a dimensão de autossimilaridade  $D_{autossimilaridade}$  é definida como:

$$N = F^{D_{autossimilaridade}} \quad (7).$$

A equação 7 pode ser determinada aplicando o logaritmo neperiano

$$D_{autossimilaridade} = \frac{\ln N}{\ln F} \quad (8),$$

onde a escala de resolução pode ser entendida como um fator de redução  $F$  e  $N$  são as partes similares ao objeto original (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

A partir deste conceito a dimensão fractal dos objetos pode ser medida. Como exemplo, o conjunto de Cantor que é formado dividindo-se um segmento de reta em três partes ( $F=3$ ) e retirado o terço médio. Isto gera em cada iteração dois pedaços similares ( $N=2$ ), logo seu  $D_{autossimilaridade} = \frac{\ln 2}{\ln 3} = 0,63$  (MANDELBROT, 1983). Para a curva de Koch, divide-se a reta em três segmentos ( $F = 3$ ), retira-se o terço médio

da reta e colocam-se dois segmentos de mesma medida gerando quatro segmentos de  $1/3$  do segmento original ( $N=4$ ), portanto  $D = \frac{\ln 4}{\ln 3} = 1,2619$  (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994). Na curva de Peano, a iteração é de 9 partes ( $N=9$ ) de um terço da reta original ( $F = 3$ ), dando um  $D = \frac{\ln 9}{\ln 3} = 2$ . Como foi comentado, é um objeto fractal capaz de preencher todo plano a partir de uma reta (FEDER, 1988). O triângulo de Sierpinski é criado dividindo pela metade ( $F=2$ ) cada lado do triângulo, fazendo surgir três triângulos ( $N=3$ ) com os lados correspondendo à metade do lado do triângulo original, resultando num objeto cujo  $D = \frac{\ln 3}{\ln 2} = 1,58$  (FALCONER, 1990). Para o tapete de Sierpinski, os lados do quadrado são divididos em três partes ( $F = 3$ ) obtendo oito quadrados com um terço do comprimento dos lados do quadrado maior ( $N=8$ ),  $D = \frac{\ln 8}{\ln 3} = 1,89$  (FEDER, 1988).

### **Dimensão Hausdorff – Besicovitch**

Para se determinar a dimensão de um objeto fractal pode-se usar uma dimensão de cobertura, tal como a dimensão de capacidade, que consiste em cobrir completamente um objeto com esferas de raio  $r$  e determinar o expoente da potência que relaciona o número de esferas usadas para cobrir  $N(r)$  com  $r$ , ou seja,

$$N(r) \sim r^{-D_c} \quad (9),$$

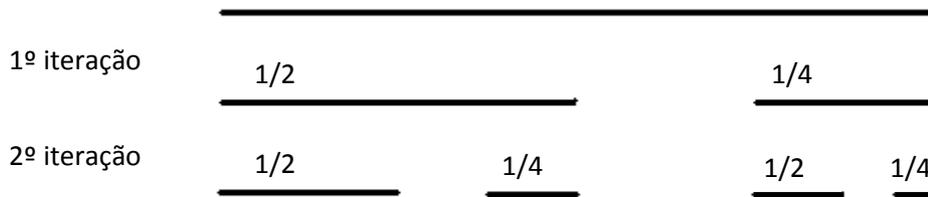
sendo  $D_c$  a dimensão de capacidade do objeto fractal (MANDELROT, 1991). A medida  $s$ -dimensional de Hausdorff  $H(s,r)$ , é uma medida semelhante a  $D_c$ , porém sua medida é realizada através do cálculo do valor mínimo da soma dos diâmetros dos subconjuntos de cobertura para um dado expoente  $s$  (MANDELROT, 1991). O diâmetro é definido como a distância entre os pontos mais distantes dentro do subconjunto de esferas que cobrem o objeto. Uma medida externa é uma função não negativa definida sobre todos os subconjuntos do conjunto, tais que a medida da união dos subconjuntos seja menor ou igual à soma das medidas desses subconjuntos. Sendo  $A_i$  a união desses subconjuntos de esferas utilizadas na

cobertura do objeto fractal, a medida externa s-dimensional de Hausdorff é definida como:

$$H(s, r) = \inf(\sum(\text{diâmetro}A_i)^s) \quad (10).$$

No limite, quando o diâmetro dos subconjuntos de esferas de coberturas  $r \rightarrow 0$  existe um valor de  $s = D_{H-B}$ , sendo  $D_{H-B}$  a dimensão Hausdorff – Besicovitch, formalmente  $\lim_{r \rightarrow 0} H(s, r)$  existe para  $s = D_{H-B}$  (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

Visando uma melhor compreensão da dimensão de Hausdorff – Besicovitch, será realizada uma aplicação ao conjunto de Cantor. O cálculo da dimensão de Hausdorff – Besicovitch o Conjunto de Cantor de razões, respectivamente, iguais a  $r_1=1/2$  e  $r_2=1/4$  é realizado como mostrado a seguir.



**Figura 13. Conjunto de Cantor até a 2ª iteração utilizando dois fatores. O segmento de reta é dividido em 4 partes iguais, no qual o terceiro quarto é retirado gerando dois diferentes segmentos: um segmento com a metade do comprimento do segmento original e outro com um quarto do segmento original.**

Na n-ésima iteração haverá  $2^n$  segmentos, onde o maior segmento terá comprimento  $l_1^n = (1/2)^n$  e o menor terá  $l_2^n = (1/4)^n$ . Facilmente é notado que existem  $\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$  segmentos com comprimento  $r_1^k \cdot r_2^{n-k}$ ,  $k=0, 1, \dots, n$ . Na n-ésima iteração a medida desse conjunto é a medida externa de Hausdorff – Besicovitch, onde os comprimentos  $l_i$  são equivalentes ao diâmetro das esferas da equação 10, e que pode ser representado pela série abaixo:

$$H_{(s,l)} = \sum_{i=1}^N l_i^s = \sum_{k=0}^n \binom{n}{k} r_1^{ks} r_2^{(n-k)s} = (r_1^s + r_2^s)^n \quad (11).$$

Se os comprimentos  $l_i$  são iguais, o  $H_{(s,l)} = \sum_{i=1}^N l_i^s = N \cdot l^{D_c}$ , onde  $D_c$  é a dimensão de capacidade,  $N$  o número de segmentos de comprimento  $l$ . Assim  $s$  passa a ser igual a  $D_c$  que é a dimensão de capacidade. Para segmentos de comprimentos distintos, pode-se calcular  $H_{(s,l)}$  no limite de infinitas iterações ( $n \rightarrow \infty$ ). Nesta condição a medida  $H_{(s,l)}$ , definida pela equação 11, permanecerá finita e diferente de zero se somente se  $r_1^s + r_2^s = 1$ . Neste limite, o valor de  $s$  que satisfaz a condição acima  $s = 0,6942$ , que é a dimensão de Hausdorff – Besicovitch para o conjunto de Cantor de razões  $\frac{1}{2}$  e  $\frac{1}{4}$ .

### **Dimensão de contagem por caixas (dimensão de capacidade)**

A dimensão de capacidade é similar, mas não idêntica à dimensão de Hausdorff – Besicovitch. As duas dimensões examinam o mínimo de uma função de todas as coberturas (esferas ou quadrados) quando os comprimentos do subconjunto de coberturas tendem a zero. A dimensão de Hausdorff – Besicovitch fornece mais informação, pois fractais com a mesma  $D_{H-B}$  pode ter diferentes valores para o  $\lim_{r \rightarrow 0} H(D_{H-B}, r)$  (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

Na dimensão de contagem por caixas  $D_{cc}$ , o objeto é coberto por uma grade formada por um número de caixas  $N(r)$ . As caixas de dimensão  $r \times r$  contadas deverão conter no mínimo um ponto do objeto fractal. O procedimento é repetido com várias grades contendo, a cada etapa, um número maior de caixas  $N(r)$  à medida que os lados de caixas  $r$  irão reduzindo seu tamanho. Posteriormente, é traçado um gráfico duplo logaritmo de  $N(r)$  em função dos lados das caixas  $r$  (COSTA *et al.*, 2013). A dimensão de contagem por caixas  $D_{cc}$  é a inclinação do gráfico duplo logaritmo de  $N(r) \times r$  com sinal invertido.

### **Dimensão de informação (entropia)**

Na dimensão de informação  $D_{inf}$  a imagem também é coberta por várias caixas de diferentes tamanhos, no entanto a contagem é realizada com base na probabilidade de ocupação das caixas pelo objeto fractal. O procedimento é repetido

com várias grades contendo, a cada etapa, um número maior de caixas  $N(r)$  à medida que os lados de caixas  $r$  vão reduzindo seu tamanho. Posteriormente, é traçado um gráfico duplo logaritmo da entropia de Kolmogorov em função dos lados das caixas  $r$ . A dimensão de informação é obtida pela inclinação do gráfico duplo logaritmo da entropia de Kolmogorov ( $S(r)$ ) versus  $r$ , com sinal invertido.

A entropia de Kolmogorov  $S(r)$  é definida como segue:

$$S(r) = \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(r)} m_i \log(m_i) \quad (12),$$

onde  $N$  é o número de caixas,  $m_i = M_i/M$ ,  $M_i$  é o número de pontos na  $i$ -ésima caixa e  $M$  é o número total de pontos do objeto fractal e  $r$  é o lado das caixas (KUNICK *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013).

### Dimensão de correlação

Esta dimensão quantifica o número de pontos que estão a uma distância menor que  $r$  de um dado ponto (NUSSENZVEIG, 1999). A dimensão de correlação depende da função de correlação  $C(r)$  (representada pela equação 13) que é uma medida do número de pares de pontos situados dentro de uma distância  $r$ . A função de correlação é definida pela seguinte expressão:

$$C(r) = \lim_{N \rightarrow \infty} (1/N^2) \sum_{i,j,i \neq j}^N H(r - |r_i - r_j|) \quad (13).$$

Sendo  $N$  o número de pontos medidos dentro de um objeto,  $H(x)$  é a função de Heaviside para qual  $x < 0$ ,  $H(x)=0$  caso contrário  $H(x)=1$  e  $|r_i - r_j|$  é a distância entre os dois pontos  $r_i$  e  $r_j$  (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

O cálculo da dimensão de correlação consiste em determinar a função de correlação para diferentes distâncias e traçar um gráfico duplo logaritmo das funções de correlações  $C(r)$  versus as distâncias  $r$ . Para estruturas fractais a função de correlação  $C(r)$  segue uma lei de potência com a distância  $r$ , sendo o expoente da potência a dimensão de correlação. Portanto, a inclinação do gráfico duplo logaritmo  $C(r)$  versus  $r$  é a medida dessa dimensão.

## Dimensão de massa-raio

A dimensão de massa-raio é obtida construindo círculos de diferentes raios centrados no centro de massa do objeto fractal. O número de pontos (proporcional à massa) dentro de cada círculo é contado. A dimensão de massa raio  $D_{mr}$  é representada por:

$$M(r) \sim r^{D_{mr}} \quad (14).$$

A massa  $M(r)$  depende do raio como descrita na equação 14, onde  $M(r)$  é o número de pontos dentro do círculo de raio  $r$  (FAMILY *et al.*, 1989; MENDONÇA *et al.*, 2007; KUNICK *et al.*, 2008).

## Dimensão de raio de giração

O método de raio de giração é uma variação do método de massa-raio que possui maior poder estatístico. É utilizado quando o número de pontos agregados ao conjunto que define objeto é registrado durante o crescimento do objeto fractal. O raio de giração

$$R_g(N) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_i^2 \quad (15),$$

onde  $r_i$  é a distância do  $i$ -ésimo ponto a partir do centro de massa do objeto fractal e  $N$  é o número total de pontos do fractal em determinado estágio do processo de crescimento (KUNICK *et al.*, 2008). Uma vez definida a equação 15, a dimensão de raio de giração  $D_{rg}$  é determinada como:

$$D_{rg} = - \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\ln R_g(N)}{\ln(N)} \quad (16).$$

## Dimensões fractais generalizadas e o espectro de singularidade

Os métodos anteriores calculam apenas um valor de dimensão para o objeto analisado. O método de dimensões generalizadas tem o propósito de calcular um espectro de dimensão para um objeto fractal. Quando os valores dessas dimensões são distintos entre si, o objeto pode ser classificado como uma estrutura multifractal. Um objeto é considerado uma estrutura multifractal quando suas diferentes regiões possuem diferentes propriedades fractais (STANLEY; MEAKIN, 1988), o mesmo vale dizer que uma estrutura multifractal pode ser considerada como uma sobreposição de estruturas monofractais homogêneas (LOPES; BETROUNI, 2009).

A estrutura multifractal é representada pela obtenção das dimensões generalizadas  $D_q$  que está relacionada aos valores de  $q$ . A variável  $q$  é um expoente que expressa diferentes propriedades fractais em diferentes escalas para um objeto, variando entre  $-\infty$  a  $+\infty$ . O gráfico formado pela relação  $D_q$  por  $q$  descreve geralmente uma curva sigmóide decrescente quando uma estrutura é um multifractal (STÖSIĆ; STÖSIĆ, 2006; GOULD *et al.*, 2011).

Para um considerado objeto monofractal, os valores da dimensão de capacidade, de informação e de correlação são iguais (as dimensões são invariáveis). Enquanto para um objeto multifractal há diferença entre as dimensões de capacidade, informação e correlação; sendo o valor da dimensão de capacidade maior do que o valor da dimensão de informação que é maior do que o valor da dimensão de correlação para um mesmo objeto multifractal. Essas dimensões são correspondentes, respectivamente, as dimensões generalizadas  $D_0$ ,  $D_1$  e  $D_2$ , logo a seguinte condição  $D_0 > D_1 > D_2$  deve ser observada em objetos e processos multifractais (STÖSIĆ; STÖSIĆ, 2006; GOULD *et al.*, 2011). A dimensão generalizada  $D_q$  é calculada da seguinte forma:

$$D_q = \tau(q)/(q - 1) \quad (17).$$

A equação 17 depende da variável  $\tau$  que é definida como:

$$\tau(q) = \lim_{r \rightarrow 0} \left[ \ln \left( \sum_i P_i(r)^q \right) \right] / \ln(r) \quad (18).$$

Onde  $P_i(r) = \frac{M_i}{M_0}$  é a densidade,  $M_i$  é o número de pontos na  $i$ -ésima caixa e  $M_0$  é o número de pontos para todo o objeto.  $\sum P_i$  é a densidade para todas caixas ( $i$ ) em determinada escala  $r$ .

A multifractalidade também pode ser analisada por meio do espectro de singularidade, que é obtido através do parâmetro  $f(\alpha)$  relacionado à  $\alpha$  como segue:

$$N(\alpha) = r^{-f(\alpha)} \quad (19).$$

Sendo  $N(\alpha)$  o número de caixas tal que a probabilidade  $P_i$  de encontrar pixels do objeto fractal dentro de uma determinada região  $i$  relaciona-se com  $\alpha_i$  pela seguinte lei de potência

$$P_i = r^{\alpha_i} \quad (20)$$

e  $f(\alpha)$  pode ser entendido como a dimensão fractal da união das regiões com comprimento de singularidade entre  $\alpha$  e  $\alpha + d\alpha$ , onde  $\alpha$  toma valores que podem variar de  $-\infty$  a  $+\infty$  (STÖSIĆ; STÖSIĆ, 2006).

Esta função  $f(\alpha(q))$  pode ser obtida por meio da transformação de Legendre de  $\tau$  em função de  $q$ . Esta transformação fornece como resultado uma nova função  $f(\alpha(q))$ , na qual as derivadas de  $\tau$  em relação ao  $q$  são as novas variáveis independentes desta função  $f(\alpha(q))$ . Formalmente:

$$f(\alpha(q)) = q\alpha(q) - \tau(q) \quad (21),$$

sendo

$$\alpha(q) = d\tau(q)/dq \quad (22).$$

Para um objeto multifractal o gráfico  $f(\alpha(q))$  em função  $\alpha(q)$  é descrito por uma parábola de concavidade para baixo.

Numericamente  $\alpha$  e  $f(\alpha)$  podem ser calculados pelas expressões (23) e (24) (GOULD *et al.*, 2011):

$$\alpha = \sum_i [\mu_i \cdot \ln P_i] / \ln r \quad (23)$$

e

$$f(\alpha) = \sum_i [\mu_i \cdot \ln \mu_i] / \ln r \quad (24).$$

Sendo

$$\mu_i(q, r) = P_i^q(r) / \sum_i P_i^q(r) \quad (25),$$

onde  $P_i^q(r)$  é a probabilidade de pontos na  $i$ -ésima caixa para o expoente  $q$ .

### Lacunaridade

O parâmetro de lacunaridade não é um método de obtenção da dimensão fractal, mas um procedimento multiescalar capaz de descrever padrões de dispersão espacial servindo de análise complementar da dimensão fractal (TALU *et al.*, 2012). Enquanto que as dimensões fractais são capazes de descrever o quanto do espaço é preenchido por um objeto fractal, o parâmetro de lacunaridade é hábil em descrever como este espaço está sendo preenchido pelo objeto fractal (MANDELBROT, 1983), através da distribuição e organização dos pontos na imagem (espaço) a ser analisada. Este parâmetro torna possível distinguir diferentes objetos fractais que possuem os mesmos valores de dimensão fractal (MANDELBROT, 1983; GOULD *et al.*, 2011). Este parâmetro é obtido pela distribuição de lacunas ou buracos na imagem onde se encontra o objeto fractal, sendo capaz de medir a textura da imagem ou homogeneidade (MANDELBROT, 1983). A quantificação é realizada da mesma forma do método de contagem por caixas. Entretanto, neste caso, também são utilizados diferentes orientações  $g$  das

grades de caixas. Segundo Talu *et al.* (2012) o valor médio da lacunaridade é calculado como segue:

$$\Lambda = \left[ \sum_g \sum_i (1 + (\sigma|\mu)^2) \right] / n \quad (26),$$

onde  $\sigma$  é o desvio padrão e  $\mu$  é a media de pontos por caixa de tamanho  $r$ , na contagem de caixa em uma orientação  $g$  e  $n$  é o número de tamanhos de caixa. A soma é realizada sobre todos os valores de  $r$  e  $g$ .

Outra maneira de calcular a lacunaridade é através do algoritmo de caixa deslizante (ZAIA *et al.*, 2006). Um caixa  $r \times r$  é localizada no lado superior esquerdo da imagem deslizando gradativamente, à medida que quantifica os pontos contidos na imagem, da esquerda à direita e de cima para baixo. As linhas e colunas da imagem são percorridas com caixas de diferentes tamanhos  $r$ . Para cada caixa de tamanho  $r$  são medidos  $Q_1$  e  $Q_2$ . A soma das probabilidades dos pontos ocuparem cada caixa é

$$Q_1 = \sum_i p(i, r) \quad (27),$$

onde  $p(i, r)$  é a probabilidade dos pontos ocuparem a  $i$ -ésima caixa. A soma do quadrado das probabilidades dos pontos ocuparem cada caixa é

$$Q_2 = \sum_i p(i, r)^2 \quad (28).$$

Segundo Gould *et al.* (2011), a lacunaridade  $\Lambda(r)$  em um tamanho de caixa  $r$  é definida pela relação entre as equações 27 e 28:

$$\Lambda(r) = \frac{N(r) \times Q_2}{Q_1} \quad (29).$$

O  $N(r)$  é o número de caixas de tamanho  $r$ . Um gráfico  $\Lambda(r)$  por  $r$  é construído e a função da lacunaridade é ajustada com uma função hiperbólica (ZAIA *et al.*, 2006; GOULD *et al.*, 2011):

$$\Lambda(r) = \frac{\beta}{r^\alpha} + \gamma \quad (30).$$

A variável  $\beta$  é referida como parâmetro de lacunaridade, pois está relacionada à concavidade da hipérbole.

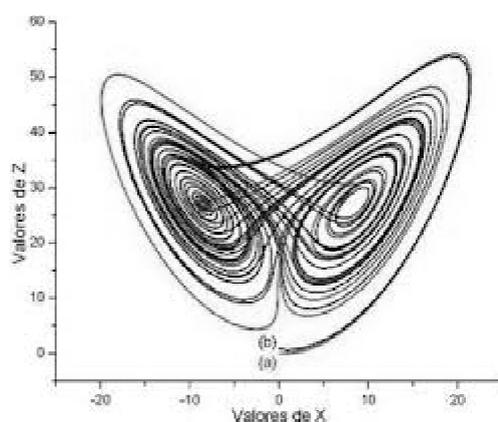
### 2.3.2 Fractais e sistemas complexos

A dimensão fractal é capaz não somente de avaliar um objeto espacial, mas um processo que se encontra em evolução no tempo. Assim as séries temporais podem oferecer dados para construção do espaço de fase, assim o conjunto de pontos (conjunto de espaço de fase) pode ser caracterizado pela sua dimensão fractal ou pelo espectro de dimensões fractais. Este conjunto de pontos pode também gerar um atrator como representado pela Figura 14, este atrator em particular é conhecido como atrator estranho de Lorenz e sua dimensão fractal está em torno de 2,06 (LIEBOVITCH, 1998; NUSSENZVEIG, 1999).

Dados de séries temporais de processos fisiológicos quando construídos em um conjunto de espaço de fase são capazes de revelar informações importantes. Quando a dimensão fractal é usada para avaliar um conjunto de espaço de fase; se a dimensão for alta, as séries temporais podem ter sido geradas por um grande número de variáveis aleatórias independentes; se a dimensão for baixa, as séries temporais podem ter sido produzidas por processos determinísticos tendo um número pequeno de variáveis independentes (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

Através do espaço de fase, a série temporal é identificada como um processo caótico (também chamado de determinístico) ou um processo aleatório (LIEBOVITCH, 1998). A dimensão fractal do conjunto de espaço da fase pode ser determinada a partir dos métodos de dimensão de capacidade, informação, correlação, massa – raio e pelos expoentes de Lyapounov (GRASSBERGER; PROCACCIA, 1983; BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994). No entanto, a estimação da dimensão fractal é diferente quando a análise é feita sobre a própria série temporal, cuja autossimilaridade está presente. A dimensão fractal numa série

temporal descreve como as menores variações medidas nos curtos intervalos de tempos estão relacionadas às maiores variações mensuradas nos maiores intervalos de tempos (autossimilaridade). Enquanto no conjunto de espaço de fase, os valores de dimensão fractal informa o número de variáveis independentes necessários para gerar a série temporal a partir do qual o espaço de fase foi construído (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).



**Figura 14. Exemplo de atrator estranho, atrator de Lorenz definido no plano Z e X. Fonte: [http://www.geocities.ws/projeto\\_caos\\_ufg/minicurso/aula4.html](http://www.geocities.ws/projeto_caos_ufg/minicurso/aula4.html)**

Existe uma relação conectando estruturas ou processos em diferentes escalas espaciais ou temporais, esta relação é a autossimilaridade dos fractais e ela pode estar presente numa série temporal. Foi comentado que os sinais registrados a partir de um sistema fisiológico em função do tempo (série temporal) podem ser um processo fractal, um exemplo é o registro de sinais da cinética de canais iônicos por meio do patch-clamp. Além dos métodos de dimensão, existem outras formas de análise que determinam se os sinais são ou não fractais, como: análise do espectro de potência, função de autocorrelação, análise de dispersão, análise de Hurst (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994) e a análise da flutuação destendenciada (Detrended Fluctuation Analysis –DFA) (PENG *et al.*, 1994) e outros.

Após estabelecer nos parágrafos acima conceitos sobre alguns métodos fractais que serão usados na descrição das redes vasculares retinianas e do saco

vitelínico, será realizada a seguir uma curta revisão sobre a composição estrutural dos vasos sanguíneos, seus diversos tipos e sua gênese.

## **2.4. Rede vascular sanguínea**

### **2.4.1 Composição estrutural e classificação dos vasos sanguíneos**

O sistema circulatório abrange o sistema vascular sanguíneo e linfático. O sistema vascular sanguíneo é composto por artérias, veias e capilares. Estes vasos estão organizados em camadas, embora dependendo do seu calibre e de sua função não venham a possuir todas as camadas, mas geralmente são compostos de: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia (BANKS, 1991).

A túnica íntima é constituída por células endoteliais que formam um tubo revestindo a luz dos vasos e por uma camada de tecido conjuntivo subendotelial que pode conter células musculares lisas, ela é separada da túnica média por uma lâmina elástica interna. Enquanto que a túnica média é composta principalmente por células musculares lisas dispostas concentricamente e entre estas células existem uma quantidade de matriz extracelular (MEC) constituídas de moléculas sintetizadas pelas próprias células musculares lisas: fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares (colágeno do tipo III), proteoglicanos e glicoproteínas. Já a túnica adventícia, que é separada da túnica média por uma delgada lamina elástica externa, é constituída por colágeno do tipo I e fibras elásticas; esta túnica se torna gradualmente continua com o tecido conjuntivo do órgão pelo qual o vaso esteja passando (GARTNER; HIATT, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Em vasos de grande calibre, com mais frequência em veias, há *vasa vasorum* (arteríolas, vênulas e capilares). Estes pequenos vasos cruzam a parede dos grandes vasos e se ramificam profusamente para irrigar a camada média e adventícia que são bastante espessas para serem nutridas por difusão do sangue que se encontra na luz do vaso (GARTNER; HIATT, 2010).

Os capilares são os vasos sanguíneos de menores calibres e de parede delgada, cuja finalidade é a realização de trocas de certas moléculas com os tecidos. Eles formam uma rede que se anastomosam e cujas paredes servem de intercâmbio entre o sangue e os tecidos. São constituídos apenas de uma única camada de células endoteliais formando um tubo. A parede do capilar possui de 1 a 3 células e seu diâmetro varia entre 7 a 9  $\mu\text{m}$ , acomodando uma hemácia por vez. As células endoteliais se conectam entre si por meio de zônulas de oclusão e se encontram sobre uma lâmina basal cujos componentes são sintetizados pelas próprias células endoteliais. Esta lâmina basal impede a troca de grandes moléculas proteicas. O núcleo das células endoteliais está localizado na periferia da luz do capilar e o citoplasma possui poucas organelas, contendo poucas cisternas de retículo endoplasmático rugoso, polirribossomos livres, um pequeno aparelho de Golgi e mitocôndrias. Em muitas regiões dos capilares e vênulas pós-capilares, células designadas de pericitos envolvem porções das células endoteliais. Os pericitos são células de origem mesenquimal que contribuem no processo de reparação tecidual, sendo capazes de se diferenciar para formar novos vasos sanguíneos e novas células do tecido conjuntivo (DELLMANN; VENABLE, 1982; BANKS, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

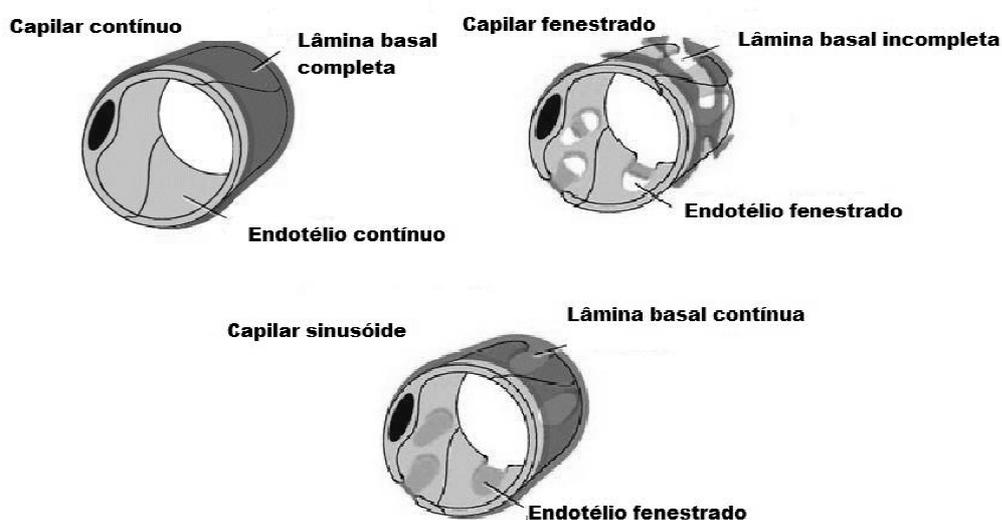
A densidade vascular da rede capilar esta relacionada às taxas metabólicas teciduais, um tecido com alta atividade metabólica possui uma densa rede capilar como, por exemplo, o tecido cardíaco. Menos abundante para os tecidos que possuem uma menor atividade como o músculo liso. Os vasos capilares se anastomosam, formando uma extensa rede de interconexão das arteríolas com vênulas pós-capilares. As arteríolas (menores artérias) se ramificam em pequenos vasos envolvidos por uma camada descontínua de músculo liso (metarteríolas) que acabam por formar os capilares. A regulação da circulação capilar é promovida através da contração do músculo liso da metarteríola e pelo esvaziamento direto das arteríolas em vênulas encontradas em alguns tecidos (anastomoses arteriovenosas). O controle da circulação capilar tem também a participação da excitação neural e hormonal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Os capilares podem ser contínuos, fenestrados ou sinusóides (HIB, 2003; GARTNER; HIATT, 2010). Os capilares contínuos não possuem poros em sua parede, sendo encontrados em músculos, pulmões e no sistema nervoso (BANKS,

1991). As células endoteliais apresentam vesículas de pinocitose, além de poderem estar associadas aos pericitos (DELLMANN; VENABLE, 1982; KIERSZENBAUM, 2008; SANTOS *et al.*, 2008).

Os capilares fenestrados são mais permeáveis à água e aos pequenos solutos hidrofílicos. São caracterizados pela presença de poros ao longo da parede endotelial, que podem estar cobertos por um delgado diafragma. Este capilar possui uma lâmina basal contínua e pode ser encontrado nos rins, intestino e glândulas endócrinas (BANKS, 1991; KIERSZENBAUM, 2008; SANTOS *et al.*, 2008).

Os capilares sinusóides são maiores do que os outros tipos de capilares e são encontrados no fígado, medula óssea e no baço. As células endoteliais contêm espaços citoplasmáticos e junto com a lâmina basal formam um revestimento descontínuo. Estes vasos podem apresentar macrófagos associados (BANKS, 1991; KIERSZENBAUM, 2008; EYNARD; MUÑOZ, 2011). A ilustração a seguir mostra os três tipos de capilares.



**Figura 15.** Tipos de capilares: Capilar contínuo, capilar fenestrado e capilar sinusóide. A ilustração mostra a constituição endotelial e da lâmina basal. Fonte: <http://estudiosistemasbiologicos.blogspot.com.br/2010/09/vasos-sanguineos.html>.

As artérias são os vasos eferentes, conduzindo o sangue do coração aos capilares. Ramificam-se reduzindo de diâmetro ao passo que se afastam do coração. A túnica íntima está separada da túnica média por uma lâmina elástica interna cuja composição principal é de elastina. A túnica média está separada da túnica adventícia por uma lâmina elástica externa mais fina (HIB, 2003; KIERSZENBAUM, 2008). De acordo com a espessura e as características das camadas estruturais há: arteríolas, pequenas, médias e grandes artérias (HIB, 2003; KIERSZENBAUM, 2008).

As arteríolas e pequenas artérias têm um diâmetro que varia de 20 a 130  $\mu\text{m}$ . As arteríolas possuem um diâmetro menor em relação às pequenas artérias, com um lúmen estreito e a camada subendotelial bastante delgada. As arteríolas menores são desprovidas de lâmina elástica interna e normalmente a camada média é constituída de duas camadas de células musculares lisas circularmente dispostas, além de não apresentarem lamina elástica externa. Enquanto que as pequenas artérias possuem uma luz mais ampla e uma túnica média mais desenvolvida comparada as arteríolas, além de uma túnica adventícia bastante delgada (KIERSZENBAUM, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Artérias médias ou artérias musculares possuem uma túnica íntima com camada subendotelial mais extensa e uma lâmina elástica interna proeminente. A túnica média é formada essencialmente por células musculares lisas chegando a conter 40 camadas de células, além de serem normalmente intercaladas por lamelas elásticas, fibras reticulares e proteoglicanos, sendo todos sintetizados pelas próprias células musculares lisas. Apenas nas artérias médias maiores são observadas a lâmina elástica externa. A túnica adventícia, consistindo de tecido conjuntivo frouxo, é provida de capilares linfáticos, *vasa vasorum* e nervos; podendo estas estruturas alcançar a região mais externa da túnica média. Devido ao acúmulo de células musculares na túnica média, as artérias médias são conhecidas como artérias musculares. Através do mecanismo de contração/relaxamento pode controlar o fluxo sanguíneo para vários órgãos (HENRIKSON *et al.*, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

As grandes artérias ou artérias elásticas possuem todos os elementos da túnica íntima, além de ser mais espessa em relação à artéria média e rica em fibras elásticas. A túnica média é constituída de uma série de lâminas elásticas perfuradas

que estão organizadas de forma concêntrica. Entre as lâminas elásticas situam-se células musculares lisas, fibras de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas. A túnica adventícia é menos desenvolvida em relação à túnica média. As lâminas elásticas participam na uniformização do fluxo sanguíneo, durante a sístole elas reduzem a variação de pressão por se encontrarem distendidas e durante a diástole elas apoiam em manter a pressão arterial. A aorta e seus ramos são exemplos de grandes artérias (BANKS, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

As veias trazem sangue dos capilares ao coração, apresentando estruturalmente uma parede mais fina que contém uma proporção maior de tecido conectivo, à medida que o conteúdo de fibras elásticas e musculares é menor do que das artérias (EYNARD, MUÑOZ, 2011). Os diâmetros das veias geralmente são maiores do que as artérias correspondentes, no entanto suas paredes são mais finas não suportando elevadas pressões sanguíneas (GARTNER; HIATT, 2010). Partindo dos capilares e ampliando o diâmetro destes vasos há: vênulas, pequena, média e grandes veias. As vênulas são semelhantes, porém maiores do que os capilares, possuindo um diâmetro em torno de 20 µm. Possui uma túnica adventícia adjacente a membrana basal das células endoteliais, possuindo fibras colágenas, fibroblasto e pericitos (DELLMANN; VENABLE, 1982).

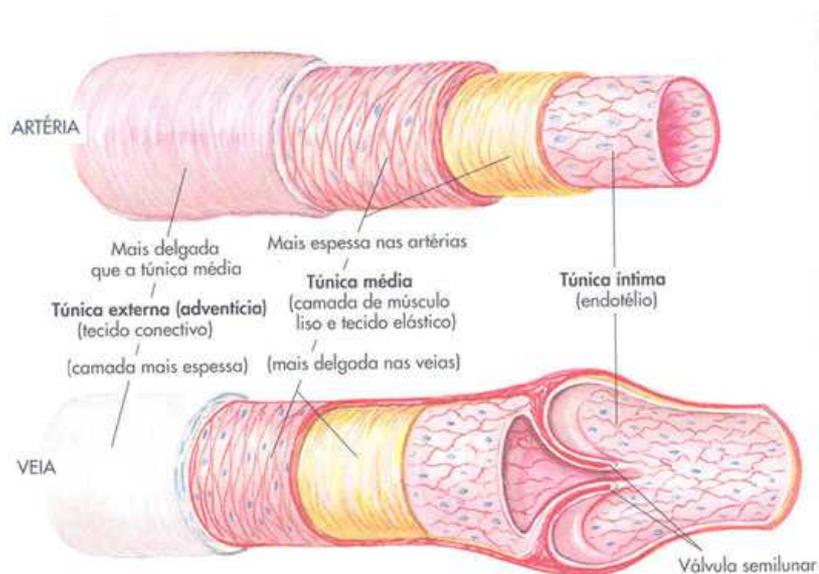
As pequenas veias já possuem células musculares lisas formando uma túnica média completa à medida que aumentam de diâmetro (DELLMANN; VENABLE, 1982; EYNARD; MUÑOZ, 2011).

As veias médias possuem um endotélio com escasso tecido conectivo, uma fina túnica média com a camada adventícia espessa. Estas veias já possuem válvulas que são projeções semilunares de tecido conectivo envolvido por endotélio cuja função é prevenir o refluxo sanguíneo (EYNARD; MUÑOZ, 2011).

As grandes veias possuem a túnica média pouco desenvolvida com poucas células musculares lisas e fibras elásticas, em contrapartida, apresentam uma desenvolvida camada adventícia (EYNARD; MUÑOZ, 2011).

Os vasos possuem inervação o que permite que o mecanismo de vasoconstrição e vasodilatação possam ser realizados. A vasoconstrição é promovida pela ação da norepinefrina liberada pelas fibras não mielínicas da inervação simpática (nervos vasomotores). Nas artérias, as terminações nervosas não alcançam a túnica média e neurotransmissor atua abrindo espaço entre as

junções intercelulares das células musculares lisas da camada média, assim a resposta se propaga até alcançar as células musculares mais internas desta túnica. Nas veias, as terminações nervosas encontram a túnica adventícia e média, entretanto a densidade de terminações nervosas é menor do que nas artérias. Nos músculos esqueléticos, as artérias estão supridas de terminações nervosas do tipo colinérgicas que irão atuar sobre a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais. O óxido nítrico irá agir nas células musculares lisas ativando o sistema GMP cíclico (guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato), resultando no relaxamento dessas células e ampliação da luz dos vasos. As terminações nervosas aferentes das artérias incluem os barorreceptores (seio carotídeo e arco da aorta) e quimiorreceptores da carótida e corpos aórticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). A Figura 16 mostra a organização das túnicas para artérias e veias.



**Figura 16. Representação geral das túnicas para artérias e veias.**  
Fonte: <http://www.auladeanatomia.com/cardiovascular/vasos.htm>

## 2.5 Formação da rede vascular sanguínea

### 2.5.1 Vasculogênese

Durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, o sistema cardiovascular é um dos primeiros sistemas orgânico funcionais a se estabelecer (DIAS *et al.*, 2002; CZIROK; LITTLE, 2012).

Os constituintes básicos do sistema vascular sanguíneo são as células endoteliais e as sanguíneas que são diferenciadas durante o desenvolvimento do ser a partir, respectivamente, das células angioblásticas e hematopoiéticas. Essas células têm um precursor em comum que é o hemangioblasto, procedente das células epiblasticas que se invaginam para formar o mesoderma durante a gastrulação. Os hemangioblastos migram em direção ao espaço entre o epiblasto e o hipoblasto, chegando ao mesoderma lateral do saco vitelínico (SV), onde irão se agrupar formando as estruturas conhecidas como ilhotas sanguíneas (ver Figura 17 A). Nas ilhotas sanguíneas, as células localizadas mais periféricamente formarão as células endoteliais, enquanto que as células concentradas internamente irão formar as células hematopoiéticas (FLAMME *et al.*, 1997; KENNEDY *et al.*, 2007; WENG; SHENG, 2014; LI *et al.*, 2014).

A união entre as células endoteliais das diferentes ilhotas sanguíneas vizinhas promove o surgimento do plexo capilar primário (Figura 17 A) que irá formar a rede vascular (FERGUSON *et al.*, 2005). Esta união das ilhotas sanguíneas é promovida pela migração na MEC dos angioblastos e células endoteliais recentemente formadas conduzidas pela atuação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LAMALICE *et al.*, 2007). Entretanto, não apenas os fatores de crescimento, mas também a composição da MEC é importante na determinação do processo de proliferação, migração e diferenciação dos angioblastos para estabelecimento da rede vascular (BALDWIN, 1996; CZIROK; LITTLE, 2012).

À medida que a vasculatura do SV está se formando, precursores angioblásticos migratórios se agregam em cadeias endoteliais ao longo das estruturas axiais do próprio embrião, formando a aorta dorsal, veias cardinais, os troncos das artérias e veias do SV e tubos endocárdicos (FLAMME *et al.*, 1997). No entanto, as células endoteliais não surgem apenas no SV, existem fontes

intraembrionárias (especificamente, o mesoderma) as quais originarão as células endoteliais no embrião mais do que pelas vias de colonização a partir do SV (FERGUSON *et al.*, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2007).

As células hematopoiéticas brotam nos estágios posteriores dos somitos e servem como progenitores das linhagens hematopoiéticas definitivas que irão colonizar os tecidos hematopoiéticos (fígado, baço e medula óssea). As células hematopoiéticas do SV apenas contribuem para uma população transitória de células sanguíneas. Quando a rede vascular for perfundida pela atuação do coração, as células sanguíneas provenientes das ilhotas que estão na circulação serão gradativamente substituídas pelas células sanguíneas definitivas (FLAMME *et al.*, 1997).

A vasculogênese pode ser compreendida como o processo de formação dos primeiros vasos sanguíneos, quando células precursoras mesodermis conhecidas como hemangioblastos, originadas a partir da parede do SV, se diferenciam em ilhotas sanguíneas que irão formar os plexos vasculares primitivos (BUSCHMANN; SCHAPPER, 1999; CZIROK; LITTLE, 2012; LIU *et al.*, 2014). No entanto, a definição de vasculogênese pode ser ampliada, pois não ocorre apenas na fase embrionária. O indivíduo pós-natal possui as células progenitoras endoteliais (CPE) que podem ser derivadas da medula óssea (a partir de célula tronco hematopoiética) ou das células troncos de tecidos não hematopoiéticos, assim originando uma neovascularização. As CPE exercem um papel crítico na manutenção da homeostase dos tecidos, sendo importante na reparação endotelial (URBICH; DIMMELER, 2004; ASAHARA *et al.*, 2011).

A vasculogênese pode ocorrer durante a isquemia cardíaca, cicatrização, crescimento tumoral e neovascularização corneana; devido à migração, proliferação, diferenciação e ou incorporação *in situ* das CPE na vasculatura de regeneração (LIU *et al.*, 2012). As CPE são conduzidas pelos locais isquêmicos, onde se dividem e formam um sincício que moldará em um tubo originando uma rede vascular (ASAHARA *et al.*, 2011; WONG; CRAWFORD, 2013). Além das CPE, também os pericitos estão envolvidos na morfogênese vascular. Essas células são similares ao estroma de suporte residindo na interface entre as células endoteliais e o tecido próximo. Os pericitos produzem sinais proangiogênicos que regulam a diferenciação e o crescimento das células endoteliais. A migração, ramificação e brotamento das

CPE em matriz de colágeno *in vitro* têm sido influenciados pela sinalização de citocinas elaboradas pelos fibroblastos. O recrutamento e a diferenciação das CPE também têm sido regulados pelas citocinas sintetizadas pelas plaquetas. (WONG; CRAWFORD, 2013).

### **2.5.2 Angiogênese**

Diferente da vasculogênese, a angiogênese está relacionada ao brotamento de novos vasos a partir dos vasos sanguíneos preexistentes (Figura 17 B). Posteriormente esta remodelagem é caracterizada pela ampliação do diâmetro luminal dos vasos recém-formados em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo, assim adquirindo a identidade de artérias, veias e capilares (FOLKMAN, 2007, EMMETT *et al.*, 2011; KUBOTA, 2012). A formação dos novos vasos envolve etapas como: degradação proteolítica da MEC, migração por quimiotaxia, adesão, proliferação e diferenciação das células endoteliais; finalmente, a formação e maturação de uma nova estrutura tubular para o fluxo sanguíneo (RISAU, 1997; DING *et al.*, 2006; KATOH, 2013). Além das células endoteliais, as células murais (células musculares e pericitos) participam do processo de formação dos vasos. Esta interação é favorecida e guiada pela ação dos fatores de crescimento e seus respectivos receptores, além de outras moléculas (AMBLER *et al.*, 2003; FUJIMOTO *et al.*, 2004). Durante a formação dos vasos, as células endoteliais recrutam as células tronco mesenquimais e ajudam no seu processo de diferenciação em células murais (MILLS *et al.*, 2013).

Os fatores mecânicos, químicos e moleculares podem ser considerados principais mecanismos de indução da angiogênese. Os processos hemodinâmicos no organismo estão relacionados aos fatores mecânicos, como por exemplo, o aumento do fluxo sanguíneo decorrente do exercício pode estimular o processo de surgimento de novos vasos, assim como a tensão de cisalhamento (pressão sanguínea mecânica que os vasos devem resistir). Com respeito à influência química, podem ser citados os mecanismos de hipóxia e gradiente de tensão de oxigênio. A hipóxia excita os macrófagos a liberarem fatores incluindo o PDGF (fator

de crescimento derivado de plaquetas) e FGF-1 e FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 1 e 2); a hipóxia também está envolvida na autorregulação do VEGF. Com relação à influência molecular, as citocinas liberadas pelas células inflamatórias (macrófagos, monócitos e plaquetas) são capazes de estimular as expressões do FGF e do VEGF. No caso do mieloma múltiplo, as células inflamatórias podem secretar VEGF, FGF-2 e HGF (fator de crescimento de hepatócito) por indução de VEGF e FGF-2 liberados pelas células plasmáticas (TABIBIAZAR; ROCKSON, 2001; BERARDI *et al.*, 2013; MARUOTTI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013).

Um dos mecanismos de estimulação do VEGF seria em situação de hipóxia, em resposta o HIF-1 (fator induzido por hipóxia – 1) aciona centenas de genes das células submetidas à baixa concentração de oxigênio, sendo um desses genes o que expressa proteína VEGF (QUTUB; POPEL, 2009; KROCK *et al.*, 2011; MADANECK *et al.*, 2013).

As células endoteliais estão sujeitas à hipóxia no desenvolvimento embrionário, na isquemia cardíaca e no crescimento tumoral. O aumento da atividade metabólica na rápida expansão tissular ou a redução do fluxo sanguíneo no tecido isquêmico, leva ao acúmulo dos produtos do gene induzido por hipóxia (notavelmente, o VEGF-A) e conseqüentemente haverá o aumento da proliferação de células endoteliais. Uma vez ocorrendo a angiogênese haverá maior aporte sanguíneo e assim o aumento da tensão de oxigênio local que leva a ativação de PHDs (domínios de prolil-hidroxilase) que irá suprimir a atividade das células endoteliais (TAKEDA; FONG, 2007).

A angiogênese é um processo intrínseco a embriogênese, porém não ocorre exclusivamente no desenvolvimento embrionário, é observado no indivíduo pós-natal, tanto em algumas condições fisiológicas como nas enfermidades. A neovascularização ocorre durante o desenvolvimento do indivíduo, crescimento do cabelo, no ciclo menstrual feminino, inflamação e cicatrização. Relacionado às enfermidades, a neovascularização é resultado da quebra do balanço entre os mediadores endógenos estimulatórios e inibitórios da angiogênese. Ela passa ocorrer nas condições inflamatórias sistêmicas (endometriose, psoríase e artrite reumatoide), doenças oculares (retinopatia diabética proliferativa, retinopatia de prematuridade, degeneração macular relacionado à idade), aterosclerose, isquemia miocárdica, crescimento e sobrevivência tumoral como a metástase (DIAS *et al.*,

2002; SCHWARTZ *et al.*, 2008; MELO-REIS *et al.*, 2010; CHUNG; FERRARA, 2011). A Figura 17 mostra um esquema das duas etapas de formação vascular.

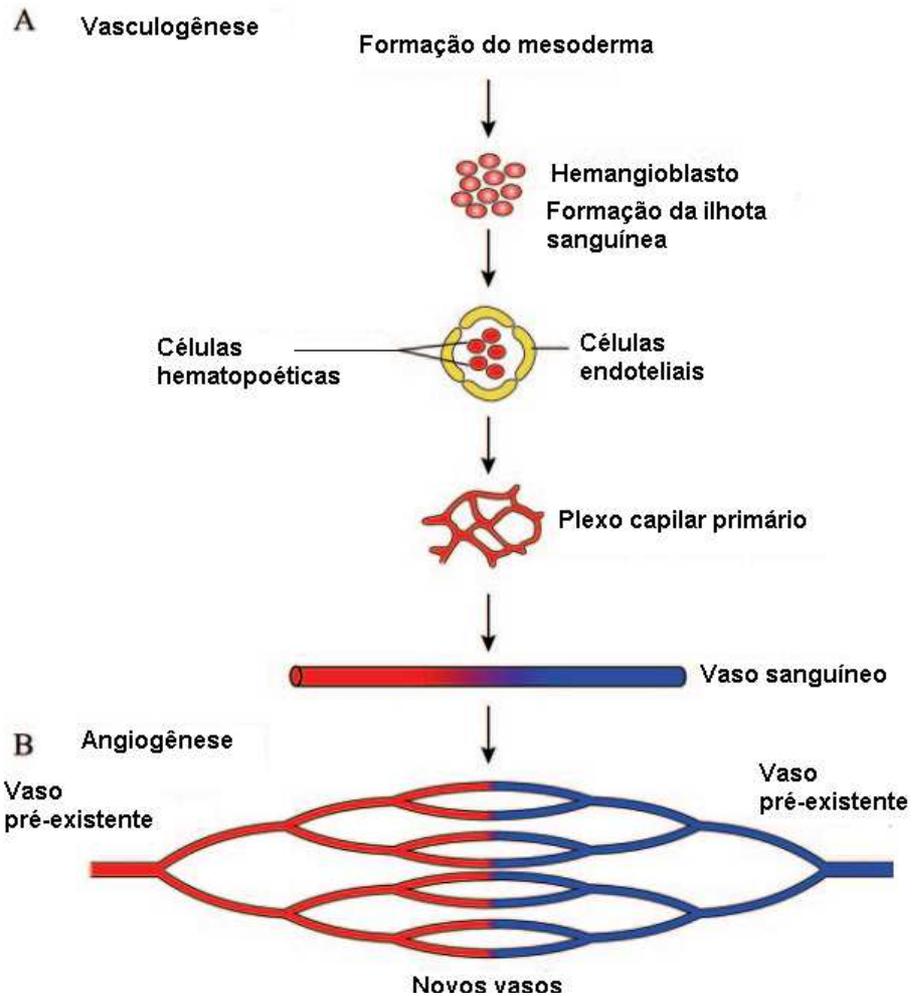


Figura 17 - Imagem sumarizada da vasculogênese (A) e angiogênese (B).  
Fonte: Lamalice *et al.*, 2007.

### 2.5.3 Matriz extracelular e moléculas de adesão na rede vascular sanguínea

A interação célula com célula e célula com a matriz extracelular (MEC) são fundamentais durante a formação dos vasos. Os vasos recém-formados são estabilizados pela síntese de uma nova membrana basal e de células murais (pericitos e células musculares lisas), esta etapa envolve tanto alterações na adesão endotelial quanto de pericitos (SILVA *et al.*, 2008). A adesão de células endoteliais à MEC é mediada por integrinas, que são glicoproteínas heterodiméricas da membrana plasmática compostas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  que promovem a ligação e migração pela MEC (AVRAAMIDES *et al.*, 2008; FAYAZI *et al.*, 2014). A ligação da integrina induz a vários eventos de sinalização intracelular, como a fosforilação tirosina das proteínas quinases de adesão focal e outras proteínas associadas ao contato focal, elevação do pH e dos níveis de cálcio intracelular, síntese de lipídios inositol, síntese de ciclina e expressão de genes. As integrinas múltiplas são expressas sobre as células endoteliais mediando a adesão para uma variedade de proteínas da MEC incluindo fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno tipo I e IV, fibrinogênio. A angiogênese envolve interações múltiplas entre a MEC e as células vasculares. A remodelagem da MEC ao redor dos vasos facilita várias etapas durante a angiogênese, incluindo a degradação da MEC e a deposição dos componentes da MEC (ELICEIRI; CHERESH, 1998).

Algumas moléculas de adesão participam no processo de formação dos vasos. As selectinas são moléculas que participam do processo de adesão durante o processo inflamatório (SCHON, 2005). Esta família é composta de L-selectina, E-selectina e P-selectina, sendo as duas últimas expressas na superfície do endotélio quando estimulada por citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , interleucina-1 e 10) (NASTRI *et al.*, 2008). A e-selectina é uma moléculas que promove a adesão de leucócitos no endotélio vascular durante uma situação inflamatória. Sua forma clivada (e-selectina solúvel) induz a angiogênese em córnea de rato e estimula a quimiotaxia e formação de microvasos de células endoteliais da derme humana (OH *et al.*, 2007). Ainda ela exerce uma função importante no recrutamento de CPE para facilitar a neovascularização de tecidos isquêmicos *in vitro* e *in vivo* (NISHIWAKI *et al.*, 2007). A glicoproteína p-selectina é responsável pela amarração e rolamento de leucócitos ao longo do endotélio, uma etapa imprescindível para o extravasamento dos

leucócitos, além de poder está envolvida na modulação da angiogênese induzida por isquemia (EGAMI *et al.*, 2006).

Molécula de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão de célula vascular do tipo 1 (VCAM-1) são induzidas nas células endoteliais na presença de interferon- $\gamma$  (Inf-  $\gamma$ ), interleucina-1(IL-1), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) ou de alguns lipopolissacarídeos (ELICEIRI; CHERESH, 1998). A VCAM-1 pode estimular a angiogênese uma vez interagindo com a integrina  $\alpha_4\beta_1$ , porém não promove a proliferação de células endoteliais (ELICEIRI; CHERESH, 1998). A ICAM-1 é uma proteína produzida pela célula endotelial, que é importante na indução e retenção de células pró-inflamatória, além de mediar a interação de várias células com a MEC (TEXEIRA *et al.*, 2007).

#### **2.5.4 Fatores de crescimento na rede vascular sanguínea**

Algumas proteínas e peptídeos participam do processo de formação dos vasos sanguíneos. Os chamados fatores de crescimento são bem conhecidos em promover tanto a vasculogênese quanto a angiogênese. São alguns estimuladores da formação dos vasos: fator de crescimento fibroblástico ácido e básico (aFGF e bFGF); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento placentário (PLGF); fator de crescimento de transformação  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1); TNF- $\alpha$ ; fator de crescimento de hepatócito (HGF); fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF) (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987; YANCOPOULOS *et al.*, 1998; TABIBIAZAR; ROCKSON, 2001).

O FGF (fator de crescimento de fibroblasto) estimula tanto a proliferação de células endoteliais *in vitro* como previne a apoptose delas; promove a migração dessas células e o aumento das proteínas que participam na dissolução da MEC. O FGF também regula a adesão das células endoteliais modulando a expressão de receptores de integrinas além de poder aumentar a expressão do VEGF e outros peptídeos angiogênicos (SAHNI *et al.*, 1999).

A família VEGF é composta por: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E além do PLGF (CARMELIET *et al.*, 2001; HEESCHEN *et al.*, 2004). O

VEGF é liberado por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e células do epitélio pigmentado da retina (DAMICO, 2007). A família VEGF assim como os seus receptores são importantes para o surgimento dos primeiros vasos e a formação de novos vasos sanguíneos. Por exemplo, a indução de receptor do tipo 2 para VEGF (VEGFR-2) pode iniciar a diferenciação angioblástica enquanto que os níveis de VEGF parecem ser importantes para manter esta diferenciação e sobrevivência dos angioblastos (RISAU, 1997). O VEGF-A está envolvido na regulação do processo de ativação, proliferação, migração das células endoteliais e formação tubular. O receptor tirosina-quinase VEGFR-2 é o maior receptor responsável pelos efeitos bioquímicos do VEGF-A sobre as células e é indispensável no desenvolvimento vascular normal (CHRZANOWSKA-WODNICKA *et al.*, 2008).

O PLGF também é sintetizado por algumas células tumorais, como exemplo, coriocarcinoma humano (CAO *et al.*, 1996). Além disso, o PLGF-2 é importante na promoção da angiogênese e crescimento tumoral, uma vez que induz a expressão de genes antiapoptóticos nas células endoteliais de tumores (ADINI *et al.*, 2002).

TGF- $\alpha$  é um polipeptídeo de 50 aminoácidos que possui efeito sobre a proliferação e migração de células de origem epidermal (CHENG *et al.*, 2008), mas também estimula a proliferação de células endoteliais de microvasos (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987). Já o TGF- $\beta$  é uma proteína que regula a angiogênese atuando em genes alvos de outros fatores angiogênicos, como o VEGF, pelas proteínas Smads via TGF- $\beta$ . Também este fator angiogênico promove a maturação e deposição da membrana basal além do aumento da interação entre as células endoteliais e as células murais (MA *et al.*, 2007).

PDGF normalmente está relacionado à manutenção dos vasos sanguíneos (SUN *et al.*, 2005). O fator de crescimento derivado de plaquetas C, quando sinalizado pelo seu receptor (PDGFR) se torna importante para o desenvolvimento de tecidos conectivos e para cicatrização (CRAWFORD *et al.*, 2009).

IGF-I é um fator angiogênico que está envolvido na modulação da formação de vasos no trato nervoso no indivíduo adulto e está correlacionado com a neovascularização da retina devido à diabete (HELLSTRÖM *et al.*, 2002; LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2004). O IGF-I protege as células endoteliais contra apoptose induzida pelo alto nível de glicose (RABINOVSKY; DRAGHIA-AKLI, 2004).

A TNF- $\alpha$  ativa as respostas inflamatórias e assim tanto influencia a angiogênese como pode afetar a proliferação de células endoteliais e induzir a apoptose dessas células (KISHORE *et al.*, 2005). O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas envolvidas na angiogênese associada ao macrófago, entretanto quando sobre-expressão nas células endoteliais acaba por ser inibitório e citotóxico para células endoteliais; ao contrário do TNF- $\alpha$  exógeno que promove a neovascularização em vários modelos *in vivo* (LEE *et al.*, 2006).

HGF é um mitógeno para hepatócitos. Ele se liga ao seu receptor tirosina quinase MET e tem implicação na angiogênese. Estudos têm mostrado que o HGF/SF é um fator angiogênico em retinopatia diabética proliferativa, em artrite reumatoide e óssea; como também pode atuar sinergicamente com VEGF na indução e amplificação da angiogênese (SENGUPTA *et al.*, 2003). O HGF também é importante para a migração de células endoteliais na neovascularização do tecido adiposo (BELL *et al.*, 2008).

G-CSF é um fator de crescimento utilizado na mobilização de células-troncos e progenitoras em doenças malignas e não malignas. O efeito angiogênico do G-CSF é mediado pelo aumento da mobilização de neutrófilos e células endoteliais jovens e maduras, e ainda pela ativação das rotas de sinalização VEGF/VEGFR-1 (OHKI *et al.*, 2005). No modelo isquêmico de membro pélvico de camundongos foi provado que a sinalização de G-CSF e IL-6 induzem a capacidade angiogênica de monócitos residentes em medula óssea (GREGORY *et al.*, 2010).

## **2.6 Ação do campo magnético na rede vascular sanguínea**

Os estimuladores e inibidores da formação dos vasos não são os únicos agentes capazes de controlar a vasculogênese quanto à angiogênese. Além dessas moléculas, agentes físicos como o campo magnético podem exercer uma influência sobre a formação dos vasos sanguíneos (RUGGIERO *et al.*, 2004; MCKAY *et al.*, 2010; DELLE MONACHE *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2013).

Os campos magnéticos (CM) podem tanto acarretar em danos para os organismos como promover efeitos benéficos. Os CM têm sido propostos para

acelerar o processo de cicatrização, para redução da dor, como terapia contra úlceras, alguns tumores e outras doenças (MCKAY *et al.*, 2010; MAHNA *et al.*, 2012; MARCINKOWSKA-GAPINSKA; NAWROCKA-BOGUSZ, 2013). O CM é uma propriedade básica de muitas partículas elementares, da mesma forma que a massa e a carga elétrica. Portanto ele é produzido por partículas elementares como os elétrons, também podendo ser gerado por partículas carregadas eletricamente em movimento, como na corrente elétrica (HALLIDAY *et al.*, 2011). A corrente elétrica, se variável no tempo, gera também um campo elétrico numa direção perpendicular ao CM (ERDOGAN, 2007). Formalmente, o CM pode ser expresso como segue:  $B = F_B/q v$  (31), sendo  $B$  o CM,  $F_B$  a força magnética,  $q$  a carga da partícula e  $v$  a velocidade da partícula (HALLIDAY *et al.*, 2011). Têm sido reportados em vários trabalhos diferentes efeitos no comportamento da rede de vasos sanguíneos, em decorrência da ação do CM. Entre os efeitos podem-se citar alterações no calibre dos vasos; influência sobre a perfusão sanguínea; modulação do fluxo e pressão sanguínea, influência na vasculogênese e angiogênese (MCKAY *et al.*, 2010; DELLE MONACHE *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2013). Estudos têm mostrado que pulsos de CEM induziram vasodilatação arteriolar no músculo cremaster de ratos (GAN; GLAZER, 2006), bem como promoveram angiogênese e vasodilatação na região gluteofemoral de coelhos (ISHIDA *et al.*, 2008). CM com intensidade de 0,2 T bem como CEM (campo eletromagnético) com 0,04 T inibem a angiogênese em membrana corioalantóide (MCA) de embrião de galinha (RUGGIERO *et al.*, 2004; BALANEZHAD *et al.*, 2010).

Henderson *et al.* (2006) não observaram alterações na ação do CM de 50 Hz nas células endoteliais de veias umbilicais humanas (CEVUH) *in vitro* e nem no modelo de reestenose em camundongos *in vivo*, concluindo que a radiação não ionizante não é capaz de acarretar uma resposta transcricional, sendo assim inábil em modificar a expressão gênica, não oferecendo riscos para as células endoteliais. No entanto, Li *et al.* (2007) estudaram a atuação de CM estáticos com intensidades de 0.1 mT, 1 mT e 10 mT sobre proliferação, apoptose e expressão de VCAM-1 e CAM-1 de CEVUH. O CM de 10 mT induziu a apoptose e necrose das células endoteliais e promoveu o aumento da expressão de VCAM-1 e ICAM-1, o que não foi observado para os CM de 0,1 e 1 mT. Concluindo que o CM vai interagir com as células endoteliais de acordo com a intensidade (10 mT), promovendo efeito tóxico,

apoptótico, necrótico, além de ampliar a expressão de VCAM-1 e ICAM-1, que desencadeiam inflamação relacionada ao endotélio. Por outro lado, estudos conduzidos por Martino *et al.* (2010) que observaram um aumento da proliferação CEVUH e da expressão de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) quando exposto ao CM de 60 ou 120  $\mu$ T.

Tanto a intensidade como o tempo de exposição são um dos fatores que estão envolvidos nos diferentes efeitos do CEM nos vasos (BALANEZHAD *et al.*, 2010). Esses efeitos no processo de formação dos vasos sanguíneos podem ser estimulatórios (proangiogênicos) sobre alguns modelos biológicos de estudos da angiogênese ou inibitórios (antiangiogênicos) sobre outros. Firmando, assim, uma discrepância nas verdadeiras ações do CM sobre o sistema vascular (RUGGIERO *et al.*, 2004).

Por ser um modelo animal de fácil visualização e manipulação da rede vascular sanguínea, a membrana corioalantóide (MCA) de embrião de galinha tem sido usada por alguns autores para estudar efeitos de CM na angiogênese (RUGGIERO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009; BALANEZHAD *et al.*, 2010; BALANEZHAD *et al.*, 2011). Como a vasculogênese ocorre no SV, a membrana do saco vitelínico (MSV) é um modelo mais adequado para os estudos dos efeitos dos campos magnéticos no processo da vasculogênese.

## **2.7 Membrana do saco vitelínico do embrião de aves: um modelo para o estudo da vasculogênese e da angiogênese**

A MSV é um tecido extraembrionário envolvido na função imunológica, hematopoiética, secretora, nutricional e metabólica durante o desenvolvimento do embrião. Nos mamíferos, ela é logo substituída pela placenta. Nas aves, devido à ausência do suporte circulatório materno, os nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião são estocados no albúmen e na gema, cabendo à MSV efetuar principalmente o apoio nutricional. Os lipídios chegam ao embrião de galinha via circulação após serem reabsorvidos pela MSV, também tem sido considerado

que a ingestão de lipídios da gema é realizada por meio de fagocitose não específica. As proteínas também chegam ao embrião através da MSV, sendo a proteína da gema capturada por pinocitose pelas células endodérmicas da MSV (GERHARTZ *et al.*, 1999). A MSV também promove a proteólise extraembrionária fornecendo aminoácidos livres ao embrião (GERHARTZ *et al.*, 1997).

A MSV é constituída das três camadas germinativas nos estágios iniciais, contendo células mesodérmicas e endodérmicas após a expansão do celoma extraembrionário (SHENG, 2010; BAUER *et al.*, 2013). Ela é formada a partir da área opaca, e durante os primeiros dias de incubação ela amplia significativamente envolvendo toda a gema no final do terceiro dia (BELLAIRS, 1963; GERHARTZ *et al.*, 1997).

No estágio de linha primitiva, a área opaca consiste de um epitélio achatado de células ectodérmicas e de uma camada subjacente de endoderma, estando a gema branca logo abaixo. Na área opaca são determinadas três zonas concêntricas: margem de cobertura (formado por uma banda estreita de células ectodérmicas na periferia), zona sincicial da parede germinativa (o endoderma é suposto ser um sincício) e zona interior da parede germinativa (o endoderma é suposto ser celular). A colonização da área opaca pelo mesoderma marca a transformação deste tecido na MSV, que pode ser caracterizado pelas seguintes zonas: margem de cobertura (que ainda continua localizado na região periférica e com células ectodérmicas), área vitelínica interna, área vitelínica externa e área vascularizada (contendo o mesoderma) (BELLAIRS, 1963; SHENG, 2010).

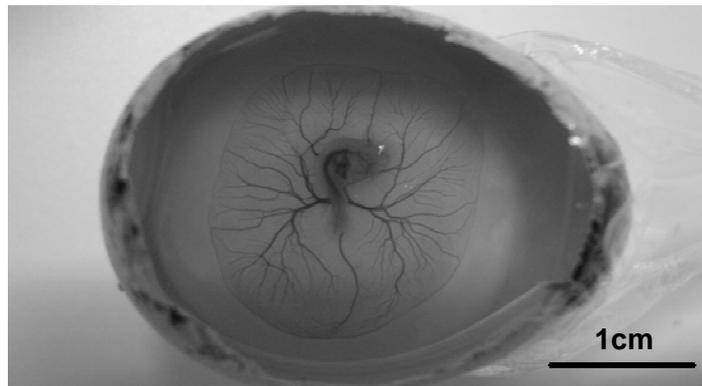
A área vascularizada é onde ocorre o processo de vasculogênese. Gradualmente o mesoderma invade a área vitelínica que se torna a área vascularizada. Antes da área vascularizada se tornar vascularizada, o mesoderma está presente como uma dupla camada. Onde as células somáticas estão abaixo do ectoderma e as células esplânicas acima do endoderma. Com a vascularização o mesoderma altera a forma se tornando tipicamente mesenquimal. A área vascularizada é medialmente contínua com as regiões vasculares na região pelúcida (BELLAIRS, 1963; SHENG, 2010).

A vasculogênese leva a formação do plexo capilar primitivo na MSV e a formação da aorta no embrião. Antes da iniciação do fluxo sanguíneo, as células endoteliais que expressam os genes específicos para originar as veias e artérias, estão localizadas no polo anterior (venoso) e no polo posterior (arterial) na MSV.

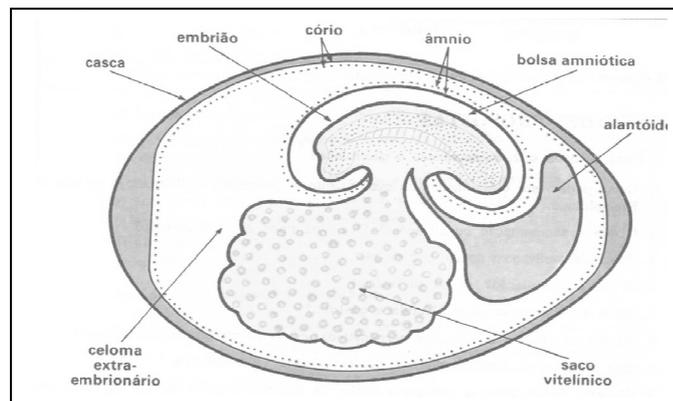
Assumindo uma configuração transitória bidimensional cis-cis, que por volta de 24 horas é remodelada em uma estrutura tridimensional com artéria e veias pareadas ou entrelaçadas (LE NOBLE *et al.*, 2004).

Por volta do estágio de formação dos 15 somitos no embrião de galinha, o batimento cardíaco se inicia direcionando o fluxo sanguíneo através da aorta dorsal e seguindo para dentro da MSV através do plexo arterial. Uma vez estabelecida a perfusão, haverá a remodelagem do plexo arterial em um largo vaso que será a artéria vitelínica. Partindo do seio venoso ao coração, no polo cranial surge a veia vitelínica anterior e no polo caudal do embrião origina a veia vitelínica posterior (origina-se de um território que foi previamente arterial). Estas são as primeiras maiores veias que surgem e nunca pareiam com as artérias. As primeiras veias embrionárias que pareiam com as artérias são as veias vitelínicas laterais. Estas são provenientes dos ramos desconectados da artéria vitelínica, durante seu processo de formação. Esses segmentos formam estruturas como manchas preenchidas de sangue que conseguem realizar brotamento perpendicularmente e dorsalmente as artérias. Os brotamentos se reconectam ao sistema venoso e o sangue contido é absorvido na recém-formada veia (LE NOBLE *et al.*, 2004).

Assim como a MCA, a MSV de galinha tem sido usada como modelo para o estudo de moléculas que influenciam na vasculogênese (DIAS *et al.*, 2008a; DIAS *et al.*, 2008b; STRASSMANN *et al.*, 2008; MENEGHELLI *et al.*, 2013); enquanto que MSV de codorna tem sido utilizada tanto no estudo da atuação de lipídios no crescimento vascular (SILVA *et al.*, 2012) como nos estudo dos efeitos de CM sobre a vasculogênese e angiogênese (COSTA *et al.*, 2013). As figuras abaixo mostram o SV do embrião de galinha com 5 dias de incubação (Figura 18) e sua localização (Figura 19).



**Figura 18. Membrana do saco vitelínico com sua área vascular, embrião de codorna (*Coturnix japonica*) com 72 hora de incubação. Fonte: Costa et al. 2013.**



**Figura 19. Localização do saco vitelínico com outras estruturas extraembrionárias e o embrião. Fonte: <http://www.clickescolar.com.br/wp-content/uploads/2010/09/ambrionarios.jpg>**

## **2.8 Rede vascular retiniana e a retinopatia diabética não proliferativa**

Além da membrana do saco vitelínico de embrião de aves, a retina é um outro órgão que se destaca na abordagem de sua rede vascular sanguínea. A retina (Figura 20) é uma membrana que reveste a superfície interna da região posterior do globo ocular (após o humor vítreo), onde ocorrerá o processo de formação da imagem. Ela é composta por 10 camadas (Figura 21) que abrigam diferentes células

que exercem distintas funções (Figura 22). As camadas são: epitélio pigmentar, camada dos fotorreceptores, membrana limitante externa, camada nuclear externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna, camada de células ganglionares, camada de fibras ópticas e membrana limitante interna (YOUNG; YOUNG, 1998; GARCIA, 2002).

A retina é derivada do neuroectoderma, sendo uma extensão bastante complexa do cérebro, realizando o processamento da imagem antes da informação ser transmitida para o córtex cerebral. A Figura 22 apresenta os principais tipos celulares que compõem a retina: células fotorreceptoras (cones e bastonetes), células bipolares, células horizontais, células amácrinas e células ganglionares (KENDEL *et al.*, 1997; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008; BALDO, 2008).

Para que a retina exerça regularmente suas funções, é necessário que as artérias proporcionem a nutrição da retina. As camadas internas são irrigadas pela artéria central da retina que logo se divide para suprir a superfície interna retiniana. Os vasos da coroide (camada bem vascularizada que se situa entre a retina e a esclera) também contribuem para o processo de nutrição e oxigenação, suprindo as camadas externas da retina. As arteríolas e vênulas retinianas têm acesso à membrana por meio da região central do disco óptico (GUYTON; HALL, 2006; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

Através do oftalmoscópio e do retinógrafo, os vasos retinianos podem ser observados e avaliados (Figura 23). A partir dos vasos retinianos podem ser identificadas várias anormalidades da própria retina bem como relacionadas ao sistema vascular de outras regiões (MASTERS, 2004; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008). Dentre algumas retinopatias, a retinopatia diabética tem sido bastante investigada devido ao elevado número de pessoas afetadas pela diabetes *mellitus*. Pois a maioria das pessoas que possuem diabetes do tipo I e II está no risco de desenvolver complicações retinianas, aumentando a probabilidade com o passar dos anos (CRAWFORD *et al.*, 2009; TARR *et al.*, 2013).

A retinopatia diabética pode ser classificada em dois estágios: a retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) e a proliferativa (RDP). A RDNP (Figura 21) ocorre nos estágios iniciais. Ela é estabelecida pela presença de microaneurismas, pequenas hemorragias e áreas de necrose das fibras nervosas. Anormalidades microvasculares, dilatações e alças venosas se desenvolvem por causa do aumento

das áreas de hipóxia. De acordo com o número e tipo de lesões a RDNP pode ser classificada como leve, moderada e severa. Normalmente os pacientes não apresentam nenhum problema visual, porém o prognóstico não é bom devido ao progresso da doença além de poder ou não estar envolvido com o edema macular diabético (MOHAMED *et al.*, 2007; FALCÃO *et al.*, 2010; TARR *et al.*, 2013).

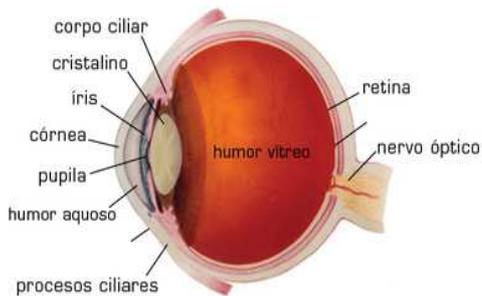
Enquanto que a RDP é o estágio quando a doença progride, marcado pela proliferação de novos vasos sanguíneos retinianos a partir dos vasos preexistentes (angiogênese). O surgimento dos novos vasos a partir dos capilares retinianos pode ocorrer tanto na interface entre áreas perfundidas e não perfundidas da retina como também no disco óptico. Esses novos vasos são extremamente frágeis, imaturos, permeáveis, ocorrendo fácil sangramento. Eles não causam comprometimento visual, mas originam várias complicações tais como hemorragia vítrea e descolamento de retina (MOHAMED *et al.*, 2007; CRAWFORD *et al.*, 2009; FALCÃO *et al.*, 2010).

Há dois fatores importantes na etiologia da doença: a hiperglicemia crônica e a hipóxia. No estado de hiperglicemia, a enzima aldose redutase converte a glicose em sorbitol que acumulado dentro da célula acarreta danos osmóticos e disfunção endotelial. Também aumenta o estresse oxidativo que reduz o nível de óxido nítrico, promove a leucoestase e pode causar distúrbios na barreira hemato retiniana interna. Outro fator considerado é a apoptose dos pericitos ativada pela hiperglicemia, sem os pericitos e sem os contatos intercelulares vasculares haverá a proliferação de células endoteliais, facilitando o desenvolvimento de microaneurisma. Eventualmente, a perda dos pericitos conduzirá a apoptose das células endoteliais dos capilares (FALCÃO *et al.*, 2010).

Outras manifestações da retinopatia diabética é o aumento da espessura da membrana basal dos capilares que provavelmente contribui, assim como a perda de pericitos, para o fechamento dos capilares que levará a formação de áreas isquêmicas (FALCÃO *et al.*, 2010).

As alterações microvasculares encontradas na retinopatia diabética resultam em hipóxia. A hipóxia irá regular o HIF1- $\alpha$  que por sua vez estimula a produção de VEGF promovendo a angiogênese patológica (RAY *et al.*, 2004; MADANECK *et al.*, 2013). O VEGF está relacionado com colapso que ocorre na barreira hemato retiniana (TARR *et al.*, 2013). O rompimento desta barreira causa o aumento na

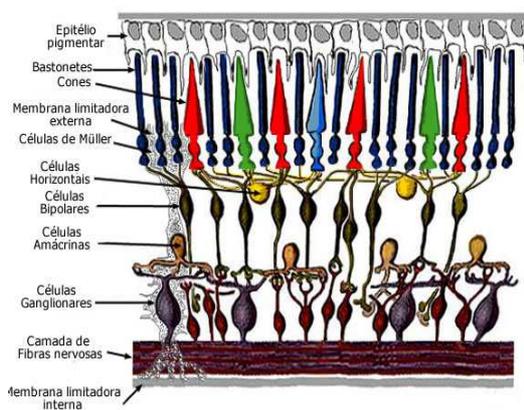
permeabilidade vascular e extravazamento do plasma sanguíneo, que após ser reabsorvido do espaço extracelular restará um depósito de lipoproteína que pode ser observado na camada retiniana externa através do oftalmoscópio como exsudatos duros (FALCÃO *et al.*, 2010). A figura seguinte mostra uma retinografia representando uma retina com RDNP.



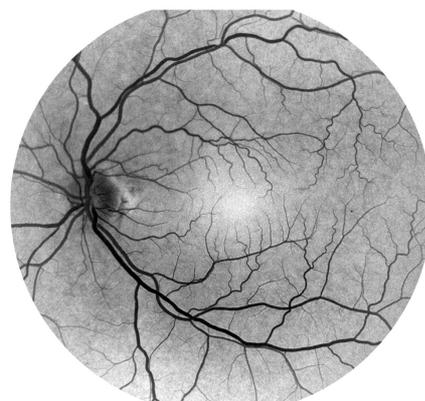
**Figura 20.** Esquema anatômico do globo ocular mostrando as estruturas e a camada retiniana. Fonte: <http://miguellume.com/patooculoteslogias-cirurgias/>



**Figura 21.** Ilustração histológica da retina de rato representando as camadas retinianas. Cedido por Fabrício Bezerra de Sá, professor da UFRPE.



**Figura 22.** Camadas da retina. No decorrer das camadas se encontram os principais tipos celulares da retina. Fonte: <http://www.infoescola.com/visao/retina/>.



**Figura 23.** Imagem de fundo de olho mostrando a rede vascular retiniana com RDNP. Fonte: Parsons-Wingerter *et al.*, 2010.

## 2.9 Aplicações dos métodos de dimensão fractal na avaliação da complexidade da rede vascular sanguínea

O sistema vascular sanguíneo é formado por uma rede complexa de estruturas tubulares ramificadas e com diferentes tamanhos que estão não uniformemente distribuídas pelos vários tecidos. A rede de vasos é tratada como um objeto fractal devido a sua autossimilaridade no processo de bifurcação; irregularidade de sua forma; dimensão fracionária uma vez que sua dimensão é maior do que uma reta, mas não chega a preencher um plano; e dependência de uma escala de medida segundo ampliação do grau de observação (GRIZZI *et al.*, 2005).

Assim os métodos de obtenção da dimensão fractal podem ser empregados na averiguação do comportamento da distribuição da rede vascular. A rede de vasos retinianos, é uma estrutura geometricamente bem caracterizada pelos métodos fractais. Através do método de massa raio e dimensão de correlação Family *et al.* (1989) estimaram um valor aproximadamente igual a 1,7 para dimensão fractal do microsistema circulatório da retina humana. Mainster (1990) tem encontrado dimensões fractais para o sistema vascular arterial ( $1,63 \pm 0,05$ ) e venoso ( $1,71 \pm 0,07$ ) da retina humana, como também, tem associado o padrão vascular a um DLA ( $1,68 \pm 0,05$ ). Kunick *et al.* (2008) têm encontrado a dimensão fractal do padrão vascular retiniano de cães ( $1,75 \pm 0,12$ ) por meio do método de raios de giração.

Vários estudos têm utilizado a geometria fractal com a finalidade de servir como ferramenta de diagnóstico para afecções oculares ou enfermidades não específicas que refletem na vascularização retiniana. Avakian *et al.* (2002) têm utilizado o método de contagem por caixas para identificação da retinopatia diabética não proliferativa, o grupo encontrou uma dimensão fractal mais alta para a região macular das retinas em condições normais, em contraste com as dimensões fractais da retina inteira e região paramacular que não foram estatisticamente diferentes entre o grupo normal e com retinopatia diabética não proliferativa. Enquanto Kunicki *et al.* (2009) relataram que as dimensões fractais da retina e de suas regiões obtidas pelo método de contagem por caixas e informação, não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e com retinopatia diabética não proliferativa.

Cheung *et al.* (2008) têm relatado que os altos valores de dimensão fractal estão associados aos sinais da retinopatia prematura em indivíduos jovens com diabetes tipo I. Cavallari *et al.* (2011) têm reportado uma dimensão fractal baixa, analisando retinografias de pacientes com arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL).

As pesquisas passaram a utilizar o parâmetro de lacunaridade com o propósito de auxiliar os métodos de dimensão fractal (GOULD *et al.*, 2011). Landini *et al.* (1995) têm usado a dimensão fractal e a lacunaridade na diferenciação de pacientes com oclusão da artéria ou veia retiniana central, enquanto Ţălu *et al.* (2012) têm sugerido os dois parâmetros para diagnosticar pacientes com ambliopia.

Além do parâmetro de lacunaridade, devido à vascularização da retina ter sido proposta como um objeto multifractal, os métodos de dimensão generalizada e o espectro de singularidade têm sido aplicados na caracterização da rede vascular retiniana (STÖSIĆ; STÖSIĆ, 2006; GOULD *et al.*, 2011), desta forma, também poderia assumir como um possível instrumento de diagnóstico (STÖSIĆ; STÖSIĆ, 2006; DOUBAL *et al.*, 2010).

A parametrização da rede vascular retiniana pela dimensão fractal possibilita a discriminação de alterações do padrão vascular, no entanto MASTERS (2004) comenta que a análise fractal pode ser uma técnica ineficiente com a finalidade de diagnosticar e detectar os estágios prematuros das enfermidades retinianas. Ele ainda informa que existem alterações vasculares em muitas enfermidades retinianas e essas alterações são facilmente observadas pelo retinógrafo; além disso, a maioria das anormalidades microvasculares acontece nos estágios prematuros da doença e ao nível de capilares (não visíveis na imagem do fundo de olho), não sendo assim identificadas pela análise fractal. No entanto, os métodos de obtenção da dimensão fractal não deixam de ser um descritor morfométrico, um descritor estatístico de padrão espaço-preenchimento e densidade, capaz de avaliar a complexidade da rede vascular (MASTERS, 2004; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a).

Podendo ou não assumir um posto de possível e iminente ferramenta de diagnóstico para doenças retinianas, a geometria fractal é um índice de desenvolvimento da rede vascular, podendo ser usufruído em vários objetivos (MASTERS, 2004). Desta forma, Liew *et al.*(2008) têm mostrado que existe uma

correlação inversa entre a dimensão fractal e a pressão sanguínea dos vasos retinianos. A geometria fractal também tem sido usada como critério para escolha de algoritmos empregados no processo de segmentação dos vasos retinianos, que é procedimento de extração da estrutura da imagem a ser analisada (no caso, filtrar a imagem da retina obtendo apenas sua rede vascular), pois a segmentação é uma etapa necessária para quantificação morfométrica (MENDONÇA *et al.*, 2007).

A dimensão fractal pode ser encontrada na avaliação da rede vascular de outros órgãos, tal como os vasos pulmonares no qual a dimensão fractal 3D foi usada, porém não foi sensível para evidenciar uma hipertensão pulmonar (HELMBERGER *et al.*, 2014). Esta dimensão tem sido usada na abordagem do comportamento da rede vascular de órgãos de outras espécies: rede de capilares sinusoidais hepática de rato (GAUDIO *et al.*, 2005), rede vascular da pele de rato (GOULD; REECE, 2012), rede vascular da pele (VICO; CARTILIER, 1993; VICO *et al.*, 1994; GOULD *et al.*, 2011), do córtex, do rim e do músculo vasto medial de camundongo (GOULD *et al.*, 2011), da vascularização sanguínea da membrana corioalantóide (MCA) de embrião de galinha e codorna (VICO *et al.*, 1998; MANCARDI *et al.*, 2008).

A dimensão fractal pode ser um parâmetro hábil em mensurar o comportamento da vascularização da MCA de embrião de galinha sob a ação de substância estimuladora do crescimento vascular (KURZ *et al.*, 1994); bem como o efeito de moléculas estimuladoras e inibidoras do desenvolvimento da rede vascular inseridas em MCA de embrião de codorna (PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b; MCKAY *et al.*, 2008; VÝBOH *et al.*, 2010). A dimensão fractal também tem sido empregada para medir a rede vascular da MSV de embrião de codorna submetida à ação de moléculas (SILVA *et al.*, 2012), bem como à atuação de CM (COSTA *et al.*, 2013). Baish e Jain (1998, 2000) considerarão a dimensão fractal um recurso com boa perspectiva na avaliação da vasculatura tumoral. Kirchner *et al.* (1996) têm aplicado a ferramenta na quantificação vascular de enxertos tumorais (adenocarcinoma de cólon, carcinoma de mama, de pulmão e de ovário) em MCA de embrião de galinha. Baber *et al.* (2003) e Tozer *et al.* (2005) também usaram a dimensão fractal para analisar o desenvolvimento da vasculatura de tumores implantados dentro de retalho de pele dorsal de rato e camundongo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar possíveis alterações no comportamento da rede vascular sanguínea em duas diferentes estruturas biológicas *in vivo*, a retina humana com retinopatia diabética não proliferativa e a membrana do saco vitelínico de embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) submetida a um campo magnético, utilizando a geometria fractal como descritor matemático capaz de avaliar o processo de desenvolvimento vascular.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Utilizar os métodos fractais (dimensão de contagem por caixas, dimensão de informação, parâmetro de lacunaridade e análise multifractal) e número de pontos de bifurcação para caracterizar a rede vascular sanguínea retiniana com retinopatia diabética não proliferativa.
2. Utilizar os métodos fractais (parâmetro de lacunaridade e análise multifractal) para investigar quantitativamente se o campo magnético de 60 Hz com intensidade de 1 mT promove alterações no processo de vascularização sanguínea da membrana do saco vitelínico de embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*).

#### 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADINI, A.; KORNAGA, T.; FIROOZBAKHT, F.; BENJAMIN, L.E. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and Macrophages<sup>1</sup>. **Cancer Research** v.62, p.2749–2752, may. 2002.

AMBLER, C.A.; SCHMUNK, G.M.; BAUTCH, V.L. Stem cell-derived endothelial cells/progenitors migrate and pattern in the embryo using the VEGF signaling pathway. **Developmental Biology**. v.257 p.205–219, 2003.

ANTONETTI, D.A.; BARBER, A.J.; BRONSON, S.K.; FREEMAN, W.M.; GARDNER, T.W.; JEFFERSON, L.S.; KESTER, M.; KIMBALL, S.R.; KRADY, J.K.; LANOUE, K.F.; NORBURY, C.C.; QUINN, P.G.; SANDIRASEGARANE, L.; SIMPSON, I.A. Diabetic retinopathy seeing beyond glucose-induced microvascular disease. **Diabetes**. v.55, p.2401-241, 2006.

ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A.; MASUDA, H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. **Stem Cells**. v.29, p.1650-1655, 2011.

ASSIS, T.A.; MIRANDA, J.G.V.; MOTA, F.B.; ANDRADE, R.F.S.; CASTILHO, C.M.C.. Geometria fractal: propriedades e características de fractais ideais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. v. 30, n. 2, p. 2304, 2008.

AVAKIAN, A.; KALINA, R.E.; SAGE, E.H.; RAMBHIA, A.H.; ELLIOTT, K.E.; CHUANG, E.L.; CLARK, J.I.; HWANG, J.; PARSONS-WINGERTER, P. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. **Current Eye Research**. v.24, n.4, p.274-280, may. 2002.

AVRAAMIDES, C.J.; GARMY-SUSINI, B.; VARNER, J.A. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews**. v. 8, p.604-617, aug. 2008.

BAISH, J.W.; JAIN, R.K. Cancer, angiogenesis and fractals **Nature Medicine**. v.4, n.9, p.984, sep. 1998.

BAISH, J.W.; JAIN, R.K. Fractal and cancer. **Cancer Research**. v.60, p.3683-3688, jul. 2000.

BALANEZHAD, S.Z.; PARIVAR, K.; BAHARARA, J.; KOUCHESFEHANI, H.M.; ASHRAF, A. The effect of extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis. **Research Journal of Environmental Sciences**. v.4, n.3, p.300-304, 2010.

BALANEZHAD, S.Z.; PARIVAR, K.; BAHARARA, J.; KOUCHESFAHANI, M.H.; ASHRAF, A. The synergistic effects of sodium valproate and extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis. **Scientific Research and Essays**. v.6, n.1, p. 1-5, jan. 2011.

BALDO, M.V.C. Visão. In: AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap 20, p.288-311.

BALDWIN, HS. Early embryonic vascular development. **Cardiovascular Research**. v.31, p. E34-E4.5, 1996.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2<sup>o</sup> ed. São Paulo: Manole, 1991. 629p.

BARBER, P.R.; AMEER-BEG, S.M.; VOJNOVIC, B.; HODGKISS, R.J.; TOZER, G.M.; WILSON, J.; PRISE, V.E. 3D Imaging and quantification of complex vascular networks. **Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics, SPIE**. v. 5139, p.67-78, 2003.

BASSINGTHWAIGHTE, J.B.; LIEBOVITCH, L.S.; WEST, B.J. **Fractal physiology**. New York: Oxford University Press, 1994. 364 p.

BAUER, R.; PLIESCHNIG, J.A.; FINKES, T.; RIEGLER, B.; HERMANN, M.; SHNEIDER, W.J. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v.288, n.2, p.1088-1098, jan. 2013.

BELL, L. N.; CAI, L.; JOHNSTONE, B. H.; TRAKTUEV, D. O.; MARCH, K.; CONSIDINE, R. V. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. **American Journal Physiology-Endocrinology Metabolism**. v. 294, p.336–344, 2008.

BELLAIRS, R. Differentiation of the yolk sac of the chick studied by electron microscopy. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**. v.11 parte 1, p.201-225, mar. 1963.

BERARDI, S.; RIA, R.; REALE, A.; LUISI, A.; CATACCHIO, I.; MOSCHETTA, M.; VACCA, A. Multiple myeloma macrophages: pivotal players in the tumor microenvironment. **Journal of Oncology**. v. 2013, p.1-6, 2013.

BOSCOLO, E.; BISCHOFF, J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. **Angiogenesis**. v.12, n.2, p.197–207, 2009.

BUSCHMANN, I.; SCHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessels growth. **New Physiology Science**. v.14, n.3, p. 121-125, jun. 1999.

CAO, Y.; LINDEN, P.; SHIMA, D.; BROWNE, F. and FOLKMAN, J. *In vivo* angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 98, n. 11, p.2507–2511, dec. 1996.

CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A.; VINCENTI, V.; COMPERNOLLE, V.; DE MOL, M.; WU, Y.; BONO, F.; DEVY, L.; BECK, H.; SCHOLZ, D.;

ACKER, T.; DIPALMA, T.; DEWERCHIN, M.; NOEL, A.; STALMANS, I.; BARRA, A.; BLACHER, S.; VANDENDRIESSCHE, T.; PONTEN, A.; ERIKSSON, U.; PLATE, K.H.; FOIDART, J.; SCHAPER, W.; CHARNOCK-JONES, D.S.; HICKLIN, D.J.; HERBERT, H.; COLLEN, D.; PERSICO, M.G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Medicine**. v.7, n.5, p.575-583, 2001.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**. v.9, n.6, jun 2003, p.653-660, 2003.

CAVALLARI, M.; FALCO, T.; FRONTALI, M.; ROMANO, S.; BAGNATO, F.; ORZI, F. Fractal analysis reveals reduced complexity of retinal vessels in CADASIL. **Plos One**. v.6, p.1-4, 2011.

CHENG, C.F.; FAN, J.; FEDESCO, M.; GUAN, S.; LI, Y.; BANDYOPADHYAY, B.; BRIGHT, A. M.; YERUSHALMI, D.; LIANG, M.; CHEN, M.; HAN, Y.-P.; WOODLEY, D. T.; LI, W. Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )-stimulated secretion of HSP90 $\alpha$ : using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGF $\beta$ -Rich environment during wound healing. **Molecular and Cellular Biology**. v.28, n.10, p. 3344–3358, may. 2008.

CHEUNG, N.; DONAGHUE, K.C.; LIEW, G.; ROGERS, S.L.; WANG, J.J.; LIM, S.W.; JENKINS, A.J.; HSU, W.; LEE, M.L.; WONG T.Y. Quantitative assessment of early diabetic retinopathy using fractal analysis. **Diabetes Care**. v.32, n.1, p.106-110, jan. 2009.

CHRZANOWSKA-WODNICKA, M.; KRAUS, A.E.; GALE, D.; WHITE II, G.C.; VANSLUYS, J. Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in Rap1b-deficient mice. **Blood**. v.111, n. 5, p.2647-2656, mar. 2008.

CHUNG, A.S.; FERRARA, N. Developmental and pathological angiogenesis. **The Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v.27, p.563–84, 2011.

COSTA, E.V.L.; JIMENEZ, G.C.; BARBOSA, C.T.F.; NOGUEIRA, R.A. Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. **Bioelectromagnetics**. v.34, n.2, p.114-121, feb. 2013.

COSTA, L.F.; BIANCHI, A.G.C. A outra dimensão da dimensão fractal. **Ciência Hoje**. v. 31, n.183, p40-47, jun. 2002.

CRAWFORD, T.N.; ALFARO, D.V.; KERRISON, J.B.; JABLON, E.P. Diabetic retinopathy and angiogenesis. **Current Diabetes Reviews**. v.5, p.8-13, 2009.

CRAWFORD, Y.; KASMAN, I.; YU, L.; ZHONG, C.; WU, X.; MODRUSAN, Z.; KAMINKER, J.; FERRARA, N. PDGF-C mediates the angiogenic and

tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. **Cancer Cell**. v.15, p.21–34, Jan, 2009.

CUNHA JR., H.; COSTA, E.O.; LOBO, M.H.; MENEZES, M. Caos e fractal: uma introdução pedagógica pela cultura para os cursos de engenharia elétrica. In: WCETE - World Congress on Engineering and Technology Education, 2004, Santos. **WCETE**. São Paulo. 2004, p.1549-1552.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 710p.

CZIROK, A.; LITTLE, C.D. Pattern formation during vasculogenesis. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**. v.96, n.2, p.153–162, jun. 2012.

DAMICO, F.M. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivos Brasileiro Oftalmologia**. v.70, n.3, p.547-53, 2007.

DELLE MONACHE, S.; ANGELUCCI, A.; SANITA, P.; IORIO, R.; BENNATO, F.; MANCINI, F.; GUALTIERI, G.; COLONNA, R.C. Inhibition of angiogenesis mediated by extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MFS). **Plos One**. v. 8, n. 11, p. 1-11, nov. 2013.

DELLMANN, H-D.; VENABLE, J.H. Sistema Cardiovascular. In: DELLMANN, H-D.; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. cap 7, p.115-128.

DEVIHA, V.S.; RENGARAJAN, P.; HUSSAIN, R.J. Modeling blood flow in the blood vessels of the cardiovascular system using fractals. **Applied Mathematical Sciences**. v. 7, n.11, p.527 - 537, 2013.

DIAS, P.F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; MARASCHIM, R.P.; MARASCHIM, M. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 25, p.28-34, mar/abr. 2002.

DIAS, P.F.; SIQUEIRA JR, J.M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A.G.; GAGLIARDI, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenetic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research**. v.75 p.34–44, 2008a.

DIAS, P.F.; BERTI, F.V.; SIQUEIRA JR., J.M.; MARASCHIN, M.; GAGLIARDI, A.R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Trans-resveratrol inhibits early blood vessel formation (vasculogenesis) without impairment of embryonic growth. **Journal of Pharmacological Sciences**. v.107, p.118 -127, 2008b.

DING, Z.; LAMBRECHTS, A.; PAREPALLY, M.; ROY, P. Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. **Journal of Cell Science**. v. 119, p.4127-4137, 2006.

DOUBAL, F.N.; MACGILLIVRAY, T.J; PATTON, N.; DHILLON, B.; DENNIS, M.S.; WARDLAW, J.M. Fractal analysis of retinal vessels suggests that a distinct vasculopathy causes lacunar stroke. **Neurology**. v.74, p.1102–1107, apr. 2010.

DUEÑAS, Z.; TORNER, L.; CORBACHO, A.M.; OCHOA, A.; GUTIÉRREZ–OSPINA, G.; LÓPEZ–BARRERA, F.; BARRIOS, F.A.; BERGER, P.; ESCALERA, G. M.; CLAPP, C. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 40, n. 11, p.2498- 2505, oct. 1999.

EGAMI, K.; MUROHARA, T.; AOKI, M.; MATSUIISHI, T. Ischemia-induced angiogenesis: role of inflammatory response mediated by P-selectin. **Journal of Leukocyte Biology**. v.79, p. 971–976, 2006.

ELICEIRI, B.P.; CHERESH. D.A. The role of alpha v integrins during angiogenesis. **Molecular Medicine**. v.4, p.741-750, 1998.

EMMETT, M.S.; DEWING, D.; PRITCHARD-JONES, R.O. Angiogenesis and melanoma - from basic science to clinical trials. *American Journal of Cancer Research*. v.1, n.7, p.852-868, 2011.

ERDOGAN, Y. Electromagnetic Pollution in the Computer Labs: The Effects on the Learning Environment. **Essays in Education**. v. 22, p. 78-86, 2007.

EYNARD, A.R.; MUÑOZ, S. Movimentos do corpo, das vísceras e do sistema cardiocirculatório. In: EYNARD, A.R.; VALENTICH, M.A.; ROVASIO R.A. **Histologia e embriologia humanas: bases celulares e moleculares**. 4<sup>o</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. cap 9, p.299-340.

FALCÃO, M.; FALCÃO-REI, F.; ROCHA-SOUSA, A. Diabetic retinopathy: understanding pathologic angiogenesis and exploring its treatment options. **The Open Circulation and Vascular Journal**. v. 3 , p. 30-42, 2010.

FALCONER, K. **Fractal geometry – Mathematical foundations and applications**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1990. 288p.

FAMILY, F.; MASTERS, B.R.; PLATT, D.E. Fractal pattern formation in human retinal vessels. **Physica D**. v.38, p.98 -103, 1989.

FAYAZI, M.; BOROUJENI, M.B.; SALEHNIA, M. KHANSARINEJAD, B. Ovarian stimulation by exogenous gonadotropin decreases the implantation rate and expression of mouse blastocysts integrins. **Iranian Biomedical Journal**. v.18, n., p.8-15, jan. 2014.

FERGUSON, J.E.; KELLEY, R.W.; PATTERSON, C.. Mechanisms of Endothelial Differentiation in Embryonic Vasculogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.25, p.2246-2254, nov. 2005.

FEDER, J. **Fractals**. 4.ed. New York: Plenum Press, 1988. 283p

FLAMME, I.; FRÖLICH, T.; RISAU, W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. **Journal of Cellular Physiology**. v. 173, p.206-210, 1997.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science** v.235, n.4787, p.442-447, 1987.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature Reviews. Drug Discovery**. v.6, p.273-286, apr. 2007.

FUJIMOTO, A.; ONODERA, H. .; MORI, A.; ISOBE, N.; YASUDA, S.; OE, H.; YONENAGA, Y.; TACHIBANA, T.; IMAMURA, M. Vascular endothelial growth factor reduces mural cell coverage of endothelial cells and induces sprouting rather than luminal division in an HT1080 tumour angiogenesis model. **International Journal Experimental Pathology**. v.85, p.355–364, 2004.

GAN, J.C.; GLAZER, P.A. Electrical stimulation therapies for spinal fusions: current concepts. **European Spine Journal**. v.15, p.1301–1311, 2006.

GARCIA, E.A.C. **Biofísica**. São Paulo: Sarvier, 2002. 387p.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 5<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 456p.

GAUDIO, E.; CHABEREK, S.; MONTELLA, A.; PANNARALE, L.; MORINI, S.; NOVELLI, G.; BORGHESE, F.; CONTE, D.; OSTROWSKI, K. Fractal and Fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver. **Journal of Anatomy**, v.207, n.2, p.107-115, aug. 2005.

GERHARTZ, B.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; FRITZ, H.; MACHLEIDT, W.; KOLB, H.J.; WITTMANN, J. Proteolytic enzymes in yolk-sac membrane of quail egg. Purification and enzymatic characterisation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**.v.118, n.1, p.159–166, 1997.

GERHARTZ, B.; KOLB, H.J.; WITTMANN, J. Proteolytic activity in the yolk sac membrane of quail eggs. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 123, n.1, p.1-8, 1999.

GOLINSKI, M.R.; BOECKLEN, W.J.; DAWE, A.L. Two-dimensional fractal growth properties of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*: the effects of hypovirus infection. **Journal of Basic Microbiology**. v.48, p.426–429, 2008.

GOULD, D.J.; VADAKKAN, T.J.; POCHÉ, R.A.; DICKINSON, M.E. Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. **Microcirculation**. v.18, n.2, p.136-151, 2011.

GOULD, D.J.; REECE, G.P. Skin graft vascular maturation and remodeling: a multifractal approach to morphological quantification. **Microcirculation**. v.19, n.7, p.652–663, oct. 2012.

GRASSBERGER, P.; PROCACCIA, I. Measuring the strangeness of strange attractors. **Physica D**. v.9, p.189-208, 1983.

GREGORY, A. D.; CAPOCCIA, B. J.; WOLOSZYNEK, J. R.; LINK, D.C. Systemic levels of G-CSF and interleukin-6 determine the angiogenic potential of bone marrow resident monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**. v.88, p1-9, jul. 2010.

GRIZZI, F.; RUSSO, C.; COLOMBO, P.; FRANCESCHINI, B.; FREZZA, E.E.; COBOS, E.; CHIRIVA-INTERNATI, M. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC Cancer**, v.5, n.14, p.1-9, feb. 2005.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115p.

HENRIKSON, R.C.; KAYE, G.I; MAZURKIEWICZ, J E. **NMS Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 552p.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física 8<sup>o</sup> ed**. Rio de Janeiro: LTC, 2011. 395p.

HEESCHEN, C.; DIMMELER, S.; FICHTLSCHERER, S.; HAMM, C.W.; BERGER, J.; SIMOONS, M.L.; ZEIHNER, A.M. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. **Journal of the American Medical Association**. v. 291, n.4, p.435-441, jan. 2004.

HELLSTRÖM, A.; CARLSSON, B.; NIKLASSON, A.; SEGNESTAM, K.; BOGUSZEWSKI, M.; LACERDA, L.; SAVAGE, M.; SVENSSON, E.; SMITH, L.; WEINBERGER, D.; WIKLAND, K. A.; LARON, Z. IGF-I Is Critical for Normal Vascularization of the Human Retina. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.87, n.7, p.3413–3416, 2002.

HELMBERGER, M.; PIENN, M.; URSCHLER, M.; KULLNIG, P.; STOLLBERGER, R.; KOVACS, G. OLSCHIEWSKI, A.; OLSCHIEWSKI, H.; BÁLINT, Z. Quantification of tortuosity and fractal dimension of the lung vessels in pulmonary hypertension patients. **Plos One**. v.9, n.1, p. 1-9, jan. 2014.

HENDERSON, B.; KIND, M.; BOECK, G.; HELMBERG, A.; WICK, G. Gene expression profiling of human endothelial cells exposed to 50-Hz magnetic fields fails to produce regulated candidate genes. **Cell Stress & Chaperones**. v.11, n.3, p.227–232, 2006.

HIB, J. **Di Fiore histologia texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 513p.

ISHIDA, M.; FUJIOKA, M.; TAKAHASHI, K.A.; ARAI, Y.; KUBO, T. Electromagnetic fields a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v.466, p.1068–1073, 2008.

JELINEK, H.F.; MENDONÇA, M.B.M; ORÉFICE, F.; GARCIA, C.A.A; NOGUEIRA, R.A.; SOARES, J.V.B.; Marcondes Jr., R.C. Fractal analysis of the normal human retinal vasculature. **The Internet Journal of Ophthalmology and Visual Science**. v.8, n.2, p.1-10, 2010.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11<sup>o</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 524p.

KATOH, M. Therapeutics targeting angiogenesis: genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks. **International Journal of Molecular Medicine**. v.32, p.763-767, 2013.

KENNEDY, M.; D'SOUZA, S.L.; LYNCH-KATTMAN, M.; SCHWANTZ, S.; KELLER, G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. **BLOOD**. v.109, n.7, p. 2679-2687, apr. 2007.

KENDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Fundamentos da neurociência e do comportamento**. Prentice-Hall do Brasil, 1997. 591p.

KIRCHNER, L. M.; SCHMIDT, S.P.; GRUBER, B.S. Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. **Microvascular Research**. v. 54, p.2 -14, 1996.

KISHORE, R.; QIN, G.; LUEDEMANN, C.; BORD, E.; HANLEY, A.; SILVER, M.; GAVIN, M.; GOUKASSAIN, D.; LOSORDO, D. W. The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF- $\alpha$ -induced transcriptional repression of cyclin A. **The Journal of Clinical Investigation**. v.115, n.7, p. 1785 –1796, jul. 2005.

KROCK, B.L.; SKULI, N.; SIMON, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. **Genes & Cancer**. v.2, n.12, p.1117–1133, 2011.

KUBOTA, Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. **The Keio Journal of Medicine**. v.61, n.2, p.47–56, jun. 2012.

KURZ, H.; WILTING, J.; CHRIST, B. Multivariate Characterization of Blood Vessel Morphogenesis in the Avian Chorioallantoic Membrane (CAM): Cell Proliferation, Length Density and Fractal Dimension. In: NONNENMACHER, T.F.; LOSA, G.A.; WEIBEL, E.R. **Fractals in Biology and Medicine**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1994, pp 132-140.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 2<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 677p.

KUNICKI, A.C.B.; ARAÚJO, L.S.;SÁ, F.B.; STOSIC,B.; BARBOSA, C.T.F.; NOGUEIRA, R.A. fractal analysis of retinal vessel patterns in ophthalmically normal dogs. **Veterinary Ophthalmology**. v.11, n.1, p.2-6. 2008.

KUNICKI, A.C.B.; OLIVEIRA, A.J.; MENDONÇA, M.B.M.; BARBOSA, C.T.F.; NOGUEIRA, R.A. 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.42, n.10, p.930-934, 2009.

LAMALICE, L.; BOEUF, F.; HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circulation Research**. v.100, p.782-794, 2007.

LANDINI, G.; MURRAY, P.I.; MISSON, G.P. Local connected fractal dimensions and lacunarity analyses of 60° fluorescein angiograms. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.36, n.13, p.2749-2755, dec. 1995.

LEE, C.C.; LIU, K.J.; HUANG, T.S. Tumor-associated macrophage: its role in tumor angiogenesis. **Journal of Cancer Molecules**. v. 2, n.4, p.135-140, 2006.

LE NOBLE, F.; MOYON, D.; PARDANAUD, L.; YUAN, L.; DJONOV, V.; MATTHIJSEN, R.; BRÉANT, C.; FLEURY, V.; EICHMANN, A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. **Development**. v.131, p.361-375, 2004.

LI, F.; XU, K.-W.; WANG, H.-C.; GUO, W.-Y.; HAN, Y.; LIU, B.; ZHANG, R.-Q. Effects of static magnetic field on human umbilical vessel endothelial cell. **Journal of Medical Colleges of PLA**. v.22, n.2, p.106-110, 2007.

LI, L.; CHEN, D.; LI, J.; WANG, X.; WANG, N.; XU, C.; WANG, Q.K. *Aggf1* acts at the top of the genetic regulatory hierarchy in specification of hemangioblasts in zebrafish. **Blood**. v.123, n.4, p.501-508, jan. 2014.

LIEBERMAN-AIDEN,E.; VAN BERKUM, N.L.; WILLIAMS, L.; IMAKAEV, M.; RAGOCZY, T.; TELLING, A.; AMIT, I.; LAJOIE, B.R.; SABO, P.J.; DORSCHNER, M.O.; SANDSTROM, R.; BERNSTEIN, B.; BENDER,M.A.; GROUDINE, M.; GNIRKE, A.; STAMATOYANNOPOULOS, J.; MIRNY, L.A.; LANDER, E.S.; DEKKER, J. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. **Science**. v. 326, p. 289-293, oct. 2009

LIEBOVITCH, L.S. **Fractals and chaos – Simplified for the life sciences**. New York: Oxford University Press, 1998. 268p.

LIU, J.T.; CHEN, Y.L.; CHEN, W.C.; CHEN, H.Y.; LIN, Y.W.; WANG, S.H, MAN, K.M.; WAN, H.M.; YIN, W.H.; LIU, P.L.; CHEN, Y.H. Role of pigment epithelium-derived factor in stem/progenitor cell-associated neovascularization. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2012, p1-10, 2012.

LIU, Z.; LEBRIN, F.; MARING, J.A.; DRIESCHE, S.; BRINK, S.; DINTHER, M.; THORIKAY, M.; MARTIN, S.; KOBAYASHI, K.; HAWINKELS, L.J. A. C.; MEETEREN, L.A.; PARDALI, E.; KORVING, J.; LETARTE, M.; ARTHUR, H.M.; THEUER, C.; GOUMANS, M.J.; MUMMERY, C.; DIJKE, P. Endoglin is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **Plos One**. v.9, n.1, p.1-12, jan. 2014.

LOPES, R.; BETROUNI, N. Fractal and multifractal analysis: a review. **Medical Image Analysis**. v.13, p.634–649, 2009.

LOPEZ-LOPEZ, C.; LEROITH, D.; AND TORRES-ALEMAN, I. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, n. 26, p.9833-9838, jun. 2004.

MA, J.; WANG, Q.; FEI, T.; HAN, J.-D. J.; CHEN, Y.-G. MCP-1 mediates TGF- $\beta$ -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. **Blood**. v. 109, n. 3, p. 987-994, feb. 2007.

MADANECKI, P.; KAPOOR, N.; BEBOK, Z.; OCHOCKA, R.; COLLAWN, J.F.; BARTOSZEWSKI, R. Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. **Cellular & Molecular Biology Letters**. v.18, p. 47-57, 2013.

MAHNA, A.; FIROOZABADI, S.M.; SHANKAYI, Z. The effect of time-varying low intensity elf magnetic field on growth rate of invasive ductal carcinoma on balb/c mice. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**. 14, n.3, p. 24-28, 2012.

MAINSTER, M.A. The Fractal Properties of Retinal Vessels: Embryological and clinical implications. **Eye**. v.4, p.235-241, 1990.

MANCARDI, D.; VARETTO, G.; BUCCI, E.; MANIERO, F.; GUIOT, C. Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. **Theoretical Biology and Medical Modelling**. v.5, n.12, p.1-8, 2008.

MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. New York. W.H. Freeman and Company, 1983. 468p.

MANDELBROT, B. **Objectos fractais**. Lisboa: Gradiva, 1991. 296p.

MARCINKOWSKA-GAPINSKA, A.; NAWROCKA-BOGUSZ, H. Analysis of the magnetic field influence on the rheological properties of healthy persons blood. **Biomed Research International**. v. 2013, p.1-7, 2013.

MARTINO, C.F.; PEREA, H.; HOPFNER, U.; FERGUSON, V.L.; WINTERMANTEL, E. Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells. **Bioelectromagnetics**. v.31, p.296-301, 2010.

MARUOTTI, N.; ANNESE, T.; CANTATORE, F.P.; RIBATTI, D. Macrophages and angiogenesis in rheumatic diseases. **Vascular Cell**. v.5, n.11, p.1-8, 2013.

MASTERS, B.R. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v.6, p.427–452, 2004.

MCKAY, J.C.; CORBACIO, M.; TYML, K.; PRATO, F.S.; THOMAS, A.W. Extremely low frequency pulsed electromagnetic field designed for antinociception does not affect microvascular responsiveness to the vasodilator acetylcholine. **Bioelectromagnetics**. v.31, p.64-76, 2010.

MCKAY, T.L.; GEDEON, D.J.; VICKERMAN, M.B.; HYLTON, A.G.; RIBITA, D.; OLAR, H.H.; KAISER, P.K.; PARSONS-WINGERTER, P. Selective inhibition of angiogenesis in small blood vessels and decrease in vessel diameter throughout the vascular tree by triamcinolone acetonide. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.49, n.3, p. 1184-1190, mar. 2008.

MEINHARDT, H. **The Algorithmic beauty of sea shells**. 4<sup>o</sup>ed. Berlin: Springer Verlag, 2009. 269p.

MELO-REIS, P.R.; ANDRADE, L.S.; SILVA, C.B.; ARAÚJO, L.M.M.; PEREIRA, M.S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex **Brazilian Journal of Biology**. v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MENDONÇA, M.B.M.; GARCIA, C.A.A.; NOGUEIRA, R.A.; GOMES M.A.F.; VALENÇA M.M.; ORÉFICE F. Análise fractal da vasculatura retínica: métodos desegmentação e de cálculo dimensional. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v.70, n.3, p.413-422, 2007.

MENEGHELLI, C.; JOAQUIM, L.S.D.; FÉLIX G.L.Q.; SOMENSI,A.; TOMAZZOLI, M.; SILVA, D.A.; BERTI, F.V.; VELEIRINHO, M.B.R.; RECOUVREUX, D.O.S.; ZERI, A.C.M; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Southern brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an in vitro and in vivo study. **Microvascular Research**. v.88, p. 1–11, jul. 2013.

MILLS, S.J.; COWIN, A.J.; KAUR, P. Pericytes, mesenchymal stem cells and the wound healing process. **Cells**. v. 2, p.621-634, 2013.

MOHAMED, Q.; GILLIES, M.C.; WONG, T.Y. Management of diabetic retinopathy. **JAMA**. v.298, n.8, p.902-916, aug. 2007.

NASTRI, C.O.; MARTINS, W.P.; REIS, F.J.C.; FERRIANI, R. A. Câncer de mama e disfunção endotelial. **Revista de Associação Médica Brasileira**. v.54, n.5, p.467-470, 2008.

NISHIWAKI, Y.; YOSHIDA, M.; IWAGURO, H.; MASUDA, H.; NITTA, N.; ASAHARA, T.; ISOBE, M. Endothelial e-selectin potentiates neovascularization via endothelial progenitor cell–dependent and–independent mechanisms. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.27, p.512-518, 2007.

NUSSENZVEIG, M. H. **Complexidade & Caos**. Rio de Janeiro: COPEA, 1999. 280 p.

OH, I.Y.; YOON, C.H.; HUR, J.; KIM, J.H.; KIM, T.Y.; LEE, C.S.; PARK, K.W.; CHAE, I.H.; OH, B.H.; PARK, Y.B.; KIM, H.S. Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. **Blood**. v.110, n.3891-3899, 2007.

OHKI, Y.; HEISSIG, B.; SATO, Y.; AKIYAMA, H. ZHU, Z.; HICKLIN, D. J.; SHIMADA, K.; OGAWA, H.; DAIDA, H.; HATTORI, K.; OHSAKA, A. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. **The FASEB Journal**. v. 19, p.2005-2007, 2005.

PARSONS-WINGERTER, P.; LWAI, B.; YANG, M.C.; ELLIOTT, K.E.; MILANINIA, A.; REDLITZ, A.; CLARK, J.I.; SAGE, E.H. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: Stimulation by bFGF and Inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. **Microvascular Research**. v. 55, p.201-214, 1998.

PARSONS-WINGERTER, P.; ELLIOTT, K.E.; CLARK, J.I.; FARR, A.G. Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.20, p.1250-1256, 2000a.

PARSONS-WINGERTER, P.; ELLIOTT, K.E.; FARR, A.G.; RADHAKRISHNAN, K.; CLARK, J.I.; SAGE, E.H. Generational analysis reveals that *tgf-b1* inhibits the rate of angiogenesis *in vivo* by selective decrease in the Number of New Vessels. **Microvascular Research**. v.59, p.221–232, 2000b.

PEITGEN, H-O.; JÜRGENS, H.; SAUPE, D. **Fractals for the classroom. Part one introduction to fractals and chaos**. New York: Springer-Verlag, 1992. 452 p.

PENG, C.K.; BULDYREV, S.V.; HAVLIN, S.; SIMONS, M.; STANLEY, H.E.; GOLDBERGER, A.L. Mosaic organization of DNA nucleotides. **Physical Review E**. v.49, p.1685-1689, 1994.

QUTUB, A.A.; POPEL, A.S. Elongation, proliferation & migration differentiate endothelial cell phenotypes and determine capillary sprouting. **BMC Systems Biology**. v.3, n.13, p.1-24, 2009.

RABINOVSKY, E.D.; DRAGHIA-AKLI, R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes *in vivo* angiogenesis. **Molecular Therapy**. v. 9, n. 1, p. 46-55, jan. 2004.

RAY, D.; MISHRA, M.; RALPH, S.; READ, I.; DAVIES, R.; BRENCHLEY, P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. **Diabetes**. v.53, p.861–864, mar. 2004.

RISAU, W. Mechanism of angiogenesis. **Nature**. v.386, n.6626, p. 671-674, apr. 1997.

RUGIERO, M.; BOTTARO, D.P.; LIGURI, G.; GULISANO, M.; PERUZZI, B.; PACINI, S. 0.2T Magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. **Bioelectromagnetics**, v. 25, p. 390-396, 2004.

SAHNI, A.; SPORN, L. A.; FRANCIS, C.W. Potentiation of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 21, p. 14936–14941, may 1999.

SANTOS, R.A.S.; SANTOS, M.J.C.; ANDRADE, S.P. Aspectos morfofuncionais da microcirculação. In: AIRES, M.M. **Fisiologia**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap 33, p.514-529.

SCHMIDT, A.; BRIXIUS, K.; BLOCH, W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. **Circulation Research**. v.101, p.125-136, 2007.

SCHÖN, M. P. Inhibitors of selectin functions in the treatment of inflammatory skin disorders. **Therapeutics and Clinical Risk Management**. v.1, n.3, p. 201–208, 2005.

SCHWARTZ, S.; GEORGE, J.; BEN-SHOSHAN, J. ; LUBOSHITS, G.; AVNI, I.; LEVKOVITCH-VERBIN, H.; ZIV, H. ; ROSNER, M.; BARAK, A. Drug modification of angiogenesis in a rat cornea model. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 48, n. 1, p.250–254, jan. 2008.

SENGUPTA, S.; GHERARDI, E.; SELLERS, L. A.; WOOD, J. M.; SASISEKHARAN, R.; FAN, T.P.D. Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.23, p.69-75, 2003.

SHENG, G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. **The International Journal of Developmental Biology**. v.54, p.1033-1043, 2010.

SILVA, A.C.; MENDONÇA, E.S.; REIS, C. Dimensão fractal de ácidos húmicos em diferentes condições experimentais. **Química Nova**, v.26, n.3, p.344-346, 2003.

SILVA, J.E.S.; MOURA, A.M.A.; NOGUEIRA, R.A. Efeito dos ácidos graxos essenciais sobre lipídemia e vascularização da membrana vitelina de codornas japonesas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, p. 1603-1612, 2012.

SILVA, R.; D'AMICO, G.; HODIVALA-DILKE, K.M.; REYNOLDS, L.E. Integrins the keys to unlocking angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.28, p.1703-1713, 2008.

STANLEY H.E.; MEAKIN P., Multifractal phenomena in physics and chemistry. **Nature**. v. 335, p.405-409, 1988.

STOŠIĆ T.; STOŠIĆ B.D. Multifractal analysis of human retinal vessels. **IEEE Transactions on Medical Imaging**. v.25, n.8, p.1101-1107, 2006.

STRASSMANN, B.B.; VIEIRA, A.R.; PEDROTTI, E.L.; MORAIS, H.N.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, n.18 p.8348-8353, sep. 2008.

SUN, J.; WANG, D.; JAIN, R. K.; CARIE, A.; PAQUETTE, S.; N ENNIS, E.; BLASKOVICH, M. A.; BALDINI, L.; COPPOLA, D.; HAMILTON, A. D. AND SEBTI, S. M. Inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by a synthetic molecule that blocks binding of both VEGF and PDGF to their receptors. **Oncogene**. v. 24, p.4701–4709, 2005.

TABIBIAZAR, R.; ROCKSON, S.G. Angiogenesis and the ischemic. **European Heart Journal**. v.22, p.903-918, 2001.

TAKEDA, K.; FONG, G.-H. Prolyl hydroxylase domain 2 protein suppresseshypoxia-induced endothelial cell proliferation. **Hypertension**. v.49, p.178-184, 2007.

ȚĂLU, Ș.; GIOVANZANA, S. Image analysis of the normal human retinal vasculature using fractal geometry. **Human & Veterinary Medicine - Bioflux**. v.4, n.1, p.14 -18, 2012.

ȚĂLU, Ș.; VLĂDUȚIU, C.; POPESCU, L.A.; LUPAȘCU, C.A.; VESA, Ș.C.; ȚĂLU, S.D. Fractal and lacunarity analysis of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes. **Human & Veterinary Medicine - Bioflux**. v.5, n.2, p.45-51, 2012.

TARR, J.M.; KAUL,K.; CHOPRA, M.;KOHNER, E.M.; CHIBBER, R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. **ISRN Ophthalmology**. v.2013, p.1-13, 2013.

TEIXEIRA, R.C.A.; GABRIEL JR, A.; MARTINO, M.C.; MARTINS, L.C.; LOPES, A.C.; TUFK, S. Marcadores de ativação endotelial e auto-anticorpos na artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 47, n.6, p.411-417, nov/dez. 2007.

TOZER, G.M.; AMEER-BEG, S.M.; BAKER, J.; BARBER, P.R.; HILL, S.A.; HODGKISS, R.J.; LOCKE, R.; PRISE, V.E.; WILSON, I.; VOJNOVIC, B. Intravital imaging of tumour vascular networks using multi-photon fluorescence microscopy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.135– 152, 2005.

TREMOLADA, G.; DEL TURCO, C.; LATTANZIO, R.; MAESTRONI, S.; MAESTRONI, A.; BANDELLO, F.; ZERBINI, G. The role of angiogenesis in the

development of proliferative diabetic retinopathy: impact of intravitreal anti-vegf treatment. **Experimental Diabetes Research**. v.2012: 1-7, 2012.

URBICH, C.; DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circulation Research**. v.95, p. 343-353, aug. 2004.

VICO, P.G.; CARTILIER, L.H. A new approach to the study of skin vascularization. **Plastic Reconstructive Surgery**. v.92, n.3, p. 463-468, 1993.

VICO, P.G.; BOYER, H.; CARTILIER, L.H. New concepts in the study of tissue vascularization: a mathematical model of skin vascularization. **Plastic Reconstructive Surgery**. v.94, n.1, p.174-179, 1994.

VICO, P.G.; KYRIACOS, S.; HEYMANS, O.; LOURYAN, S.; CARTILIER, L.H. Dynamic study of the extraembryonic vascular network of the chick embryo by fractal analysis. **Journal Theoretical Biology**. v.195, p.525-532, 1998.

VÝBOH, P.; ZEMAN, M.; BILČÍK, B.; ŠÁRNIKOVÁ, B.; KOŠTÁL, L. Angiogenic effect of leptin in the quail chorioallantoic membrane. **Acta Veterinaria Brno** v.79, p.13-17, 2010.

WANG, Z.; YANG, P.; XU, H.; QIAN, A.; HU, L.; SHANG, P. Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis. **Bioelectromagnetics**. v.30, n.6, p.446-453, sep. 2009.

WENG, W.; SHENG, G. Five transcription factors and fgf pathway inhibition efficiently induce erythroid differentiation in the epiblast. **Stem Cell Reports**. v. 2, p.262–270, mar. 2014.

WONG, V.W.; CRAWFORD, J.D. Vasculogenic cytokinesin wound healing. **BioMed Research International**. v. 2013, p.1-11, 2013.

XU, S.; OKANO, H.; NAKAJIMA, M.; HATANO, N.; TOMITA, N.; AND IKADA, Y. Static magnetic field effects on impaired peripheral vasomotion in conscious rats. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**. v. 2013., p.1-6, 2013.

YANCOPOULOS, G.D.; KLAGSBRUN, M.; FOLKMAN, J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. **Cell**. v. 93, p.661–664, may 1998.

YOUNG, P.A.; YOUNG, P.H. **Bases da neuroanatomia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 285p.

ZAIA, A.; ELEONORI, R.; MAPONI, P.; ROSSI, R.; MURRI, R. MR Imaging and Osteoporosis: Fractal lacunarity analysis of trabecular bone. **Information Technology in Biomedicine, IEEE Transactions**. v.10, n.3, p.484-489, 2006.

ZHANG, P.; YU, H.; ZHOU, N.; ZHANG, J.; WU, Y.; ZHANG, Y.; BAI, Y.; JIA, J.; ZHANG, Q.; TIAN, S.; WU, J.; HU, Y. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation**. v.10, p.43:1-10, 2013.

ZHUANG, Z.; FRERICH, J.M.; HUNTOON, K.; YANG, C.; MERRILL, M.J.; ABDULLAEV, Z.; PACK, S.D.; SHIVELY, S.B.; STAMP, G.; LONSER, R.R. Tumor derived vasculogenesis in von Hippel-Lindau disease-associated tumors. **Scientific Reports**. v.4, p.1-6, 2014.

## CAPÍTULO II

O artigo foi enviado para a revista Experimental Eye Research  
Protocolo: EXER14-455

**Análise fractal, multifractal e de lacunaridade, em vasos de diferentes regiões retinianas com e sem a retinopatia diabética não proliferativa.**

Edbhergue Ventura Lola Costa <sup>1,2</sup>, Romildo de Albuquerque Nogueira <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife , Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife Brasil.

Autor correspondente: R.A. Nogueira. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil, telefone: (+55) 81-3320 6395. Email: [ran.pe@terra.com.br](mailto:ran.pe@terra.com.br)

## Resumo

A retinopatia diabética não proliferativa (RDNP) é um estágio precoce da retinopatia diabética caracterizada por microaneurismas, hemorragias e obstruções de capilares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a rede de vasos sanguíneos da retina e de suas regiões de pacientes diabéticos sem e com sinais de retinopatia diabética precoce, utilizando o número de pontos de bifurcação e métodos fractais. Foram utilizadas 33 imagens segmentadas a partir de retinografias, sendo 28 imagens referentes à pacientes diabéticos, porém sem sinais da RDNP (controle) e outras 5 imagens relacionadas à pacientes com sinais da RDNP. Essas imagens foram obtidas a partir do banco de dados livre DRIVE (Digital Retinal Images for Vessel Extraction). As imagens segmentadas da rede vascular retiniana foram esqueletizadas pelo programa Matlab® version 7.8, em seguida foram divididas em 9 regiões através do programa Adobe Image Ready 7.0.1. As imagens esqueletizadas da retina toda e suas regiões foram analisadas pelos métodos de contagem dos pontos de bifurcação, dimensão de contagem por caixas, dimensão de informação, parâmetro de lacunaridade e análise multifractal tanto para o grupo controle quanto para o grupo com RDNP. O teste Z e o teste de Mann-Whitney foram usados na comparação estatística dos dados obtidos. Nenhum dos métodos fractais e nem a contagem dos pontos de bifurcação revelaram diferenças estatísticas significativas entre a rede vascular esqueletizada da retina de indivíduos diabéticos com e sem RDNP ( $p > 0,05$ ). No entanto, a análise multifractal mostrou que tanto as imagens esqueletizadas dos vasos de toda retina como de suas nove regiões seguiram um comportamento multifractal. Pode-se concluir que não há diferença entre a rede vascular retiniana de pacientes diabéticos portadores e não portadores da RDNP.

Palavras chaves: retinopatia diabética não proliferativa, rede vascular, fractal, multifractal, lacunaridade.

## 1. Introdução

Entre as oftalmopatias, a retinopatia diabética é uma das doenças que causa grande prejuízo à visão e pode levar à cegueira [Antonetti et al., 2006]. Esta complicação microvascular retiniana da diabetes mellitus ocorre devido à hiperglicemia que promove alterações estruturais e funcionais dos capilares retinianos [Crawford et al., 2009]. O estágio precoce da retinopatia é conhecido como a retinopatia diabética não proliferativa (RDNP), que é uma doença caracterizada por microaneurismas, hemorragias e obstrução dos capilares [Crawford et al., 2009; Chen; Shah, 2011]. A fase proliferativa pode ser caracterizada por neovascularização, aumento das regiões isquêmicas, hemorragia no vítreo, podendo ocorrer o descolamento da retina [Crawford et al., 2009; Tremolada et al., 2012].

A rede vascular da retina é considerada como uma estrutura fractal, devido ao processo de ramificação vascular apresentar autossimilaridade em diferentes escalas. Um objeto ou processo fractal é caracterizado pelas seguintes propriedades: (1) autossimilaridade, o que significa que as partes de um objeto ou processo se assemelham a todo o objeto ou processo; (2) dependência de escala, que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual ela é medida; (3) dimensão fractal, que fornece uma descrição quantitativa da autossimilaridade e dependência de escala, e (4) as propriedades estatísticas anômalas dos fractais [Mandelbrot, 1991; Bassingthwaight et al., 1994]. Vários trabalhos têm utilizado a geometria fractal para estudar a rede vascular da retina [Family et al., 1989; Che Azemin et al., 2011]. Doubal et al. [2010] têm relacionado a dimensão fractal dos vasos da retina ao acidente vascular cerebral lacunar e Cavallari et al. [2011] com a arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL). Avakian et al. [2002] e Kunicki et al. [2009] utilizaram métodos fractais para investigar a retinopatia diabética não proliferativa, no entanto resultados obtidos foram contraditórios.

A dimensão fractal descreve o quanto do espaço está preenchido, mas não indica como o espaço é preenchido pela estrutura fractal, podendo haver diferentes objetos com a mesma dimensão fractal [Mandelbrot, 1983; Gould et al., 2011]. A lacunaridade é um parâmetro que indica a distribuição de tamanhos de lacunas ao longo do objeto contido numa imagem, sendo capaz de identificar diferentes

estruturas que possuem a mesma dimensão fractal [Mandelbrot, 1983]. Este parâmetro tem sido utilizado como uma ferramenta na caracterização da rede vascular da retina. Landini et al. [1995] têm empregado a lacunaridade na identificação da oclusão das arteríolas e vênulas retinianas, enquanto Țălu et al. [2012] têm usado para diagnosticar ambliopia.

Atualmente, alguns trabalhos têm caracterizado objetos como estruturas multifractais (objetos que têm diferentes dimensões fractais) em vez de monofractal. Um objeto é considerado um multifractal quando suas diferentes regiões têm diferentes propriedades fractais [Stanley; Meakin, 1988]. Pesquisadores têm demonstrado que a rede vascular da retina é um objeto multifractal, este fato tem sido comprovado através das dimensões generalizadas e o espectro de singularidade [Stošić; Stošić, 2006; Gould et al., 2011]. Além disso, o espectro de singularidade possui a capacidade de identificar distúrbios na arquitetura vascular das retinas com enfermidades [Stosic; Stosic, 2006].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a rede de vasos sanguíneos da retina e suas regiões de pacientes diabéticos sem e com sinais de retinopatia diabética precoce, utilizando o número de pontos de bifurcação e métodos fractais, tais como dimensão de contagem por caixas, dimensão de informação, parâmetro de lacunaridade e análise multifractal: dimensões generalizadas e espectro de singularidade.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Imagens da retina**

As imagens foram obtidas a partir do banco de dados DRIVE (Digital Retinal Images for Vessels Extraction) [<http://www.isi.uu.nl/Research/Databases/DRIVE/>]. Foram utilizados 28 retinografias que não mostraram qualquer sinal de retinopatia diabética (Figura 1A) e 5 diagnosticados com uma precoce retinopatia diabética, a RDNP (Figura 1B). As imagens foram obtidas de pacientes diabéticos entre 25-90 anos de idade, utilizando uma câmara 3CCD não midriática Canon CR5 com um campo visual de 45 graus. Cada imagem foi fotografada usando 8 bits por plano de

cor em 768 por 584 pixels. O campo visual de cada imagem é circular com um diâmetro aproximado de 540 pixels e cada imagem foi salva em extensão JPEG.

## 2.2 Esqueletização e separação por região

As imagens dos vasos da retina segmentados manualmente (Figura 1C) também foram obtidas a partir do DRIVE. Essas imagens dos vasos segmentados foram esqueletizados pelo software Matlab ® versão 7.8 (MathWorks, Natick, MA, EUA), obtendo imagens de 565x586 pixels. Cada imagem foi dividida em nove regiões com mesmas dimensões (Figura 1D) pelo software Adobe Image Ready 7.0.1. A Figura 1 mostra a retina em escala de cinza, segmentada, esqueletizada e dividida em regiões (nasal superior, disco óptico, nasal inferior, superior, macular, inferior, temporal superior, temporal e temporal inferior).

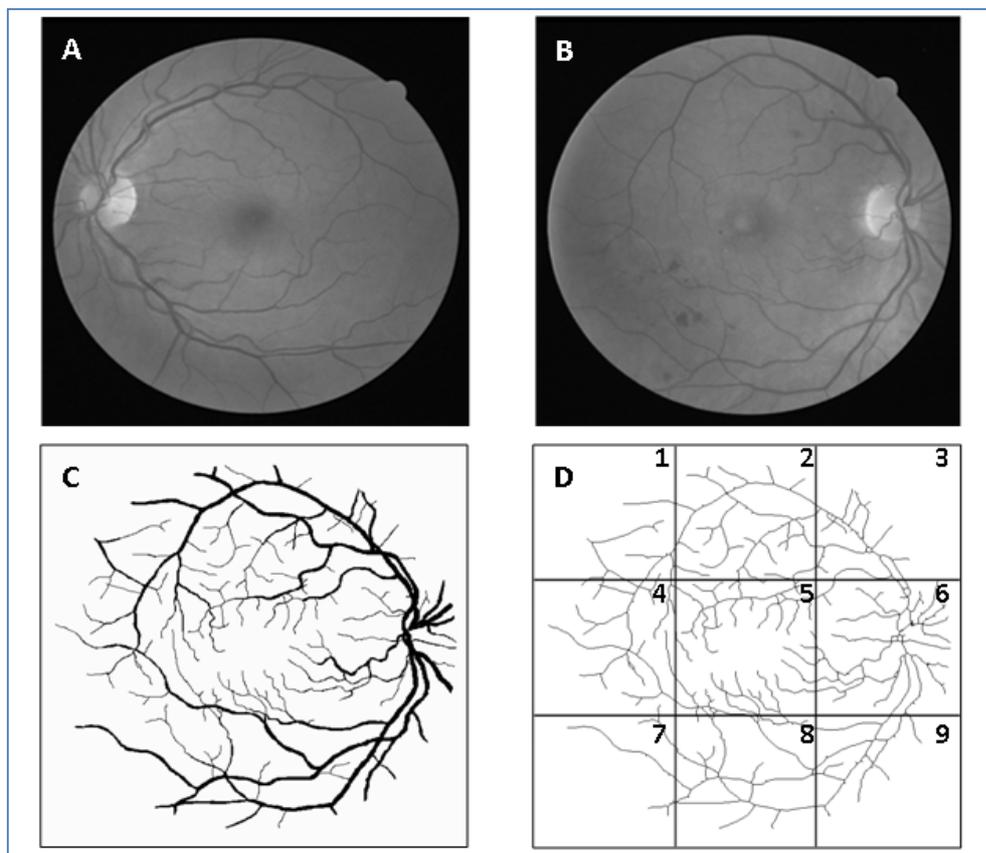


Figura 1. Imagem da retina normal (A), imagem com sinais de retinopatia diabética não proliferativa (B), imagem segmentada de B (C) e a mesma imagem esqueletizada dividido em nove regiões: 1 - temporal superior, 2 - superior, 3 - nasal superior, 4 - temporal, 5 - macular, 6 - disco óptico, 7 - temporal inferior, 8 - inferior e 9 - nasal inferior.

### 2.3 Pontos de bifurcação

O ponto de bifurcação é o lugar onde um vaso sanguíneo dá origem a outros vasos. O número de pontos de bifurcação é um método que informa sobre a quantidade de ramificações, mostrando a multiplicação vascular. Ele é um método opcional para medir o grau de vascularização sanguínea como outros parâmetros morfométricos que avaliam a arquitetura vascular (densidade, comprimento e diâmetro dos vasos). Estes pontos de bifurcação foram determinados a partir de imagens esqueletizadas das retinas e suas respectivas regiões para ambos os grupos. A identificação dos pontos de bifurcação foi confirmada nas retinografias originais para reduzir a possibilidade de quantificar artefatos ou a sobreposição de vasos.

### 2.4 Métodos de dimensão fractal

Foram utilizados dois métodos para calcular a dimensão fractal da rede vascular retiniana, a dimensão de contagem por caixas ( $D_{cc}$ ) e a dimensão de informação ( $D_{inf}$ ), através do software Benoit 1.3 Sistema de Análise Fractal (Trusoft, St. Petersburg, FL, EUA). Para dimensão de contagem por caixas ( $D_{cc}$ ), a imagem esqueletizada é coberta por uma série de caixas ( $N(r)$ ), contendo pelo menos um pixel da imagem. O procedimento é repetido com caixas de tamanhos diferentes e representado num gráfico de duplo log de  $N(r)$  em função dos lados das caixas  $r$  [Costa et al., 2013]. A inclinação dessa relação com o sinal invertido é a dimensão de contagem por caixas. Formalmente a inclinação pode ser calculada pela expressão 1 abaixo:

$$D_{cc} = - \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[ \frac{\log N(r + \epsilon) - \log N(r)}{\log(r + \epsilon) - \log r} \right] \quad (1).$$

Em que  $\epsilon$  é uma variação infinitesimal nos tamanhos das caixas. Para os cálculos de  $D_{cc}$  foram utilizados 19 conjuntos de caixas com diferentes tamanhos, o comprimento do maior lado da caixa foi de 270 pixels e o coeficiente de redução do tamanho da caixa foi de 1,3.

Na dimensão de informação  $D_{inf}$ , a imagem também é coberta por várias caixas de diferentes tamanhos, no entanto a contagem é realizada com base na probabilidade

de ocupação das caixas pelo objeto fractal. O procedimento é repetido com várias grades contendo, a cada etapa, um número maior de caixas  $N(r)$  à medida que os lados de caixas  $r$  vão reduzindo seu tamanho. Posteriormente, é traçado um gráfico duplo logaritmo da entropia de Kolmogorov em função dos lados das caixas  $r$ . A dimensão de informação é obtida pela inclinação do gráfico duplo logaritmo da entropia de Kolmogorov ( $S(r)$ ) versus  $r$ , com sinal invertido.

A entropia de Kolmogorov  $S(r)$  é definida como segue:

$$S(r) = \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(r)} m_i \log(m_i) \quad (2),$$

onde  $N$  é o número de caixas,  $m_i = M_i/M$ ,  $M_i$  é o número de pontos na  $i$ -ésima caixa e  $M$  é o número total de pontos do objeto fractal e  $r$  é o lado das caixas (KUNICK *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013).

Formalmente a  $D_{inf}$  é calculada pela expressão (3):

$$D_{inf} = - \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[ \frac{S(r + \epsilon) - S(r)}{\log(r + \epsilon) - \log r} \right] \quad (3).$$

Sendo  $\epsilon$  é uma variação infinitesimal nos tamanhos das caixas.

Para os cálculos de  $D_{inf}$  foram usados 8 conjuntos de caixas de diferentes tamanhos, o comprimento do lado maior caixa foi de 270 pixels e o coeficiente de redução de tamanho da caixa foi de 2,0.

A Figura 2 mostra os gráficos formados para obtenção da dimensão de contagem por caixas (Figura 2A) e da dimensão de informação (Figura 2B). As dimensões apresentadas são da retina inteira de um indivíduo sem sinais da RDNP.

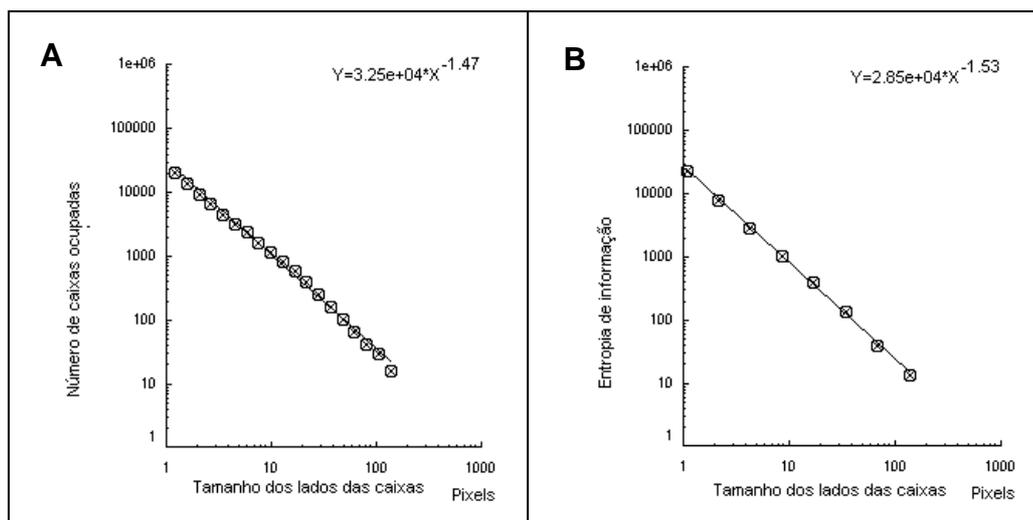


Figura 2. A inclinação da reta no gráfico do número de caixas pelo tamanho dos lados das caixas é a dimensão de contagem por caixas (A). A inclinação da reta no gráfico da entropia de Kolmogorov pelo tamanho dos lados das caixas é a dimensão de informação (B).

## 2.5 Parâmetro de lacunaridade

Para avaliar o parâmetro de lacunaridade das imagens dos vasos da retina, foi utilizado o programa Image J (Wayne Rasband, Institutos Nacionais de Saúde, em Bethesda, Maryland, EUA), com o plug-in FracLac (A. Karperien - Universidade Charles Sturt, Austrália). A lacunaridade é obtida através da medida da dispersão de lacunas dentro de uma imagem, por outras palavras, ela está relacionada com a distribuição de pixels de um objeto numa imagem. A quantificação é realizada como o método de contagem por caixas, no entanto, neste caso, também são utilizados diferentes orientações dos conjuntos de caixas ( $g$ ). O valor médio da lacunaridade é calculado como segue:

$$\Lambda = \left[ \sum_g \sum_i (1 + (\sigma|\mu)^2) \right] / n \quad (4).$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão e  $\mu$  é média de pixels por caixa em um tamanho  $r$ , na contagem de caixas em uma orientação  $g$  e  $n$  é o número de tamanhos da caixa. A soma é realizada sobre todos os valores de  $r$  e  $g$ . O  $i$  significa o índice para cada tamanho de caixa utilizado no somatório.

## 2.6 Análise multifractal

O programa Image J com o plug-in FracLac também foi utilizado para calcular a multifractalidade dos vasos da retina. A estrutura multifractal é caracterizada por obtenção da dimensão generalizada  $D_q$  que está relacionada com um valor de  $q$ . A variável  $q$  é o expoente que expressa as propriedades fractais em diferentes escalas para um objeto, que varia entre  $-\infty$  para  $+\infty$ . O  $q$  pode ser considerado uma escala de tamanho variável que é capaz de identificar tanto os pequenos como os grandes vasos de uma imagem da rede vascular. Quando seus valores são altos favorecem as caixas com relativamente altos valores para probabilidade de pixels e quando seus valores são menores favorecem caixas com relativamente baixos valores para probabilidade de pixels [Telesca et al., 2004]. O gráfico de  $D_q$  por  $q$  segue uma sigmoide decrescente para uma estrutura multifractal. Alguns trabalhos consideram determinados valores  $D_q$ , no caso  $D_0$ ,  $D_1$  e  $D_2$  que representam a multifractalidade de um objeto quando é satisfeita a condição  $D_0 \geq D_1 \geq D_2$ . Esses valores  $D_q$  representam um objeto multifractal que pode ser comparado com valores obtidos pelo método de dimensão monofractal, assim,  $D_0$  pode ser comparado à dimensão de capacidade, enquanto que  $D_1$  está relacionado à dimensão de informação e  $D_2$  à dimensão de correlação. Em nosso estudo foram gerados valores para dimensões generalizadas desde  $D_{-10}$  à  $D_{+10}$ , em outras palavras, os valores  $q$  variaram entre  $-10$  à  $+10$ .

$$D_q = \tau(q)/(q - 1) \quad (5).$$

O  $\tau$  é definido como:

$$\tau(q) = \lim_{r \rightarrow 0} \left[ \ln \left( \sum_i [P_i(r)]^q \right) \right] / \ln r \quad (6).$$

Onde  $P_i(r) = \frac{M_i}{M_0}$  é a densidade de pixels,  $M_i$  é o número de pixels dentro da  $i$ -ésima caixa e  $M_0$  é o número de pixels para toda imagem.  $\sum P_i$  é a densidade para todas as caixas ( $i$ ) em determinada escala  $r$ .

Outra maneira de calcular o espectro multifractal é através da relação entre os parâmetros  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$ , denominado de espectro de singularidade, onde

$$N(\alpha) = r^{-f(\alpha)} \quad (7),$$

representa o número de caixas  $N(\alpha)$  relacionada à probabilidade  $P_i$  de encontrar pixels do objeto fractal dentro de uma região de determinada escala  $i$  como

$$P_i = r^{\alpha_i} \quad (8)$$

e  $f(\alpha)$  pode ser entendido como a dimensão fractal da união das regiões com o comprimento de singularidade entre  $\alpha$  e  $\alpha + d\alpha$ . Onde  $\alpha$  toma valores que podem variar de  $-\infty$  para  $+\infty$ .

Essas variáveis são obtidas pela transformação de Legendre da função  $\tau$  em função de  $q$ , assim como descritas abaixo:

$$f(\alpha(q)) = q\alpha(q) - \tau(q) \quad (9),$$

sendo

$$\alpha(q) = d\tau(q)/dq \quad (10).$$

O cálculo numérico de  $\alpha$  e  $f(\alpha(q))$  pode ser obtido pelas seguintes equações:

$$\alpha = \sum_i [\mu_i \cdot \ln P_i] / \ln r \quad (11)$$

e

$$f(\alpha) = \sum_i [\mu_i \cdot \ln \mu_i] / \ln r \quad (12).$$

Onde

$$\mu_i(q, r) = [P_i(r)]^q / \sum_i [p_i(r)]^q \quad (13),$$

$[P_i(r)]^q$  é a probabilidade de pixels na  $i$ -ésima caixa para o expoente  $q$ . Para um objeto multifractal o gráfico  $\alpha$  por  $f(\alpha)$  se ajusta a uma parábola com concavidade para baixo.

Com os valores  $\alpha$  é possível calcular a extensão do comprimento de singularidade  $\Delta\alpha$  e a assimetria da curva do espectro de singularidade A. A extensão do comprimento de singularidade  $\Delta\alpha$  é definido como segue:

$$\Delta\alpha = \alpha_{\max} - \alpha_{\min} \quad (14).$$

O  $\alpha_{\max}$  (maior valor de  $\alpha$ ) e o  $\alpha_{\min}$  (menor valor de  $\alpha$ ) estão indicando a flutuação de probabilidade mínima e máxima dos pixels, respectivamente. Quanto maior o  $\Delta\alpha$  maior a distribuição de probabilidade, além disso, mais forte é a multifractalidade e mais complexa a distribuição de pixels da imagem [Shi et al., 2009; Hu et al., 2009].

A assimetria da curva do espectro de singularidade A é calculado de acordo com a fórmula expressa abaixo:

$$A = \frac{\alpha_0 - \alpha_{\min}}{\alpha_{\max} - \alpha_0} \quad (15).$$

A curva do espectro de singularidade é simétrica quando  $A=1$ , a curva é desviada para esquerda se  $A>1$  e para direita se  $A<1$ . Quando o espectro tem a curva desviada para esquerda significa que há maior presença de expoentes fractais mais altos e de grandes flutuações, o contrário indica predominância de baixos expoentes além de baixas flutuações [Hu et al., 2009].

## 2.7 A análise estatística

Foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para decidir sobre o uso de um teste paramétrico ou não paramétrico para realizar a comparação dos parâmetros determinados para dois grupos. Quando os dados do grupo controle seguiram uma distribuição normal foi utilizado o teste Z e para os dados que não seguiram uma distribuição normal foi usado o teste de Mann-Whitney.

## 3. Resultados

### 3.1 Número de pontos de bifurcação

A Tabela 1 mostra o número de pontos de bifurcação,  $p$  é o valor do nível de significância para o teste Z ou o teste de Mann-Whitney (com asteriscos). O número

de pontos de bifurcação para regiões do disco óptico, nasal inferior e temporal não exibiram uma distribuição normal, por isso usamos para estas regiões o teste de Mann-Whitney (teste não paramétrico) e para as demais regiões e a retina inteira, nos quais os pontos de bifurcações exibiram uma distribuição normal, foi utilizado o teste Z. Os testes estatísticos não mostraram diferenças nos pontos de bifurcação entre o grupo controle e o grupo RDNP, ao nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ).

Tabela 1. Número de pontos de bifurcação de todas as regiões e retina inteira do grupo controle e com RDNP

Região retiniana	Grupo Controle	Grupo com RDNP	$p$
Retina	103,4±22,6	91,4±13,0	0,297
Nasal superior	5,89±1,83	7,40±2,70	0,794
Disco óptico	17,60±4,48	17,6±5,41	0,723*
Nasal inferior	5,53±1,91	4,80±2,16	0,540*
Superior	15,6±5,51	15,0±3,16	0,456
Macular	17,8±6,53	14,4±3,50	0,296
Inferior	13,9±3,59	12,6±2,30	0,356
Temporal superior	6,67±2,73	5,80±0,44	0,374
Temporal	14,2±5,03	10,4±4,77	0,158*
Temporal inferior	6,03±2,60	3,40±2,07	0,155

Os valores  $p$  com asteriscos indicam as regiões comparadas através do teste de Mann-Whitney e nas demais regiões (valores  $p$  sem asteriscos) foi utilizado o teste Z normal. Para testar a normalidade da distribuição foi usado o teste Shapiro-Wilk

### 3.2 Dimensão de contagem por caixas e de informação

O primeiro passo na realização da análise estatística das dimensões fractais dos dois grupos foi testar se as segmentações representam bem as imagens originais das retinas. Foram selecionadas dez imagens (sem retinopatia) segmentadas por um observador a partir do banco de dados DRIVE e a seguir foram

esqueletizadas e comparadas com as esqueletizações realizadas nas mesmas dez imagens segmentadas manualmente por outro observador. A Figura 3 representa, respectivamente, a dimensão de contagem por caixas e de informação para imagens segmentadas e esqueletizadas. Para estes casos foi utilizado o teste t de Student que revelou não haver diferenças significativas entre as imagens segmentadas ( $p = 0,82$  para a dimensão de contagem por caixas e  $p = 1,0$  para a dimensão de informação) nem entre as imagens esqueletizadas ( $p = 1,0$  para a dimensão de contagem por caixas e  $p = 0,68$  para a dimensão da informação). Estes resultados mostram que a segmentação manual é um método confiável e pode ser considerada como o padrão áureo. A Tabela 2 mostra as dimensões fractais (dimensão de contagem por caixas e de informação) do grupo controle e com RDNP. Neste caso, não houve diferença significativa para as retinas e as suas diferentes regiões do grupo controle quando comparadas as do grupo com RDNP ( $p > 0,05$ ).

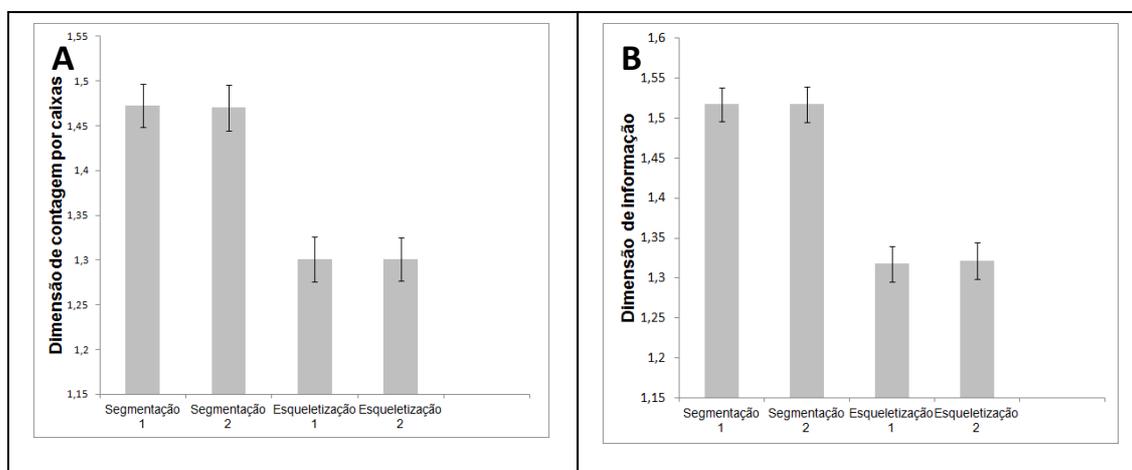


Figura 3. Dimensão de contagem por caixas (A) e dimensão de informação (B) das redes vasculares retinianas segmentadas por dois diferentes observadores.

Tabela 2. Dimensões fractais de todas as regiões e toda retina do grupo controle e RDNP

Região retiniana	D <sub>cc</sub> do grupo controle	D <sub>cc</sub> do grupo com RDNP	Valor $p$ de D <sub>cc</sub>	D <sub>inf</sub> do grupo controle	D <sub>inf</sub> do grupo com RDNP	Valor $p$ de D <sub>inf</sub>
Retina	1,29±0,02	1,28±0,02	0,30	1,31±0,02	1,30±0,02	0,39
Nasal superior	1,07±0,03	1,08±0,02	0,67	1,10±0,04	1,13±0,02	0,71
Disco óptico	1,14±0,02	1,14±0,04	0,49	1,21±0,03	1,21±0,04	0,49
Nasal inferior	1,03±0,03	1,02±0,03	0,38	1,07±0,04	1,05±0,03	0,28
Superior	1,09±0,03	1,07±0,01	0,33	1,14±0,04	1,12±0,02	0,31
Macular	1,10±0,04	1,10±0,02	0,43	1,15±0,03	1,15±0,02	0,45
Inferior	1,08±0,02	1,06±0,03	0,23	1,13±0,03	1,11±0,02	0,23
Temporal superior	1,01±0,04	1,02±0,03	0,50	1,06±0,05	1,06±0,02	0,51
Temporal	1,06±0,04	1,04±0,06	0,30	1,11±0,04	1,08±0,07	0,22
Temporal inferior	1,03±0,03	1,00±0,05	0,23	1,07±0,03	1,05±0,07	0,22

Todas as regiões foram submetidas ao teste Z normal.

### 3.3 Parâmetro de lacunaridade

A Tabela 3 mostra os valores de lacunaridade. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi usado para testar a normalidade da distribuição da lacunaridade na condição controle. Quando os dados do grupo controle não podiam ser descritos por uma distribuição normal os dois grupos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney (valores com asteriscos) e para os grupos cujos controles obedeciam às distribuições normais foram aplicados testes Z normal. Estatisticamente, não houve diferença entre os parâmetros de lacunaridade para o grupo controle e o grupo com RDNP ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3. Parâmetro de lacunaridade de todas as regiões e retina inteira do grupo controle e com RDNP

Região retiniana	Grupo controle	Grupo com RDNP	<i>P</i>
Retina	0,219±0,016	0,211±0,008	0,33
Nasal superior	0,331±0,064	0,309±0,058	0,37
Disco óptico	0,246±0,030	0,267±0,044	0,75
Nasal inferior	0,344±0,072	0,326±0,080	0,54*
Superior	0,227±0,047	0,208±0,022	0,58*
Macular	0,216±0,027	0,249±0,020	0,88
Inferior	0,237±0,030	0,230±0,023	0,41
Temporal superior	0,300±0,049	0,321±0,066	0,66
Temporal	0,234±0,024	0,242±0,018	0,62
Temporal inferior	0,291±0,037	0,361±0,131	0,27*

Os valores *p* com asteriscos indicam que as regiões foram comparadas com o teste de Mann-Whitney e nas demais regiões foi utilizado o teste Z normal. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi usado para testar a normalidade da distribuição da lacunaridade na condição controle.

### 3.4 Análise multifractal

Houve diferença estatística para a dimensão  $D_{-1}$  da região temporal inferior ( $p=0,04$  pelo teste Z normal), ao passo que outras dimensões generalizadas desta mesma região correspondente a ambos os grupos não foram significativamente diferentes. As dimensões generalizadas das demais regiões e da retina inteira não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A Tabela 4 apresenta a média e o desvio-padrão das seguintes dimensões generalizadas, para ambos os grupos:  $D_{-10}$ ,  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_{10}$ .

Tabela 4.  $D_{10}$ ,  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_{10}$  de todas regiões e da retina inteira do grupo controle e com RDNP

Região retiniana	$D_{10}$ do grupo controle		$p$	$D_0$ do grupo controle		$p$	$D_1$ do grupo controle		$p$	$D_2$ do grupo controle		$p$	$D_{10}$ do grupo controle		$p$
	grupo controle	RDNP		grupo com RDNP	grupo com RDNP		grupo com RDNP	grupo com RDNP		grupo com RDNP					
Retina	2,07±0,06	2,02±0,04	0,23	1,67±0,02	1,66±0,01	0,20	1,64±0,02	1,62±0,02	0,23	1,63±0,02	1,61±0,02	0,27	1,54±0,05	1,54±0,04	0,49
Nasal superior	2,15±0,45	2,43±0,52	0,17	1,48±0,14	1,56±0,12	0,70	1,43±0,13	1,49±0,10	0,67	1,40±0,13	1,46±0,09	0,66	1,28±0,14	1,33±0,09	0,63
Disco optico	2,01±0,11	1,99±0,10	0,45	1,62±0,06	1,60±0,11	0,39	1,60±0,06	1,58±0,12	0,38	1,59±0,06	1,57±0,12	0,38	1,49±0,10	1,43±0,19	0,39*
Nasal inferior	1,83±0,26	2,00±0,05	0,73	1,37±0,12	1,35±0,11	0,41	1,34±0,12	1,32±0,10	0,43	1,32±0,11	1,30±0,11	0,42	1,20±0,13	1,14±0,17	0,31
Superior	1,93±0,11	1,98±0,11	0,68	1,54±0,04	1,54±0,06	0,53	1,52±0,05	1,52±0,06	0,50	1,51±0,05	1,51±0,06	0,52	1,42±0,05	1,44±0,07	0,58*
Macular	2,06±0,08	2,02±0,15	0,32	1,62±0,05	1,59±0,04	0,30	1,57±0,05	1,55±0,03	0,20*	1,54±0,05	1,52±0,03	0,34*	1,41±0,07	1,40±0,05	0,44
Inferior	1,95±0,14	1,88±0,14	0,30	1,54±0,03	1,50±0,06	0,46	1,51±0,03	1,48±0,06	0,42	1,49±0,03	1,46±0,06	0,62	1,38±0,05	1,32±0,03	0,14
Temporal superior	2,42±0,52	2,50±0,49	0,88*	1,50±0,14	1,48±0,14	0,46	1,41±0,13	1,38±0,12	0,42	1,37±0,14	1,32±0,12	0,36	1,26±0,17	1,18±0,10	0,14*
Temporal	1,99±0,12	2,08±0,14	0,75	1,55±0,08	1,30±0,10	0,52	1,51±0,09	1,26±0,11	0,48	1,49±0,10	1,24±0,12	0,49	1,39±0,12	1,41±0,12	0,56
Temporal inferior	1,95±0,26	1,85±0,04	0,61*	1,40±0,09	1,55±0,16	0,14	1,36±0,09	1,51±0,17	0,13	1,34±0,09	1,49±0,16	0,14	1,22±0,12	1,14±0,14	0,24

Valores de  $p$  com asteriscos indicam que foi usado o teste de Mann-Whitney e os demais valores foram tratados com o teste Z normal.

A Figura 4 mostra dois gráficos que representam as médias e os desvios-padrões das dimensões generalizadas ( $D_q$ ) para retina inteira e para a região temporal inferior, lócus onde houve diferença estatística para a dimensão  $D_{-1}$ . Gráficos seguem uma curva sigmoide decrescente, caracterizando a multifractalidade para a rede vascular sanguínea da retina e suas regiões. Cada gráfico tem duas curvas, uma que representa o grupo controle e outra mostrando o grupo com retinopatia. O gráfico 4A que representa a retina toda para cada um dos dois grupos tem um comportamento com menos oscilação (desvios-padrões menores) em relação ao gráfico 4B que mostra somente a região temporal inferior. A Figura 5A e 5B representam, respectivamente, os gráficos de  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$  para toda retina e para região temporal inferior tanto para o grupo com a RDNP como para o grupo sem a doença. Os gráficos mostram o comportamento típico para as estruturas multifractais, as curvas são uma parábola com concavidade para baixo.

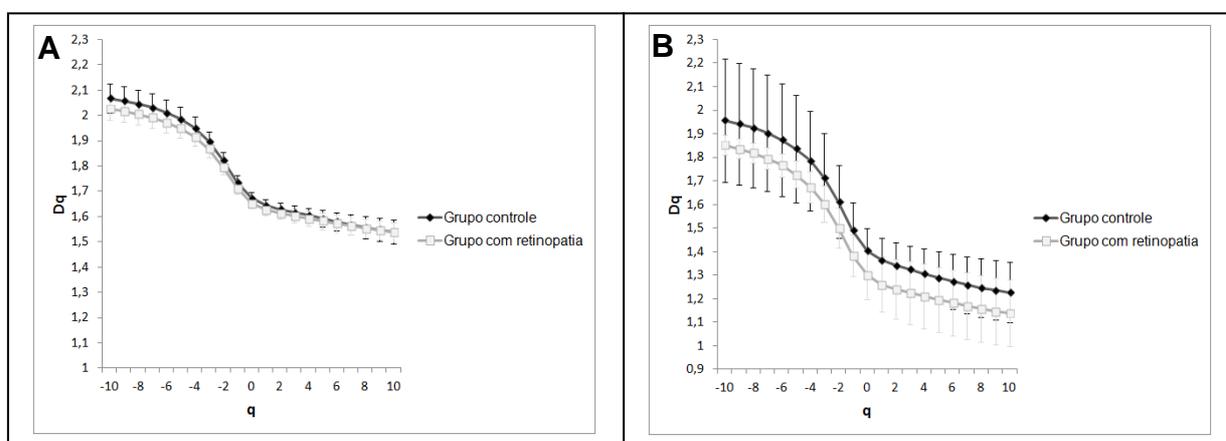


Figura 4. Dimensões generalizadas do grupo controle e com RDNP. A ilustração 4A representa a retina e a 4B representa a região temporal inferior da retina.

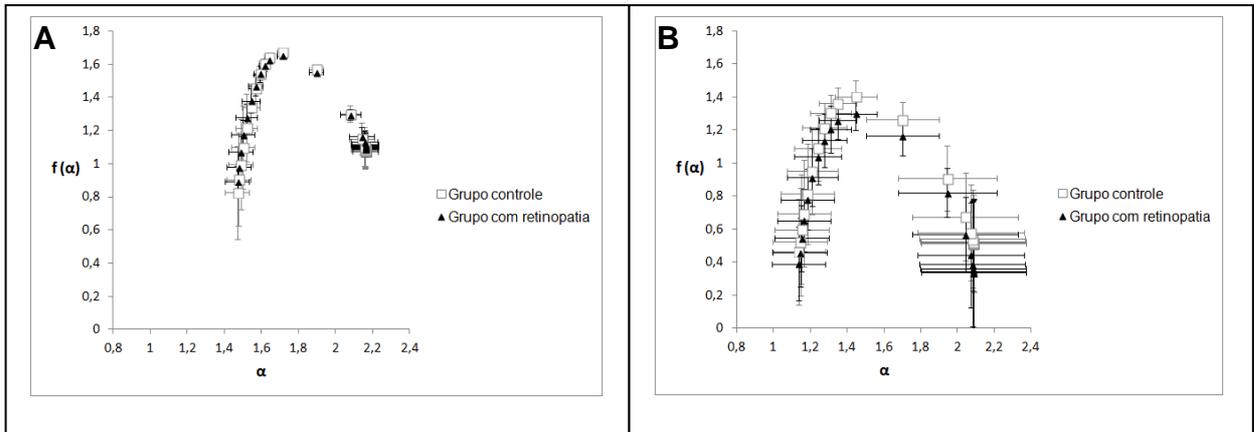


Figura 5. O espectro  $f(\alpha)$  do grupo controle e com retinopatia. A ilustração 5A representa toda a retina e a 5B representa a região temporal inferior da retina.

As médias com desvios-padrões dos parâmetros  $\Delta\alpha$  e  $A$  são mostrados na Tabela 5. Os valores do parâmetro  $\Delta\alpha$  representam a multifractalidade da rede vascular sanguínea de retina e de suas regiões. Os testes não revelaram diferenças estatisticamente significativas para o parâmetro  $\Delta\alpha$  entre o grupo controle e com RDNP. Com relação aos valores médios com respectivos desvios-padrões do parâmetro  $A$ , é observado que as retinas e todas suas regiões para os dois grupos possuem valores de  $A < 1$ , ou seja, a curva do espectro de singularidade  $f(\alpha)$  por  $\alpha$  é desviada para direita. Desta forma, há maior presença de baixos expoentes fractais além de baixas flutuações. Para o parâmetro  $A$ , os testes estatísticos não revelaram diferença significativa entre o grupo controle e com RDNP.

Tabela 5. Valores  $\Delta\alpha$  e valores de assimetria do espectro de singularidade (A) de todas as regiões e retina inteira do grupo controle e com RDNP

Região retiniana	$\Delta\alpha$			A		
	Grupo Controle	Grupo com RDNP	$p$	Grupo Controle	Grupo com RDNP	$p$
Retina	0,699±0,09	0,645±0,08	0,27	0,548±0,15	0,498±0,066	0,68*
Nasal superior	1,121±0,46	1,378±0,56	0,33*	0,585±0,44	0,444±0,085	0,67*
Disco óptico	0,725±0,13	0,815±0,18	0,75	0,476±0,20	0,552±0,266	0,70*
Nasal inferior	0,844±0,23	1,154±0,63	0,9	0,623±0,33	0,492±0,201	0,34
Superior	0,698±0,15	0,725±0,12	0,57	0,450±0,16	0,370±0,093	0,33*
Macular	0,879±0,12	0,846±0,2	0,39	0,677±0,17	0,611±0,143	0,33*
Inferior	0,783±0,18	0,771±0,14	0,47	0,578±0,21	0,672±0,181	0,67
Temporal superior	1,458±0,64	1,650±0,64	0,62	0,463±0,17	0,457±0,199	0,48
Temporal	0,807±0,19	0,886±0,12	0,66	0,516±0,14	0,419±0,124	0,25
Temporal inferior	0,951±0,36	0,940±0,16	0,64*	0,495±0,15	0,458±0,073	0,40

Valores  $p$  com asteriscos indicam as regiões que foram comparadas com o teste de Mann-Whitney e nas demais regiões foi utilizado o teste Z normal. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi usado para testar a normalidade da distribuição na condição controle.

#### 4. Discussão

A RDNP é caracterizada por microaneurismas, hemorragias e oclusões dos capilares [Crawford et al., 2009; Chen; Shah, 2011]. O surgimento de alterações hemodinâmicas e de mecanismos compensatórios devidos à presença desses sinais pode promover mudanças de arquitetura vascular. Assim, foram utilizados métodos que são capazes de identificar a complexidade geométrica da rede vascular sanguínea, exceto pelo número de pontos de bifurcação, que é um simples procedimento de quantificação da ramificação vascular.

A dimensão fractal é um descritor estatístico do padrão de preenchimento de espaço e de densidade que serve como ferramenta capaz de avaliar o desenvolvimento vascular e assim auxiliar no diagnóstico de doenças relacionadas com os distúrbios vasculares [Family et al., 1989; Parsons - Wingerter et al., 2000;

Mancardi et al., 2008]. A rede vascular da retina tem uma dimensão fractal, que varia entre 1 e 2, o mais próximo de 2 significa que mais complexa é a rede ou maior é a densidade vascular. Por exemplo, Doubal et al. (2010) têm associado um baixo valor de dimensão fractal dos vasos da retina para o subtipo de acidente vascular cerebral lacunar. Além disso, de acordo com Cavallari et al. (2011), a diminuição da dimensão fractal está relacionado com a redução da complexidade dos vasos da retina que refletem na alteração dos microvasos cerebrais em pacientes com CADASIL. Cheung et al. (2009) observaram que o aumento da dimensão fractal da vasculatura da retina está associada com os sinais da RDNP em indivíduos jovens com diabetes do tipo 1. Ao contrário, Avakian et al. (2002) investigando a RDNP em imagens esqueletizadas de 60 graus com angiofluoresceinografia pela análise fractal, observaram que a densidade de vasos da região macular da retina normal foi maior do que a densidade vascular da mesma região da retina com a RDNP. Os resultados obtidos com as dimensões de contagem por caixa e de informação neste trabalho são consistentes com os apresentados por Kunicki et al. (2009), em que as imagens da retina e as respectivas regiões segmentadas também não apresentaram diferenças entre o grupo normal e com RDNP.

Para identificar as possíveis alterações vasculares não reveladas pelos métodos de dimensões fractais, foi utilizado o parâmetro de lacunaridade. Este método fractal complementar possui a capacidade de reconhecer diferentes estruturas fractais que possuem a mesma dimensão fractal, uma vez que descreve como os pixels estão organizados em toda a imagem. Isto é uma forma de medir a heterogeneidade, bem como, o grau de invariância a translação do objeto fractal em uma imagem. Considerando que a dimensão fractal indica quanto do espaço é preenchido pelos vasos, este parâmetro (refletido na distribuição de lacunas) representa a forma como os vasos preenchem o espaço no qual estão incorporados [Gould et al., 2011]. Este parâmetro tem sido utilizado para identificar alterações nas arteríolas e vênulas da retina [Landini et al., 1995], bem como para identificar a rede vascular sanguínea da retina com ambliopia [Tšalu et al., 2012]. Os parâmetros de lacunaridade das retinas do grupo controle não foram estatisticamente diferentes quando comparados com as retinas com os sinais da RDNP. Isto ratifica os resultados obtidos pelo número de pontos de bifurcação, pela dimensão de contagem por caixas e pela dimensão de informação.

Na análise multifractal, apenas um valor relacionado  $D_{-1}$  da região temporal inferior mostrou diferença estatística entre os dois grupos. Podemos dizer que o único expoente  $q = -1$  não é suficiente para caracterizar a arquitetura vascular das retinas com a RDNP. Todas as demais dimensões generalizadas para retinas e suas regiões não apresentaram diferença significativa (ao nível de significância de 5%). A análise multifractal garante mais informações sobre o comportamento da rede de vasos sanguíneos, porque revela vários valores que estimam simultaneamente o nível de complexidade geométrica ou preenchimento do espaço pelos vasos. A curva sigmoide descendente formada pela relação entre  $D_q$  e  $q$  para os dois grupos representados pela figura 4, os define como uma estrutura multifractal, caso  $D_q$  fosse constante para os diferentes  $q$  a rede vascular retiniana seria considerada uma estrutura monofractal.

O espectro de singularidade  $f(\alpha)$  calcula a dimensão fractal do subconjunto de pixels de uma imagem que é descrito pelo um expoente particular, ele se refere à dominância relativa de vários expoentes fractais envolvidos na estrutura [Telesca et al., 2004]. A figura 5 mostra que o espectro de  $f(\alpha)$  por  $\alpha$  também representa a multifractalidade dos vasos da retina de ambos os grupos, neste caso, o espectro é uma parábola com concavidade voltada para baixo [Barabási; Vicsek, 1990]. Stošić e Stošić, (2006) demonstraram que o espectro de singularidade (gráfico  $f(\alpha)$  por  $\alpha$ ) da rede vascular da retina reflete um comportamento multifractal para os estados normais e doentes. Os autores também apresentaram através dos gráficos de singularidade que o grupo de retinas com diferentes doenças apresentam uma baixa singularidade em relação a retinas normais. Neste estudo foi mostrado um grupo diagnosticado apenas com a RDNP e que segundo o gráfico representado como figura 5 B, não há uma posição distinta da curva de singularidade do grupo com a enfermidade em relação ao grupo controle. Com a finalidade de avaliar a multifractalidade das redes vasculares das retinas e suas regiões, foi utilizado o comprimento de singularidade  $\Delta\alpha$  [Telesca et al., 2004; Shi et al., 2009; Hu et al., 2009], que não se mostrou estatisticamente diferente entre os dois grupos como observado na tabela 5. Outro parâmetro de análise da singularidade seria através da assimetria da curva do espectro de singularidade [Hu et al., 2009], como já foi observado, este parâmetro também não foi estatisticamente diferente, além dos dois grupos mostrarem valores com baixos expoentes fractais ( $A < 1$ ).

Os pacientes diabéticos, mesmo não tendo os sinais que caracterizam a leve retinopatia diabética precoce, apresentam uma geometria vascular semelhante aos pacientes com a doença, segundo os resultados revelados pelos métodos fractais (dimensão de contagem por caixas, dimensão de informação, dimensões generalizadas, análise do espectro de singularidade, parâmetro de lacunaridade) e o número de pontos de bifurcação.

As dimensões fractais obtidas no presente trabalho pelo método de contagem por caixas e de informação não seguem a condição estabelecida por Grassberger e Procaccia (1983) em que  $D_{CAP} \geq D_{inf} \geq D_{cor}$ . Este critério é representado pelas seguintes dimensões generalizadas  $D_0 \geq D_1 \geq D_2$  [Posadas et al., 2003; Stošić; Stošić, 2006; Gould et al., 2011]. Quando foram analisadas as regiões, algumas imagens dessas regiões não se enquadraram nesse critério, mesmo que os valores  $D_q$  sejam decrescentes com o aumento do expoente  $q$ . A região superior possui maior número de imagens (sete imagens) que não seguiram o referido critério. Outras regiões como a inferior, macular e nasal superior estão inseridas nesta condição. No entanto, podemos afirmar que a rede vascular das regiões da retina apresenta multifractalidade. Não só a rede vascular da retina, mas também as suas regiões pode ser considerada como uma sobreposição de estruturas monofractais [Stošić; Stošić, 2006; Lopes; Betrouni de 2009].

Da mesma forma foram observados fora desta condição os resultados obtidos por Mendonça et al. (2007); Kunicki et al. (2009) e Voinea; Popescu (2011). Considerando que a dimensão de massa raio é maior do que a dimensão de contagem por caixas (dimensão de capacidade) [Mendonça et al., 2007; Voinea; Popescu, 2011], Family et al. (1989) obtiveram dimensão de correlação maior do que a dimensão de massa raio para os vasos sanguíneos da retina, contrariando a relação  $D_{CAP} \geq D_{inf} \geq D_{cor}$ .

## 5. Conclusão

Pode-se afirmar que os métodos fractais (dimensão de contagem por caixas, dimensão de informação, dimensões generalizadas, análise do espectro de singularidade e o parâmetro de lacunaridade) bem como o número de pontos de bifurcação não revelaram alterações geométricas nas redes vasculares retinianas

entre o grupo de pacientes diabéticos portadores ou não de retinopatia diabética não proliferativa. Além disso, a análise multifractal permitiu identificar que não apenas a retina toda, porém suas várias regiões seguem um comportamento multifractal.

## 6. Agradecimento

Agradecimento a CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## 7. Referência bibliográfica

Antonetti D.A., Barber A.J., Bronson S.K., Freeman W.M., Gardner T.W., Jefferson L.S., Kester M., Kimball S.R., Krady J.K., LaNoue K.F., Norbury C.C., Quinn P.G., Sandirasegarane L., Simpson I.A. 2006. Diabetic retinopathy seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 55, 2401-2411.

Avakian A., Kalina R.E, Sage E.H., Rambhia A.H., Elliott K.E., Chuang E.L., Clark J.I. Hwang J.N., Parsons-Wingter P. 2002. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Curr Eye Res*. 24, 274–280.

Barabási A.L., Vicsek T. 1990. Self-similarity of the loop structure of diffusion-limited aggregates *J. Phys. A: Math. Gen.* 23, L729 - L733.

Bassingthwaighte J.B., Liebovitch L.S., West B.J. 1994. *Fractal Physiology*. Oxford University Press. New York.

Cavallari M., Falco T., Frontali M., Romano S., Bagnato F., Orzi F. 2011. Fractal analysis reveals reduced complexity of retinal vessels in CADASIL. *Plos one*. 6, 1-4.

Che Azemin M.Z., Kumar D.K., Wong T.Y., Kawasaki R., Mitchell P., and Wang J.J. 2011. Robust methodology for fractal analysis of the retinal vasculature. *IEEE Trans Med Imaging*. 30, 243 - 250.

Chen C., Shah C.P. 2011. Review of therapeutic advances in diabetic retinopathy. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2, 39-53.

Cheung N., Donaghue K.C., Liew G., Rogers S.I., Wang J.j., Lim S.W., Jenkins A.J., Hsu W., Lee M.I., Wong T.Y. 2009. Quantitative assessment of early diabetic retinopathy using fractal analysis. *Diabetes Care*. 32, 106-110.

Costa E.V.L., Jimenez G.C., Barbosa C.T.F., Nogueira R.A. 2013. Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 34,114-121.

Crawford T.N., Alfaro D.V., Kerrison J.B., Jablon E.P. 2009. Diabetic Retinopathy and Angiogenesis. *Curr Diabetes Rev.*; 5, 8-13.

Doubal F.N., MacGillivray T.J., Patton N., Dhillon B., Dennis M.S., Wardlaw J.M. 2010. Fractal analysis of retinal vessels suggests that a distinct vasculopathy causes lacunar stroke. *Neurology.*; 74, 1102 – 1107.

DRIVE: Digital retinal images for vessels extraction.

<http://www.isi.uu.nl/Research/database/DRIVE:index.php> accessed October 9, 2012.

Family F., Masters B.R., Platt D.E. 1989. Fractal pattern formation in human retinal vessels. *Physica D*. 38, 98-103.

Kunicki A.C.B., Oliveira A.J., Mendonça M.B.M., Barbosa C.T.F., Nogueira R.A. 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy?. *Braz J Med Biol Res*. 42, 930-934.

Gould D.J, Vadakkan T.J., Poché R.A., Dickinson M.E. 2011. Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. *Microcirculation*; 18, 136–151.

Grassberger P., Procaccia I. 1983. Measuring the strangeness of strange attractors. *Physica D*. 9, 189-208.

Hu M-H., Wang JF, Ge Y. Super-resolution reconstruction of remote sensing images using multifractal analysis. *Sensors* 2009; 9: 8669-8683.

Mancardi D., Varetto G., Bucci E., Maniero F., Guiot C. 2008. Fractal parameters and vascular networks: Facts & artifacts. *Theor Biol Med Model*. 5,1–8.

Mandelbrot, B.B. 1983. *The fractal geometry of nature*. Freeman. New York.

Mandelbrot B. 1991. *Objetos Fractais*. Gradiva Lisboa,.

Mendonça M.B.M., Garcia C.A.A., Nogueira R.A., Gomes M.A.F., Valença M.M., Oréfice F. 2007. Fractal analysis of retinal vascular tree: segmentation and estimation methods. *Arq Bras Oftalmol*. 70, 413-22.

Landini G., Murray P.I., Misson G.P. 1995. Local Connected Fractal Dimensions and Lacunarity Analyses of 60° Fluorescein Angiograms. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 13, 2749-2755.

Lopes R., Betrouni N. 2009. Fractal and multifractal analysis: A review. *Medical Image Analysis*. 2009. 13, 634–649.

Parsons-Wingerter P., Elliott K.E., Clark J.I., Farr A.G. 2000. Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20,1250–1256.

Posadas A.N.D., Giménez D., Quiroz R., Protz R. 2003. Multifractal characterization of soil pore systems. *Soil Sci Soc Am J.* 67, 1361-1369.

Shi K., Liu C.Q., Ai N.S. 2009. Monofractal and multifractal approaches in investigating temporal variation of air pollution indexes. *Fractals.* 4, 513-521.

Stanley H.E., Meakin P. 1988. Multifractal phenomena in physics and chemistry. *Nature.* 335, 405-409.

Stošić T., Stošić B.D. 2006. Multifractal analysis of human retinal vessels. *IEEE trans med. imaging.* 25, 1101-1107.

Țălu Ș., Vlăduțiu C., Popescu L. A, Lupașcu C. A, Vesa Ș.C., Țălu S.D. 2012. Fractal and lacunarity analysis of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes. *HVM Bioflux.* 5, 45-51.

Telesca L., Lapenna V., Macchiato M. 2004. Mono- and multifractal investigation of scaling properties in temporal patterns of seismic sequences. *Chaos, Solitons and Fractals.* 19, 1-15.

Tremolada G., Del Turco C., Lattanzio R., Maestroni S., Maestroni A., Bandello F., Zerbini G. 2012. The role of angiogenesis in the development of proliferative diabetic retinopathy: impact of intravitreal anti-vegf treatment. *Exp Diabetes Res.* 2012, 1-7.

Voinea V., Popescu D. 2011. Fractal analysis in electrography for biological systems diagnosing. *UPB. Sci. Bull.* 73, 29-42.

### CAPÍTULO III

O artigo foi enviado para a revista **Microvascular Research**  
Protocolo MVR-14-166

**Dimensão multifractal e lacunaridade da vascularização do saco vitelínico de embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) na ausência e presença de campo magnético de baixa frequência.**

Edbhergue Ventura Lola Costa <sup>1,2</sup> and Romildo de Albuquerque Nogueira <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biofísica Teórico, Experimental e Computacional, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

Autor correspondente: R.A. Nogueira. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil, telefone: (+55) 81-3320 6395. Email: [ran.pe@terra.com.br](mailto:ran.pe@terra.com.br)

## Resumo

Alguns trabalhos têm relatado os efeitos de campos magnéticos no tecido vascular sanguíneo. Campos de baixa frequência são capazes tanto de inibir como estimular os processos da vasculogênese e da angiogênese, dependendo da intensidade e do tempo de exposição ao campo. Com o objetivo de investigar possíveis efeitos de campos magnéticos de baixa frequência sobre o processo vascular se faz necessário empregar métodos que permita parametrizar a rede vascular sanguínea. Esta rede é uma estrutura com geometria fractal e por isso métodos fractais têm sido usados para avaliar a sua complexidade morfométrica. Neste trabalho, o parâmetro de lacunaridade e a análise multifractal foram usados para investigar a vasculogênese e a angiogênese na membrana do saco vitelínico (MSV) de embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) tanto em condição normal como submetida a um campo magnético externo de 60 Hz e 1 mT. A lacunaridade mostrou que houve baixa densidade vascular nas 72 horas de incubação para o grupo exposto ao campo magnético durante 9 h/dia. Ao passo que a análise multifractal mostrou que nas 72 horas de incubação houve uma redução da vascularização para grupos experimentais expostos por 6 h/dia e 9 h/dia em relação ao controle. Além disso, nas 72 horas de incubação, a análise multifractal revelou uma diferença entre os grupos expostos por 12 e 24 h/dia. Através dos métodos multifractais (dimensões generalizadas e espectro de singularidade) foi possível caracterizar a rede vascular da MSV de embrião de codorna japonesa como um objeto multifractal, sendo, portanto, um recurso mais adequado do que os tradicionais métodos monofractais.

Palavras chaves: vasculogênese, angiogênese, análise multifractal, parâmetro de lacunaridade, membrana do saco vitelínico, campo magnético.

## Introdução

Pesquisadores têm se preocupado em estudar os efeitos gerados por campo elétrico (CE), campo magnético (CM) e campo eletromagnético (CEM) sobre os organismos, com foco em diversas células e tecidos. Vários trabalhos relatam os efeitos do CM no tecido vascular sanguíneo (McKay et al., 2007). Os campos magnéticos estáticos (CME), dependendo da intensidade, tanto podem promover o aumento da proliferação de células endoteliais de veias umbilicais humanas (CEVUH) (Martino et al., 2010) como prevenir o crescimento das mesmas células (Li et al., 2007). Campo eletromagnético de frequência extremamente baixa do (CEM-FEB) é capaz de estimular a proliferação, migração e formação do tubo endotelial (Delle Monache et al., 2008). Estudos também mostraram que CEM-FEB promovem vasodilatação, vasoconstrição, alterações na angiogênese e vasculogênese (Tepper et al., 2004; McKay et al., 2007; Bekhite et al., 2010). O CM e CEM podem inibir (Costa et al., 2013) ou estimular a vasculogênese (Tepper et al., 2004; Bekhite et al., 2010), bem como inibir (Ruggiero et al., 2004; Wang et al., 2009; Balanezhad et al., 2010) ou estimular a angiogênese (Roland et al., 2000).

Vários estudos não apenas têm relatado os efeitos causados pelo CM ou CEM nos vasos, porém tem mostrado possibilidades do uso do CM como uma alternativa terapêutica contra o câncer e doenças relacionadas com vasculogênese e angiogênese (Bassett, 1993; Cameron et al, 2007; Ishida 2008). A vasculogênese e a angiogênese estão envolvidas com o crescimento, cicatrização, desenvolvimento tumoral e várias doenças (Folkman, 1989; Carmeliet et al., 2003; Folkman, 2007; Boscolo; Bischoff, 2009; Liu et al., 2012).

A rede vascular sanguínea é considerada uma estrutura fractal, devido a sua complexidade geométrica que é resultante do processo de ramificação dos vasos (Mandelbrot, 1983). A ramificação vascular é um processo em que os vasos geram vasos de diâmetros menores, sendo este processo observado em diferentes escalas. Assim a ramificação vascular possui autossimilaridade, que é uma das propriedades que definem os objetos fractais (Mandelbrot, 1983; Bassingthwaighe et al., 1994). Outras características são: dependência de escala, o que significa que a medida da grandeza depende da escala usada na sua medida; dimensão fractal, que fornece uma descrição quantitativa da autossimilaridade e dependência de

escala, normalmente estas dimensões são fracionária (Mandelbrot, 1983; Bassingthwaight et al., 1994).

Vários trabalhos têm utilizado a dimensão fractal para medir o comportamento da rede vascular em retinopatias (Avakian et al., 2002; Cheung et al., 2009; Kunicki et al., 2009) e também avaliar a ação de drogas no crescimento vascular (Parsons - Wingerter et al., 2006; McKay et al., 2008; Výboh et al., 2010) e na angiogênese tumoral (Kirchner et al., 1996; Taverna et al., 2009). Costa et al. (2013), trabalhando com o método de dimensão de contagem por caixas e de informação mostraram uma inibição da vascularização da MSV de embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) quando expostos a algumas doses de CM com frequência de 60 Hz e intensidade de 1 mT. No entanto, na estimativa da dimensão fractal existem duas dificuldades: a primeira dificuldade é referente à quantidade de espaço preenchido pelo objeto estudado sem descrever a organização deste objeto no espaço, portanto, objetos fractais diferentes podem possuir o mesmo valor de dimensão fractal (Mandelbrot, 1983; Gould et al., 2011); a segunda, o método usado para obter a dimensão fractal está relacionado a uma dimensão única e alguns objetos fractais apresentam diferentes propriedades fractais em suas diferentes regiões, sendo, portanto necessário mais de uma dimensão para representá-los (Stanley; Meakin, 1988).

Para resolver a primeira questão, há uma maneira de calcular a forma como o objeto fractal está organizado no espaço, denominado de lacunaridade (Mandelbrot, 1983; Gould et al., 2011). Este parâmetro mede a distribuição de buracos ou lacunas existentes ao longo do objeto incorporado na imagem, servindo de análise complementar para os métodos da dimensão fractal.

Com relação à segunda questão, o objeto que possui diferentes propriedades fractais em suas diferentes regiões é conhecido como um objeto multifractal. Este objeto é representado por várias dimensões fractais através do espectro de dimensões generalizadas bem como através do espectro de singularidade.

O objetivo deste trabalho é analisar, usando o parâmetro de lacunaridade e análise multifractal, a vascularização sanguínea da membrana do saco vitelínico de embrião de codorna e sua possível alteração quando exposta a um campo magnético de 60 Hz e 1 mT.

## **Materiais e Métodos**

O manuseio de animais nos ensaios experimentais foi realizado de acordo com o protocolo (número 028/2012-012531/2011-E09 CEUA/UFRPE) aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da UFRPE. O protocolo experimental foi realizado como mostrado em Costa et al. (2013), que em resumo consistiu da obtenção da MSV, sua exposição ao CM e a obtenção e processamento de imagens. Para obter a membrana do saco vitelínico, os ovos de codorna, após 2 dias de incubação, foram *janelados*, ou seja, aberta uma janela em sua casca com cerca de 3 cm<sup>2</sup>. Através da janela, 2,5 ml de albúmen foi removida e em seguida a janela foi recoberta com filme de PVC (cloreto de polivinila). Esta janela permitiu que a MSV fosse diretamente exposta ao CM. No período compreendido entre 48 e 96 horas de incubação, foi permitido observar claramente a expansão macroscópica da rede vascular da MSV.

A exposição ao CM foi realizada com par de bobinas de Helmholtz (PHYWE, Gottingen, Alemanha) e a intensidade do CM foi medida por um teslômetro (PHYWE, número do modelo 13610.93) ligado a uma sonda (PHYWE, número do modelo 13610.02) colocado sobre o eixo horizontal de cada uma das bobinas de Helmholtz. Os ovos foram colocados ao longo do eixo horizontal entre as bobinas para uma exposição uniforme ao CM, com intensidade de 1 mT.

Foram utilizados cinco grupos de 20 ovos, cada grupo foi exposto em momentos diferentes sob as mesmas condições experimentais, com a mesma incubadora e bobinas de Helmholtz. Os ovos foram colocados na incubadora após duas horas da ocorrência da postura das codornas e permaneceram durante 96 h na incubadora entre duas bobinas de Helmholtz. Para o grupo controle as bobinas foram desligadas. Todos os grupos (com exceção do grupo controle) foram expostos ao CM a partir das 48 h de incubação. O grupo 1 foi exposto três vezes ao dia por 2 h de CM com intervalos de 6 h entre as aplicações, totalizando uma exposição de 6 h/dia. O grupo 2 foi exposto por 3 h de CM, com intervalo de 5 h entre as aplicações, totalizando 9 h/dia. O grupo 3 foi exposto a 4 h, com intervalo de 4 h entre as aplicações (total de 12 h/dia), apenas o grupo 4 foi exposto durante 24 horas (continuamente).

Para o processamento de imagem, ao completar 72 horas de incubação, a rede vascular da MSV foi fotografada com uma câmera digital (DSC W-130 Sony, San Diego, CA, EUA). O campo visual foi limitado pelo tamanho do ovo, especificamente pelo eixo menor dos ovos, que variou 2,39-2,62 cm (figura 1A). As imagens da rede vascular da MSV (1920x1080 pixels) foram esqueletizadas manualmente (Figura 1B) pelo programa Microsoft Paint para serem avaliadas pelo parâmetro de lacunaridade e pela análise de multifractalidade. O mesmo procedimento foi repetido em 96 h de incubação.

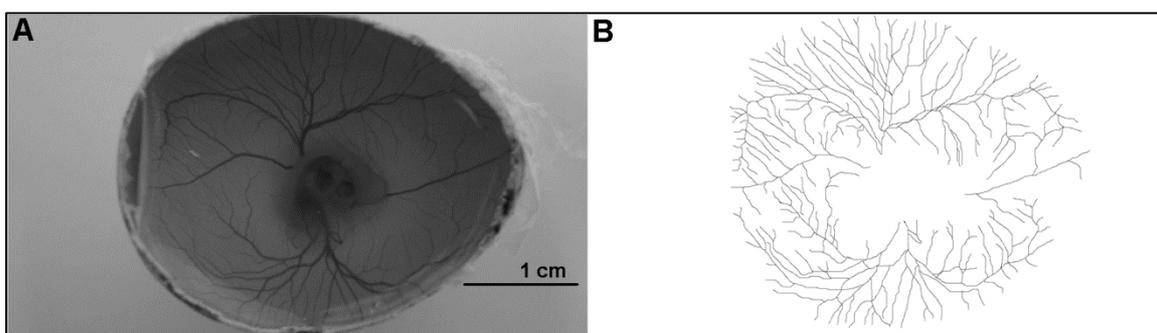


Figura 1. Rede vascular da MSV e sua correspondente imagem esqueletizada.

#### Análise de lacunaridade

Foi utilizado o programa Image J (Wayne Rasband, Institutos nacionais de saúde, em Bethesda, Maryland, EUA) com o plug-in FracLac (A. Karperien – Universidade Charles Sturt, Austrália) para obter os valores de lacunaridade (distribuição de buracos em uma imagem). A lacunaridade está relacionada à distribuição de pixel de um objeto numa imagem. A contagem é realizada em pixels da imagem, que cobre a vasculatura esqueletizada por uma série de grades, cada grade com um número de caixas com diferentes tamanhos  $r$  e com diferentes orientações ( $g$ ).

O valor médio para a lacunaridade  $\Lambda$  é calculada como segue:

$$\Lambda = \left[ \sum_g \sum_i (1 + (\sigma|\mu)^2) \right] / n \quad (1).$$

Onde  $\sigma$  é o desvio padrão e  $\mu$  é média de pixels por caixa com tamanho de lado  $r$ ,  $n$  é o número de tamanhos de caixas em uma contagem de caixas na orientação  $g$ . A soma é realizada sobre todos os valores de  $r$  e  $g$ .

### Análise multifractal

Também foi utilizado o programa Image J com o plug-in FracLac para realizar a análise de multifractalidade. A análise se baseia no espectro de dimensão generalizada, representado por  $D_q$  que é dependente da variável  $q$ . A variável  $q$  é o expoente que expressa as propriedades fractais em diferentes escalas para um objeto,  $q \in (-\infty, +\infty)$ . Para um objeto multifractal, o gráfico da relação de  $D_q$  com  $q$  é geralmente sigmoidal decrescente, com  $q$  variando entre -10 a +10 gerando dimensões desde  $D_{-10}$  e  $D_{+10}$ . Foram gerados 21 valores de  $D_q$  para cada imagem e todas as imagens foram submetidas aos testes estatísticos. O  $D_q$  é calculado como segue:

$$D_q = \tau(q)/(q - 1) \quad (2).$$

O  $\tau$  pode ser definido como:

$$\tau(q) = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \left[ \ln \left( \sum_i [P_i(r)]^q \right) \right] / \ln r \quad (3).$$

Onde  $P_i(r) = \frac{M_i}{M_0}$  é a densidade,  $M_i$  é o número de pixels dentro da  $i$ -ésima caixa e  $M_0$  é o número de pixels para toda imagem.  $\sum P_i$  é a densidade de pixels para todas as caixas ( $i$ ) na determinada escala  $r$ . O espectro multifractal também pode ser calculado através da relação do parâmetro  $f(\alpha)$  por  $\alpha$ , onde

$$N(\alpha) = r^{-f(\alpha)} \quad (4).$$

representa o número de caixas  $N(\alpha)$  tal que a probabilidade  $P_i$  de encontrar pixels do objeto fractal dentro de uma região de determinadas escalas  $i$  como

$$P_i = r^{\alpha_i} \quad (5).$$

e  $f(\alpha)$  é compreendido como a dimensão fractal da união das regiões com o comprimento de singularidade entre  $\alpha$  e  $\alpha + d\alpha$ . Onde  $\alpha$  toma valores que podem variar de  $-\infty$  a  $+\infty$ .

Essas variáveis são obtidas pela transformação de Legendre a partir de  $\tau$  e  $q$ , assim como descritas abaixo:

$$f(\alpha(q)) = q\alpha(q) - \tau(q) \quad (6)$$

e

$$\alpha(q) = d\tau(q)/dq \quad (7).$$

Numericamente,  $\alpha$  e  $f(\alpha)$  podem ser calculados pelas seguintes equações:

$$\alpha = \sum_i [\mu_i \cdot \ln P_i] / \ln r \quad (8),$$

$$f(\alpha) = \sum_i [\mu_i \cdot \ln \mu_i] / \ln r \quad (9).$$

Onde

$$\mu_i(q, r) = P_i^q(r) / \sum_i p_i^q(r) \quad (10),$$

$P_i^q(r)$  é a probabilidade de pixels na  $i$ -ésima caixa para o expoente  $q$ . Para um objeto multifractal o gráfico  $\alpha$  por  $f(\alpha)$  se ajusta a uma parábola com concavidade voltada para baixo.

## A análise estatística

Os grupos foram comparados pelas seguintes categorias, valores de lacunaridade nas 72 h e 96 h de incubação e de dimensões generalizadas nas 72 h e 96 h de incubação. Para os grupos de amostras que seguiram uma distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado o teste estatístico de ANOVA com post-hoc de Tukey. Para os grupos em que não seguiram a distribuição normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn. Tanto o teste de ANOVA quanto o de Kruskal-Wallis foi realizado ao nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ).

## Resultados

### Análise de lacunaridade

Nas 72 horas de incubação, os parâmetros de lacunaridade mostraram uma diferença significativa entre o grupo controle (ausência do CM) e grupo 2 (9 h/dia de exposição ao CM) pelo teste de ANOVA com teste post-hoc de Tukey ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nas 96 h de incubação. Na Tabela 1, pode-se observar que os valores médios da lacunaridade nas 72 h são maiores do que nas 96 h de incubação para um mesmo grupo. Isto indica que houve uma redução da distribuição de lacunas. Existindo uma relação inversa do parâmetro de lacunaridade com o preenchimento do espaço pelos vasos, em outras palavras, o aumento de densidade vascular indica um valor menor de lacunaridade. Os valores de lacunaridade evidenciam que o crescimento da vasculatura sanguínea da MSV está ocorrendo entre 72 e 96 h de incubação. Na Tabela 1 também é apresentada a variação média da lacunaridade entre 72 e 96 horas de incubação. Vários embriões morreram durante os experimentos, e, portanto, o valor do número de indivíduos (N) variou para os diferentes grupos.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos valores de lacunaridade da vasculatura da MSV nas 72 e 96 h de incubação

Grupos	N	72 horas de incubação	N	96 horas de incubação	Varição de Lacunaridade ( $10^{-5}$ /hora)
Controle	7	0,351±0,025	6	0,267±0,019	351±87,7
Grupo 1	7	0,431±0,086	5	0,320±0,105	398±241,3
Grupo 2	14	0,441±0,068*	8	0,297±0,040	596±296,5
Grupo 3	10	0,388±0,057	7	0,279±0,064	261±242,4
Grupo 4	15	0,426±0,052	13	0,276±0,034	616±246,3

Valor com asterisco é marcada diferença significativa entre o grupo exposto ao CM e o grupo controle

### Análise multifractal

Avaliação multifractal foi realizada utilizando os valores da dimensão generalizada  $D_q$  em função de  $q$  e o gráfico  $f(\alpha)$  em função de  $\alpha$  (espectro de singularidade). A Figura 2 revela o espectro de dimensões generalizadas que são os gráficos de  $D_q$  em função de  $q$ . O gráfico mostra as médias e os desvios padrão dos valores  $D_q$  relacionados com os seus respectivos valores  $q$  para todos os grupos nas 72 h (2A) e nas 96 h (2B) de incubação. Em ambos os gráficos da Figura 2 são mostrados uma curva sigmoide decrescente, caracterizando a rede vascular da MSV de codorna japonesa como um objeto multifractal.

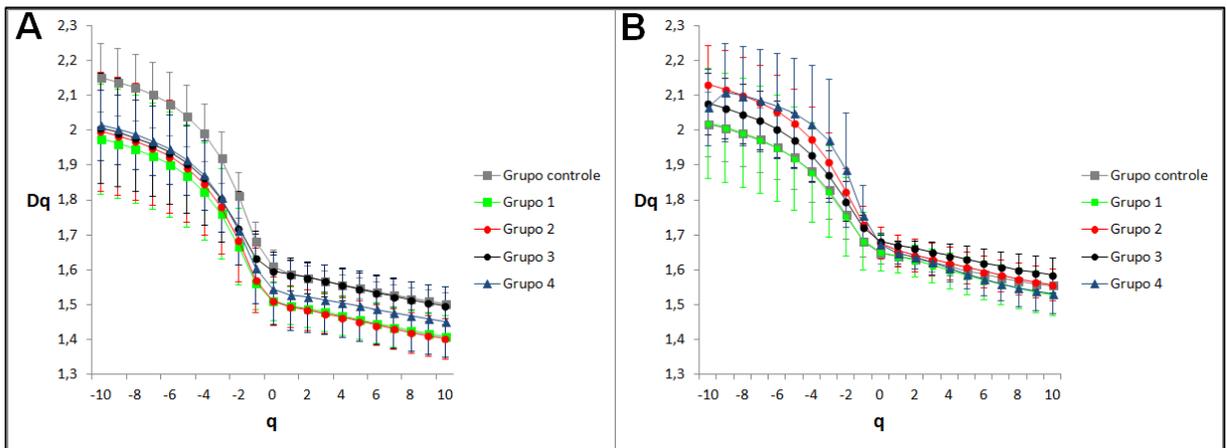


Figura 2. Dimensões generalizadas ( $D_q$  por  $q$ ). Figura A refere-se a todos os grupos, em 72 h de incubação. Figura B a todos os grupos em 96 h de incubação.

A Tabela 2 representa as médias e desvios padrão das dimensões generalizadas que tiveram diferenças significativas nas 72 h de incubação. Os grupos 1 e 2 apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo controle para os valores das dimensões generalizadas de  $D_{-1}$  a  $D_{+10}$  ( $p < 0,05$ ). Além disso, os grupos 1 e 2 foram estatisticamente diferentes do grupo 3, para os valores de  $D_0$  até  $D_{+10}$ . Os valores de  $D_1$  e  $D_2$  do grupo 3 foram significativamente diferentes do grupo 4. Já nas 96 h de incubação, os grupos não apresentaram diferenças significativas entre os valores de  $D_q$ .

Tabela 2. Dimensões generalizadas dos grupos experimentais e do grupo controle nas 72 h

Grupos	D <sub>-1</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>+1</sub>	D <sub>+2</sub>	D <sub>+3</sub>	D <sub>+4</sub>	D <sub>+5</sub>	D <sub>+6</sub>	D <sub>+7</sub>	D <sub>+8</sub>	D <sub>+9</sub>	D <sub>+10</sub>
Controle	1,68±0,06ab	1,61±0,05ab	1,59±0,04ab	1,58±0,03ab	1,57±0,03ab	1,56±0,03ab	1,55±0,03ab	1,54±0,03ab	1,53±0,03ab	1,52±0,03ab	1,51±0,03ab	1,50±0,03ab
Grupo 1	1,56±0,08a	1,51±0,05ac	1,50±0,05ac	1,49±0,05ac	1,48±0,05ac	1,47±0,05ac	1,46±0,06ac	1,47±0,06ac	1,43±0,06ac	1,42±0,06ac	1,42±0,06ac	1,41±0,06ac
Grupo 2	1,57±0,09b	1,51±0,07bd	1,49±0,06bd	1,48±0,06bd	1,47±0,06bd	1,46±0,06bd	1,45±0,06bd	1,44±0,06bd	1,43±0,06bd	1,42±0,06bd	1,41±0,06bd	1,40±0,06bd
Grupo 3	1,63±0,09	1,60±0,07cd	1,59±0,06cde	1,58±0,06cde	1,57±0,06cd	1,56±0,06cd	1,55±0,06cd	1,53±0,06cd	1,52±0,06cd	1,51±0,06cd	1,50±0,06cd	1,50±0,06cd
Grupo 4	1,63±0,08	1,60±0,05	1,59±0,05e	1,58±0,04e	1,57±0,04	1,56±0,05	1,55±0,05	1,53±0,05	1,52±0,05	1,51±0,05	1,50±0,05	1,50±0,05

Letras repetidas significam que existe diferença estatística significativa entre os grupos para cada valor de D<sub>q</sub>.

A Figura 3 mostra os gráficos de  $f(\alpha)$  em função de  $\alpha$ , que representa o espectro de singularidade. O gráfico 3A representa as médias e os desvios padrão de  $f(\alpha)$  relacionados com as médias e desvios padrão de  $\alpha$  para todos os grupos nas 72 horas de incubação. Enquanto a Figura 3B representa, do mesmo modo, o espectro  $f(\alpha)$  para todos os grupos nas 96h de incubação. Ambos os gráficos revelam que realmente a rede vascular sanguínea da MSV da codorna tem uma natureza multifractal, pois a curva formada pela relação de  $f(\alpha)$  com  $\alpha$  é uma parábola de concavidade voltada para baixo. Ambos os gráficos mostram que todos os pontos da curva para cada grupo estão próximos ou sobrepostos, o que significa que não houve diferenças de singularidade entre os grupos em ambos os tempos de incubação.

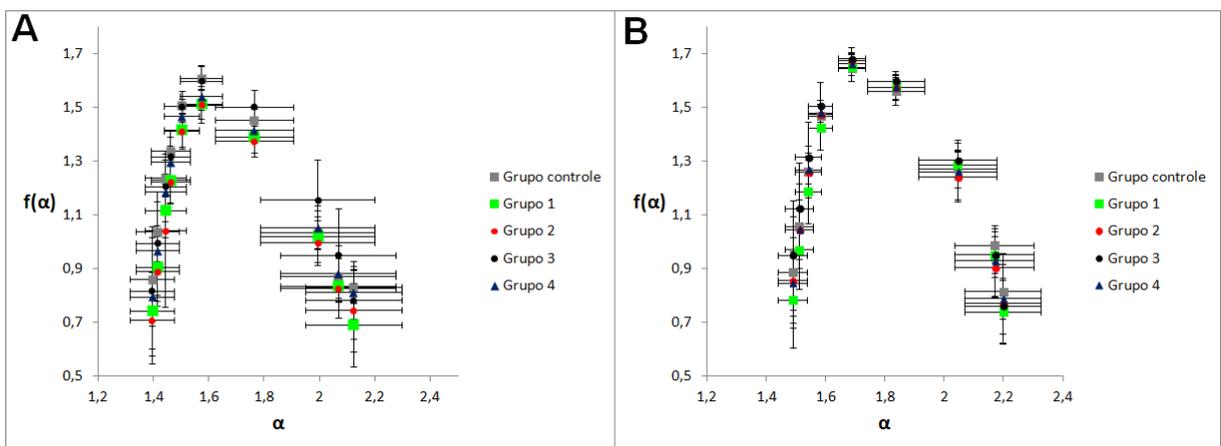


Figura 3. Gráficos do espectro  $f(\alpha)$  por  $\alpha$ . Figura A refere-se a todos os grupos em 72 h de incubação. Figura B representa todos os grupos em 96 h de incubação.

A Tabela 3 apresenta algumas médias e desvios padrão de  $D$ , onde  $D_0$ ,  $D_1$  e  $D_2$  podem ser usados para representar os valores das dimensões monofractais (dimensão da capacidade, de informação e de correlação, respectivamente). Os valores médios das dimensões fractais não diferiram significativamente nas

diferentes condições experimentais, para os diferentes valores de dimensão generalizada.

Tabela 3. Média e desvio padrão das dimensões generalizadas de grupos experimentais e controle em 96 h

Grupos	D <sub>-10</sub>	D <sub>-5</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>+1</sub>	D <sub>+2</sub>	D <sub>+5</sub>	D <sub>+10</sub>
Controle	2,02±0,09	1,92±0,09	1,65±0,03	1,64±0,03	1,63±0,03	1,60±0,03	1,55±0,03
Grupo 1	2,02±0,16	1,92±0,15	1,65±0,05	1,64±0,04	1,63±0,05	1,58±0,05	1,53±0,06
Grupo 2	2,13±0,11	2,02±0,10	1,68±0,05	1,65±0,05	1,64±0,05	1,61±0,05	1,56±0,05
Grupo 3	2,08±0,09	1,97±0,08	1,68±0,02	1,67±0,01	1,66±0,02	1,63±0,04	1,58±0,05
Grupo 4	2,07±0,11	2,05±0,16	1,67±0,03	1,65±0,03	1,64±0,03	1,57±0,05	1,53±0,05

## Discussão

A MSV tem sido um modelo experimental usado para estudar a vasculogênese e angiogênese. No estudo anterior realizado por nosso grupo (Costa et al. 2013), as dimensões fractais (dimensão de contagem por caixas e de informação) identificaram uma inibição no processo de formação de vasos sanguíneos induzidos pela aplicação de 6 e 9 h/dia de CM de 1 mT com 60 Hz entre as 48 h e 96 h de incubação. Ainda com relação ao referido estudo, a exposição do CM durante 3, 12 e 24 h/dia na vasculatura da MSV não promoveu mudanças significativas, sugerindo um possível efeito janela em relação ao tempo de exposição (Costa et al. , 2013).

O método de lacunaridade pode ser considerado como uma análise complementar de dimensão fractal, porque oferece a informação da organização do objeto fractal no espaço. Este método mensura um objeto fractal através da distribuição de buracos ou lacunas encontradas num objeto (Zaia et al., 2006). O maior valor de lacunaridade significa maior presença de lacunas e menor quantidade de vasos (Gould et al., 2011). Este método tem sido utilizado para parametrizar a vasculatura da retina (Gould et al., 2011), bem como para diagnosticar os distúrbios vasculares da retina (Landini et al., 1995; Talu et al., 2012). Neste trabalho, este parâmetro revelou uma diferença significativa entre o grupo controle e o grupo com 9

h/dia de exposição ao CM nas 72 h de incubação, confirmando o resultado mostrado através de análise da dimensão fractal por Costa et al. (2013). Para este grupo de 9 h/dia de exposição ao CM, os valores de lacunaridade foram maiores entre todos os grupos nas 72 h (Tabela 1), o que significa que a sua densidade vascular diminuiu. Na Tabela 1, também é observado que houve uma redução dos valores de lacunaridade nas 96 h em relação a 72 h, o que significa que as redes vasculares extraembrionárias cresceram neste período.

Com relação à análise multifractal, pode ser observado nas Figuras 2 e 3 que a rede vascular da MSV é uma estrutura multifractal. Um objeto multifractal possui diferentes regiões com diferentes propriedades fractais (Stanley; Meakin, 1988). Também o objeto multifractal pode ser descrito como um conjunto de monofractais entrelaçados um dentro do outro (Stösić; Stösić, 2006). Quando  $q$  varia de  $-10$  a  $+10$ ,  $D_q$  assume diferentes valores decrescentes para vasculatura da MSV. Para um objeto monofractal, a variável  $D_q$  é constante quando o expoente  $q$  varia.

Contudo, era esperado que a vasculatura da MSV fosse um objeto multifractal, devido possuir uma geometria semelhante à vascularização da retina, na qual foi mostrado seguir um comportamento multifractal. Encontramos através das dimensões generalizadas os mesmos resultados alcançados por dimensões de contagem por caixas e de informação. No entanto, a dimensão de contagem por caixa e de informação não identificaram diferença significativa entre o grupo exposto durante 12 h/dia e 24 h.

Estudos têm relatado os efeitos inibitórios sobre angiogênese promovidos pela ação do CM estático com diferentes intensidades e tempos de aplicação na rede vascular da membrana corioalantóide de embriões de galinha, que é um modelo animal similar a MSV de codornas (Ruggiero et al., 2004; Wang et al., 2009; Balanezhad et al., 2010). Biomoléculas, componentes celulares e vários tipos de células, provavelmente, têm diferentes níveis de sensibilidade à ação do CM. Esta sensibilidade pode se tornar mais específica para a intensidade, frequência e tempo de exposição ao CM. Foi sugerida a ocorrência de um efeito janela com base em nossos dados, no qual o tempo de exposição variou, mas a intensidade e a frequência do CM permaneceram constantes. Há um limite para o tempo de exposição ao CM-FEB no qual ele não promoveu efeito sobre a vascularização da MSV quando aplicado acima de 9 h diariamente.

Pode-se constatar algumas hipóteses da atuação do CM sobre a rede vascular sanguínea. A sobrevivência, proliferação, motilidade e diferenciação das células endoteliais são etapas da angiogênese (Ding et al., 2006) que dependem da dinâmica do cálcio citosólico (Munaron, 2006). O efeito dependente do tempo de exposição pode estar relacionado à ação do CM- FEB sobre o fluxo de entrada do cálcio através de canais (Grassi et al., 2004; Morabito et al., 2010), bem como sobre o cálcio liberado do retículo endoplasmático (Ikehara et al., 2010), ambos envolvidos com a regulação da formação de vasos. Talvez o campo elétrico induzido nas células vasculares através da ação do CM-FEB (1 mT e 60 Hz) pode alterar o potencial de membrana. Este potencial modula algumas vias de entrada do cálcio, tais como o canal mediado por receptores acoplados ao segundo mensageiro, canais dependente do gradiente electroquímico do cálcio e trocadores sódio-cálcio (Adams et al., 1989).

No entanto, outras formas podem ser consideradas, uma vez que a concentração citoplasmática de cálcio também é controlada por fator de crescimento (Villereal; Byron, 1992), como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Bates, Harper, 2003). O VEGF promove reações celulares importantes que regulam a vasculogênese e a angiogênese (Risau, 1997; Drake et al., 2000; Liang et al., 2001; Fearnley et al., 2013). O CM-FEB é capaz de provocar um aumento na fosforilação e expressão do receptor para VEGF-2 em CEVUH (Delle Monache et al., 2008). Além disso, o CM pode atuar sobre moléculas, tais como a prostaglandina-E1 que atua na transcrição do VEGF e de outros genes de fatores envolvidos na angiogênese (Ruggiero et al., 2004). No entanto, Martino et al. (2010) verificaram que CM estático fraco (60 e 120 mT) não teve qualquer efeito na expressão do gene VEGF; porém houve uma influência na proliferação dos CEVUH's, sugerindo que o CM pode estar envolvido com outros mecanismos moleculares relacionados à angiogênese. Li et al., (2007) observaram que o CM estático com uma intensidade de 10 mT induziu apoptose e necrose de CEVUH's e a expressão aumentada de VCAM -1 (molécula de adesão vascular-1) e da ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) que estão relacionadas com a inflamação do endotélio.

## Conclusão

O parâmetro de lacunaridade e o de multifractalidade revelaram que a ação de campo magnético de intensidade de 1 mT e com uma frequência de 60 Hz sobre a rede vascular sanguínea da membrana do saco vitelínico de embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) promoveu uma inibição do crescimento vascular entre 48 e 72 h de incubação para exposições de 6 h/dia e 9 h/dia. Exposições superiores a 9 h (12 h e 24 h) por dia não causaram efeitos sobre a rede vascular da MSV. Além disso, neste trabalho, foi mostrado que a rede vascular extraembrionária da codorna é uma estrutura multifractal, sendo caracterizado pelo comportamento das curvas dos gráficos de dimensões generalizadas ( $D_q$  em função de  $q$ ) e do espectro singularidade ( $f(\alpha)$  em função de  $\alpha$ ), independentemente do tempo de exposição ao campo magnético.

## Agradecimento

Agradecimento a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco).

## Referência bibliográfica

Adams, D.J., Barakeh, J., Laskey, R., Van Breemen, C., 1989. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 3, 2389 - 2400.

Avakian, A., Kalina, R.E., Sage, E.H., Rambhia, A.H., Elliott, K.E., Chuang, E.L., Clark, J.I., Hwang J.N., Parsons-Wingenter, P., 2002. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Curr. Eye Res.* 24, 274–280.

Balanezhad, S.Z., Parivar, K., Baharara, J., Kouchesfehiani, H.M., Ashraf, A., 2010. The effect of extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis. *Res. J. Environ. Sci.* 4, 300-304.

- Bassett, C.A.L., 1993. Effects of electromagnetic fields. *J. Cell Biochem.* 51, 387-393.
- Bassingthwaite, J.B., Liebovitch, L.S., WEST, B.J., 1994. *Fractal physiology.* Oxford University Press. New York.
- Bates, O., Harper, S.J., 2003. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vasc. Pharmacol.* 39, 225– 237.
- Bekhite, M.M., Finkensieper, A., Abou-Zaid, F.A., El-Shbagy, I.K., Omar, K.M., Figulla, H-R., Sauer, H., Wartenberg, M., 2010. Static electromagnetic fields induce vasculogenesis and chondro-osteogenesis of mouse embryonic stem cells by reactive oxygen species-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Stem Cells Dev.* 19, 731-743.
- Boscolo, E., Bischoff, J., 2009. Vasculogenesis in Infantile Hemangioma. *Angiogenesis.* 12, 197–207.
- Cameron, I. L., Short, N. J., Markov, M.S., 2007. Safe alternative cancer therapy using electromagnetic fields. *Environmentalist.* 27, 453–456.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.
- Cheung, N., Donaghue, K.C., Liew, G., Rogers, S.I., Wang, J.j., Lim, S.W., Jenkins, A.j., Hsu, W., Lee, M.L., Wong, T.Y., 2009. Quantitative assessment of early diabetic retinopathy using fractal analysis. *Diabetes Care.* 32, 106-110.
- Costa, E.V.L., Jimenez, G.C., , Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A., 2013. Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 34,114 -121.
- Delle Monache, S., Alessandro, R., Iorio, R., Gualtieri, G., Colonna, R., 2008. Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells. *Bioelectromagnetics.* 29, 640-648.
- Ding, Z.; Lambrechts, A.; Parepally, M.; Roy, P., 2006. Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. *J. Cell Sci.* 119, 4127-4137.
- Drake, C.J., LaRue, A., Ferrara, N., Little, C.D., 2000. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev. Biol.* 224, 178–188.
- Fearnley, G.W., Smith, G.A., Harrison, M.A., Wheatcroft, S.B., Tomlinson, D.C., Ponnambalam, S., 2013. Vascular endothelial growth factor-A regulation of blood vessel sprouting in health and disease. *OA Biochemistry* 1,1-5.

Folkman, J., 1989. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 4-6.

Folkman, J., 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature.* 6, 273-286.

Gould, D.J., Vadakkan, T.J., Poché, R.A., Dickinson, M.E., 2011. Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. *Microcirculation.*18, 136–151.

Grassi, C., D'Ascenzo, M., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., Azzena, G.B., 2004. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell. Calcium.* 35, 307-315.

Ikehara, T., Nishisako, H., Minami, Y., Ichinose (Sasaki), H., Shiraishi, T., Kitamura, M., Shono, M., Houchi, H., Kawazoe, K., Minakuchi, K., Yoshizaki, K., Kinouchi, Y., Miyamoto, H., 2010. Effects of exposure to a time-varying 1.5 T magnetic field on neurotransmitter-activated increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in relation to actin fiber and mitochondrial functions in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 1221-1230.

Ishida, M., Fujioka, M., Takahashi, K.A., Arai, Y., Kubo, T. 2008. Electromagnetic fields a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466, 1068–1073.

Kirchner, L. M., Schmidt, S.P., Gruber, B.S.,1996. Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. *Microvasc. Res.* 54,2 - 14.

Kunicki, A.C.B., Oliveira, A.J., Mendonça, M.B.M., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A., 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 930-934.

Landini, G., Murray, P.I., Misson, G.P. 1995. Local connected fractal dimensions and lacunarity analyses of 60° fluorescein angiograms. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 2749-2755.

Li, F., Xu, K-W., Wang, H-C., Guo, W-Y., Han, Y., Liu, B., Zhang, R-Q., 2007. Effects of static magnetic field on human umbilical vessel endothelial cell. *J. Med. Coll. PLA.* 22, 106-110.

Liang, D., Chang, J.R., Chin, A.J., Smith, A., Kelly, C., Weinberg, E. S., Ge, R., 2001. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mech. Dev.* 108, 29–43.

Liu, J.T., Chen, Y.L., Chen, W.C., Chen, H.Y. Lin, Y.W., Wang, S.H., Man, K.M ., Wan, H.M., Yin, W.H., Liu, P.L., Chen, Y.H., 2012. Role of pigment epithelium-

derived factor in stem/progenitor cell-associated neovascularization. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 1-10.

Mandelbrot, B.B. 1983. *The fractal geometry of nature.* Freeman. New York.

Martino, C.F., Perea, H., Hopfner, U., Ferguson, V.L., Wintermantel, E., 2010. Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells. *Bioelectromagnetics.* 31, 296-301.

McKay, J.C., Prato, F.S., Thomas, A.W., 2007. A Literature Review: The effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetics.* 28, 81-98.

Mckay, T.L., Gedeon, D.J., Vickerman, M.B., Hylton, A.G., Ribita, D., Olar, H.H., Kaiser, P.K., Parsons-Wingenter, P., 2008. Selective inhibition of angiogenesis in small blood vessels and decrease in vessel diameter throughout the vascular tree by triamcinolone acetonide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 1184-1190.

Morabito, C., Rovetta, F., Bizzarri, M., Mazzoleni, G., Fanò, G., Marigliò, M.A., 2010. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 579-589.

Munaron, L. 2006. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Rec. Pat. Anti-Cancer Drug. Discov.* 1, 105-119.

Parsons-Wingenter, P., Chandrasekharan, U.M., McKay, T.L., Radhakrishnan, K., DiCorleto, P.E., Albarran, B., Farr, A.G. , 2006. A VEGF<sub>165</sub>-induced phenotypic switch from increased vessel density to increased vessel diameter and increased endothelial NOS activity. *Microvasc. Res.* 72, 91-100.

Risau, W. , 1997. Mechanism of angiogenesis. *Nature.* 386, 671-674.

Roland, D., Ferder, M., Kothuru, R., Faierman, T., Strauch, B., 1999. Effects of pulsed magnetic energy on a microsurgically transferred vessels. *Plast. Reconstr. Surg.* 105, 1371-1374.

Ruggiero, M., Bottaro, D.P., Liguri, G., Gulisano, M., Peruzzi, B., Pacini, S., 2004. 0.2 T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics.* 25, 390-396.

Stanley H.E., Meakin P., 1988. Multifractal phenomena in physics and chemistry. *Nature.* 335,405-409.

Stošić T., Stošić B.D. 2006. Multifractal analysis of human retinal vessels. *IEEE trans med. imaging.* 25, 1101-1107.

Țălu, Ș., Vlăduțiu, C., Popescu, L.A., Lupașcu, C.A., Vesa, Ș.C., Țălu, S.D., 2012. Fractal and lacunarity analysis of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes. *HVM Bioflux.* 5, 45-51.

Taverna, G., Colombo, P., Grizzi, F., Franceschini, B., Ceva-Grimaldi, G., Seveso, M., Giusti, G., Piccinelli, A., Graziotti, P., 2009. Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. *Pathol. Res. Pract.* 205, 438–444.

Tepper, O.M., Callaghan, M.J., Chang, E.I., Galiano, R.D., Bhatt, R.D., Baharestani, S., Gan, J., Simon, B., Hopper, R.A., Levine, J.P., Gurtner, G.C., 2004. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J.* 18, 1231–1233.

Villereal, M.L., Byron K. L., 1992. Calcium signals in growth factor signal transduction. *Ver. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 119, 67-121.

Výboh, P., Zeman, M., Bilčík, B., Šárniková, B., Košťál L., 2010. Angiogenic effect of leptin in the quail chorioallantoic membrane. *Acta. Vet. Brno.* 79, 13-17.

Wang, Z., Yang, P., Xu, H., Qian, A., Hu, L., Shang, P., 2009. Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis. *Bioelectromagnetics.* 30, 446-53.

Zaia, A., Eleonori, R., Maponi, P., Rossi, R., Murri, R., 2006. MR imaging and osteoporosis: fractal lacunarity analysis of trabecular bone. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.* 10,484-489.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação aos trabalhos realizados nesta tese algumas observações podem ser feitas.

Primeiramente, vários grupos de pesquisa têm mostrado que a dimensão de contagem por caixas, a dimensão de informação, a análise multifractal e o parâmetro de lacunaridade são métodos promissores na identificação de anormalidades da rede vascular retiniana. No primeiro trabalho desta tese (segundo capítulo), chegou à conclusão, pelos métodos empregados, que não houve diferença marcante entre a arquitetura da rede vascular retiniana de um paciente diabético portador e não portador da leve retinopatia diabética precoce.

As imagens utilizadas no primeiro trabalho foram adquiridas a partir de um banco de dados (DRIVE - Digital Retinal Images for Vessels Extraction), assim não havendo possibilidade de manipulação. A manipulação da captação permite melhoria na qualidade da imagem que reflete em sua segmentação, este é um fator preponderante na obtenção das dimensões fractais, do parâmetro de lacunaridade e na análise de multifractalidade. A idade dos pacientes que participaram deste estudo também é um fator que provavelmente teve influência.

As dimensões generalizadas e o espectro de singularidade caracterizaram as consideradas regiões da rede vascular retiniana humana e a rede vascular da membrana do saco vitelínico de embrião de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) como estruturas multifractais. Estes métodos são mais apropriados na análise destas duas estruturas em relação aos métodos de obtenção de uma única dimensão fractal (monofractal).

Os resultados obtidos e discutidos no segundo trabalho (terceiro capítulo) consolidam os métodos como descritores morfométricos. Assim os métodos fractais (métodos monofractais e multifractais) e o parâmetro de lacunaridade possuem capacidade de identificar alterações numa imagem da rede vascular sanguínea. Assim os referidos métodos podem auxiliar no diagnóstico de enfermidades e disfunções vasculares, bem como mensurar as alterações na arquitetura vascular promovidas por agentes químicos e físicos.

## APÊNDICES

### APÊNDICE I

#### **Fractal, multifractal and lacunarity analysis in the vascularization of different retinal regions with and without non-proliferative diabetic retinopathy**

Edbhergue Ventura Lola Costa <sup>1,2</sup>, Romildo de Albuquerque Nogueira <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Theoretical, Experimental and Computational Biophysics, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author: R.A. Nogueira. Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil, phone: (+55) 81-3320 6395. Email: [ran.pe@terra.com.br](mailto:ran.pe@terra.com.br)

## **Abstract**

The early stage of diabetic retinopathy is termed as non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR), characterized by microaneurysms, hemorrhages and capillary closure. The aim of this study was to evaluate the blood vascular network of the retina and its regions in diabetic patients with and without signs of mild early diabetic retinopathy by using fractal methods and a number of bifurcation points. We used 33 segmented images of retinographies, 28 corresponding to the retinographies that did not show any sign of diabetic retinopathy and 5 diagnosed with NPDR. The segmented images were obtained from the DRIVE (Digital Retinal Images for Vessel Extraction) database. The segmented images of retinal blood vessels were skeletonized from software Matlab® version 7.8, and then fractionated into nine equal regions by software Adobe Image Ready 7.0.1. Later, the skeletonized images of the retinal vessels and their respective regions, with and without signs of NPDR, were assessed by using the following methods: number of bifurcation points, box-counting dimension, information dimension, lacunarity parameter and multifractal analysis. The retinas and their regions of control group were statistically compared to those of the NPDR by using the Z-test and the Mann-Whitney test accordingly. Neither the fractal method nor the number of bifurcation points disclosed statistically significant differences ( $p > 0.05$ ). Nevertheless, the multifractal analysis showed which skeletonized images of retinal vessels and its nine regions followed the multifractal behavior. It can be stated that there is no difference between the retinal vascular network in diabetic patients with or without NPDR.

**Keyword:** non-proliferative diabetic retinopathy; vascular network; fractal; multifractal; lacunarity.

## 1. Introduction

Among the ophthalmopathies, the diabetic retinopathy is one of the causes of vision impairment and blindness [Antonetti et al., 2006]. This secondary microvascular complication of diabetes mellitus occurs due to the hyperglycemia that promotes structural and functional alteration of retinal capillaries [Crawford et al., 2009]. The early stage of retinopathy is termed as non-proliferative diabetic retinopathy, a disease characterized by microaneurysms, hemorrhages and capillary closure [Crawford et al., 2009; Chen; Shah, 2011]. The proliferative phase can be characterized by neovascularization, increasing of ischemic regions, hemorrhage in the vitreous cavity and tractional retinal detachment [Crawford et al., 2009; Tremolada et al., 2012].

The retinal vascular network is known as a fractal structure, since the vascular branching process presents self-similarity and scaling. A fractal object or process is characterized by the following properties: (1) self-similarity, which means that parts of an object or process resemble the whole object or process; (2) scaling, which means that measurements depend on the scale used to take them; (3) fractal dimension, which provides a quantitative description of the self-similarity and scaling, and (4) anomalous statistical properties of the fractal processes [Mandelbrot, 1991; Bassingthwaight et al. 1994]. Several works have used the fractal geometry to study the retinal vascular network [Family et al., 1989; Che Azemin et al., 2011]. Doubal et al. [2010] have related the fractal dimension of retinal vessels to the lacunar stroke and Cavallari et al. [2011] to the cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). Avakian et al. [2002] and Kunicki et al. [2009] have used fractal methods to identify non-proliferative diabetic retinopathy; however, both obtained contradictory results.

Since the fractal dimension describes how much space is filled, but does not indicate how the space is filled by the fractal structure, the lacunarity can solve this problem by

making a distinction between different objects with the same fractal dimension [Mandelbrot, 1983; Gould et al., 2011]. The lacunarity is a parameter that indicates the distribution of gap sizes throughout the object embedded in an image, being able to identify different fractal structures that have the same fractal dimension [Mandelbrot, 1983]. This parameter has been used as a tool in the characterization of retinal vascular network. Landini et al. [1995] have employed the lacunarity to identify the occlusion of the artery and retinal vein, whereas Tălu et al. [2012] have used it to diagnose amblyopic eyes.

Some studies have currently characterized some objects as multifractal structures (objects that have different fractal dimensions) instead of monofractal, as regarded in the previously mentioned studies. An object is considered multifractal when its different regions have different fractal properties [Stanley; Meakin, 1988]. Researchers have demonstrated the network of vessels of the retina as a multifractal object, a fact which has been proved through generalized dimensions and singularity spectrum [Stösić; Stösić, 2006; Gould et al., 2011]. Furthermore, the singularity spectrum has the capacity to evidence the disorders in the retinal vascular architecture with diseases [Stösić; Stösić, 2006].

The aim of this study was to assess the network of blood vessels of the retina and its regions with and without signs of mild early diabetic retinopathy by using the number of bifurcation points and fractal methods, such as box-counting dimension, information dimension, lacunarity parameter (complementary tool of fractal methods) and multifractal analysis: generalized dimensions and singularity spectrum.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Retinal images**

The images were obtained from the DRIVE (Digital Retinal Images for Vessel Extraction) database [<http://www.isi.uu.nl/Research/Databases/DRIVE/>]. We used 28

retinographies which do not show any sign of diabetic retinopathy (Figure 1A) and 5 diagnosed with mild early diabetic retinopathy, non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) (Figure 1B). The images were acquired from diabetic patients between 25-90 years of age, by using a Canon CR5 non-mydratic 3CCD camera with a 45 degree field of view (FOV). Each image was captured by using 8 bits per color plane at 768 by 584 pixels. The FOV of each image is circular with a diameter of approximately 540 pixels and each image has been JPEG compressed.

## 2.2 Skeletonization and separation by region

The manually segmented images of retinal vessels (Figure 1C) were also obtained from DRIVE. The segmented images of vessels were skeletonized by software Matlab® version 7.8 (MathWorks, Natick, Ma, U.S.A), obtaining images of 565x586 pixels. Each image was fractionated into nine equal regions (Figure 1D) by software Adobe Image Ready 7.0.1. Figure 1 shows the retina in gray scale, segmented, skeletonized and divided by region (nasal superior, optic disc, nasal inferior, superior, macular, inferior, superotemporal, temporal and inferotemporal).

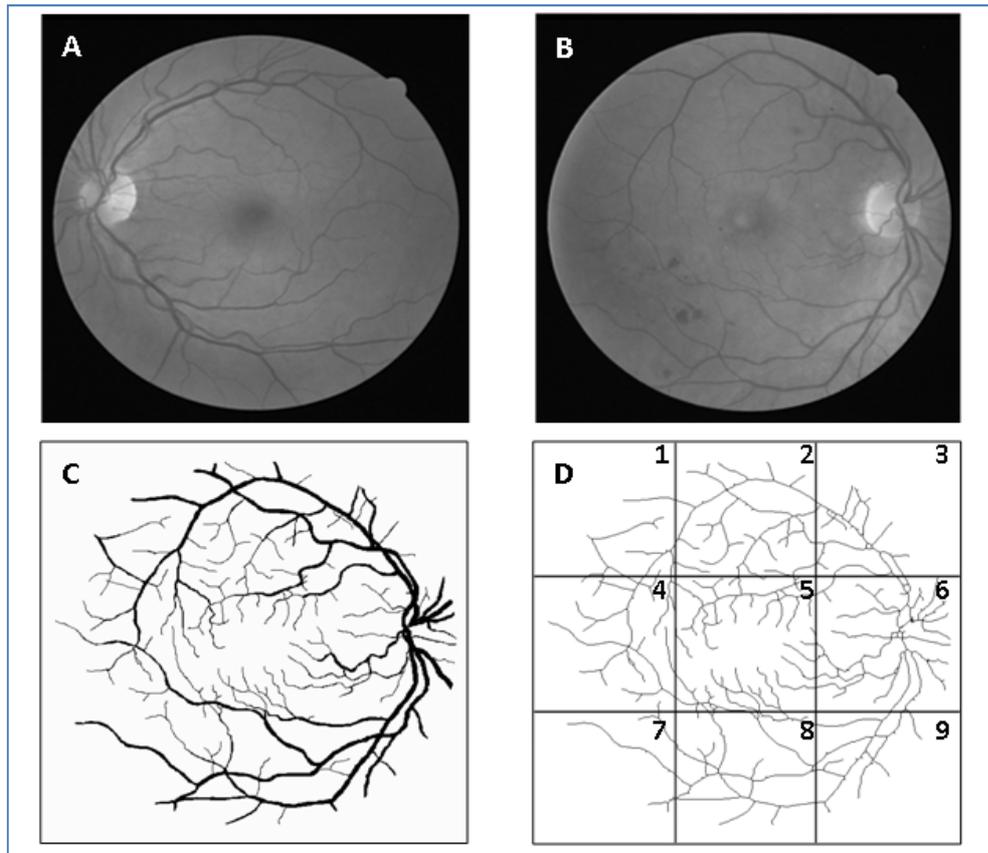


Figure 1- Image of normal retina (A), image with signs of mild early diabetic retinopathy (B), segmented image B (C) and same skeletonized image divided into 9 regions: 1 - superotemporal, 2 - superior, 3 - nasal superior, 4 - temporal, 5 - macular, 6 - optic disc, 7 - inferotemporal, 8 - inferior and 9 - nasal inferior.

### 2.3 Counting of bifurcation points

The bifurcation point is where a blood vessel originates other vessels. The number of bifurcation points is a method that informs about the amount of branching, showing the vascular multiplication. The procedure proposed here is an optional method to measure the blood vascularization degree as another morphometric parameter to evaluate the vascular architecture (density, length, diameter of vessels). The bifurcation points were determined from skeletonized images of the retinas and their respective regions for both groups. The identification process was confirmed in the original retinographies to reduce the possibility of quantifying artifacts or overlapping of vessels.

## 2.4 Fractal Dimension Methods

Two methods were used to calculate the fractal dimension of retinal blood vessels, the box-counting dimension ( $D_{bc}$ ) and the information dimension ( $D_{inf}$ ) by software Benoit 1.3 Fractal Analysis System (Trusoft, St. Petersburg, FL, USA). For the box-counting dimension ( $D_{bc}$ ), the skeletonized image is covered with a number of boxes ( $N(r)$ ) containing at least one pixel of the image. The procedure is repeated with boxes of different sizes and plotted in a double log graph of  $N(r)$  in relation to the sides of boxes  $r$  [Costa et al., 2013]. The slope of this relationship with inverted signal is the box-counting dimension:

$$D_{bc} = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[ \frac{\log N(r + \varepsilon) - \log N(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right] \quad (1),$$

in which  $\varepsilon$  is an infinitesimal variation in the box sizes. The calculations of  $D_{bc}$  used 19 sets of different size boxes, the length of the largest box side being 270 pixels and the reduction coefficient of the box size 1.3.

In the information dimension ( $D_{inf}$ ), skeletonized images were also covered by boxes, but taking into account the relative probability of occupancy of the elementary boxes used to cover the fractal object:

$$D_{inf} = -\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[ \frac{S(r + \varepsilon) - S(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right] \quad (2),$$

where

$$S(r) = \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(r)} m_i \log(m_i) \quad (3),$$

is called the Kolmogorov entropy.  $N$  is the number of boxes,  $m_i = M_i / M$ , and  $M_i$  is the number of pixels in the  $n^{\text{th}}$  box,  $M$  is the total number of pixels on the fractal object,  $r$  is the side of boxes and  $\epsilon$  is a infinitesimal variation in box sizes [Costa et al., 2013]. The calculations of  $D_{\text{inf}}$  used 8 sets of different size boxes, the length of the largest box side being 270 pixels and the reduction coefficient of box size 2.0.

Figure 2 shows the box-counting dimension (Figure 2A) and information dimension (Figure 2B).

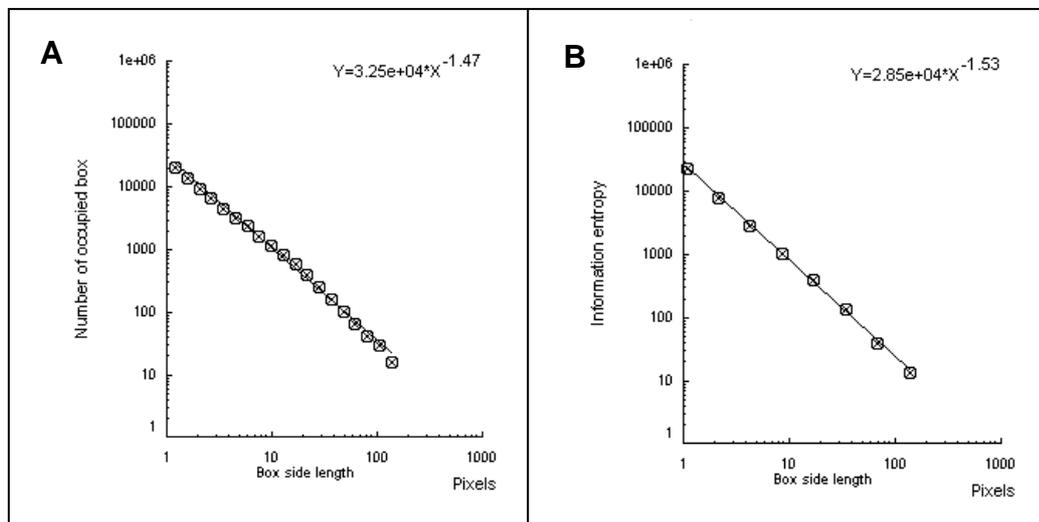


Figure 2. The box-counting dimension is the slope with inverted signal obtained by the number of occupied boxes according to the size of the sides of the boxes (A). The information dimension is the slope with inverted signal obtained by information entropy (Kolmogorov entropy) according to the size of the sides of the boxes (B).

## 2.5 Lacunarity parameter

To evaluate the lacunarity parameter of the images of the retinal vessels, we used software Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, USA) with plug-in FracLac (A. Karperien – Charles Sturt University, Australia). Lacunarity is obtained by measuring the gap dispersion inside an image; in other words, it is related to the pixel distribution of an object in an image. The quantification is achieved as in the box-

counting method. In this case, however, different directions to the set of boxes (g) are also used.

The mean value to the lacunarity is calculated as follows:

$$\Lambda = \left[ \sum_g \sum_i (1 + (\sigma|\mu)^2) \right] / n \quad (4).$$

where  $\sigma$  is the standard deviation and  $\mu$  is the mean of pixels per box at a size  $r$ , in a box-counting at a direction  $g$ ,  $n$  being the number of box sizes. The sum is done over all values of  $r$  and  $g$ .

## 2.6 Multifractal analysis

Software Image J with plug-in FracLac was also used to calculate the multifractality of retinal vasclarization. The multifractal structure is characterized by obtaining the generalized dimension  $D_q$ , which is related to a value of  $q$ . Variable  $q$  is the exponent that expresses the fractal properties in different scales to an object, ranging between  $-\infty$  and  $+\infty$ . The plot of  $D_q$  versus  $q$  is generally sigmoidal and decreasing to a multifractal structure. Some studies consider determined values  $D_q$ , that is  $D_0$ ,  $D_1$  and  $D_2$ , which depict the multifractality of an object when condition  $D_0 \geq D_1 \geq D_2$  is satisfied. Values  $D_q$  depict the multifractal object that can be compared by the single fractal dimension method, so  $D_0$  can be considered as capacity dimension,  $D_1$  can be related to information dimension and  $D_2$  to correlation dimension [Stösić; Stösić, 2006]. In our study, values were generated from  $D_{-10}$  to  $D_{+10}$ , in other words,  $q$  values ranged between  $-10$  and  $+10$ , where all dimensions were statistically tested.  $D_q$  is calculated as follows:

$$D_q = \tau(q)/(q - 1) \quad (5).$$

$\tau$  can be defined as:

$$\tau(q) = \lim_{r \rightarrow 0} \left[ \ln \left( \sum_i P_i(r)^q \right) \right] / \ln(1/r) \quad (6),$$

where  $P_i(r) = \frac{M_i}{M_0}$  is density,  $M_i$  is the number of pixels within the  $i^{\text{th}}$  box and  $M_0$  is the number of pixels for all image.  $\sum P_i$  is the density for all boxes (i) at a determined scale  $r$ .

Another way to calculate the multifractal spectra is through the relationship between parameters  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$ , where

$$N(\alpha) = r^{-f(\alpha)} \quad (7),$$

$N(\alpha)$  is the number of boxes for which probability  $P_i(r)$  of finding a pixel within a given region  $i$  scales as

$$P_i = r^{\alpha_i} \quad (8),$$

$f(\alpha)$  is the fractal dimension to the all regions with singularity strengths between  $\alpha$  and  $\alpha + d\alpha$ , where  $\alpha$  takes on values between  $-\infty$  and  $+\infty$ .

These variables are obtained by Legendre transformation from  $\tau$  into  $q$ , as described below:

$$\alpha(q) = d\tau(q)/dq \quad (9)$$

and

$$f(\alpha(q)) = q\alpha(q) - \tau(q) \quad (10),$$

Also,  $\alpha$  and  $f(\alpha(q))$  can be calculated by using the following equations:

$$\alpha = \sum_i [\mu_i \cdot \ln P_i] / \ln r \quad (11)$$

and

$$f(\alpha) = \sum_i [\mu_i \cdot \ln \mu_i] / \ln r \quad (12),$$

where

$$\mu_i(q, r) = P_i^q(r) / \sum_i p_i^q(r) \quad (13)$$

$P_i^q(r)$  is the probability of pixels in the  $i^{\text{th}}$  box to exponent  $q$ . For a multifractal object, plot  $\alpha$  versus  $f(\alpha)$  fits a parabola with concavity turned down.

From values  $\alpha$ , it is possible to calculate the extension of singularity length  $\Delta\alpha$  and the curve asymmetry of singularity spectrum. Extension of singularity length  $\Delta\alpha$  is defined as follows:

$$\Delta\alpha = \alpha_{\max} - \alpha_{\min} \quad (14),$$

$\alpha_{\max}$  (highest value of  $\alpha$ ) and  $\alpha_{\min}$  (lowest value of  $\alpha$ ) indicate the fluctuation of minimum and maximum probability of pixels, respectively. The higher the  $\Delta\alpha$ , the larger the probability distribution; furthermore, the multifractality is stronger and the pixel distribution of image is more complex [Shi et al., 2009; Hu et al., 2009].

The curve asymmetry of singularity spectrum (A) is calculated according to the following expression:

$$A = \frac{\alpha_0 - \alpha_{\min}}{\alpha_{\max} - \alpha_0} \quad (15).$$

The curve of singularity spectrum is symmetric to  $A=1$ , the curve is left-skewed if  $A>1$  and is right-skewed if  $A<1$ . When the spectrum is left-skewed, it means that there is stronger

presence of high fractal exponents and significant fluctuation; otherwise, it indicates the domain of low exponents and slight fluctuation [Hu et al., 2009].

## 2.7 Statistic analysis

The Shapiro-Wilk's test was used to calculate the number of bifurcations, fractal dimensions, lacunarity parameters, generalized dimensions,  $\Delta\alpha$  and parameter A (curve asymmetry of the singularity spectrum). The Shapiro-Wilk's test was used to choose between a parametric test or nonparametric, aiming at making a comparison between the different regions and the whole retina with and without NPDR within the two groups. The Z-test was used when the group had a normal distribution and the Mann-Whitney test to a non-normal distribution.

## 3. Results

### 3.1 Number of bifurcation points

Table 1 shows the number of bifurcation points, in which  $p$  is the value of the significance level to the Z-test or the Mann-Whitney test (with asterisks). For regions such as optic disc, nasal inferior and temporal in which the control group did not present a normal distribution, the Mann-Whitney test (nonparametric test) was used. For other regions and the whole retina in which the control group presented normal distribution, the Z-test was used. The statistical tests did not show any difference in the bifurcation points between the control group and the NPDR group ( $p>0.05$ ).

Table 1. Number of bifurcation points of all regions and whole retina of control group and NPDR

Retinal region	Control	NPDR	p-value
Whole	103.4±22.6	91.4±13.0	0.297
Nasal superior	5.89±1.83	7.40±2.70	0.794
Optic disc	17.60±4.48	17.6±5.41	0.723*
Nasal inferior	5.53±1.91	4.80±2.16	0.540*
Superior	15.6±5.51	15.0±3.16	0.456
Macular	17.8±6.53	14.4±3.50	0.296
Inferior	13.9±3.59	12.6±2.30	0.356
Superotemporal	6.67±2.73	5.80±0.44	0.374
Temporal	14.2±5.03	10.4±4.77	0.158*
Inferotemporal	6.03±2.60	3.40±2.07	0.155

P-values with asterisks indicate where the Mann-Whitney test was used; Z-normal test was used in the other regions. The Shapiro-Wilk's test was used to test the normality.

### 3.2 Box-counting dimension and information

The first step to make the statistical analysis of fractal dimensions of the two groups was to test whether the segmentations represented the original images of the retinas accurately. We selected ten segmented images of the DRIVE made by one observer, carried out the skeletonization for the control group and compared it to the skeletonization of the same ten images segmented manually by another observer. Figure 3 represents the box-counting dimensions (3A) and information (3B) to segmented and skeletonized images, respectively. T-student test showed that there was no significant difference between the segmented images ( $p=0.82$  for box-counting dimension and  $p=1,0$  for information dimension) and the skeletonized ones ( $p=1.0$  for box-counting dimension and  $p=0.68$  for information dimension). These results show that the manual segmentation is a reliable method and can be considered as gold standard. Table 2 shows the fractal dimensions (box-counting dimension

and information) of the control group and NPDR. In this case, neither the whole retina nor its different regions in the control group displayed difference to the NPDR group ( $p>0.05$ ).

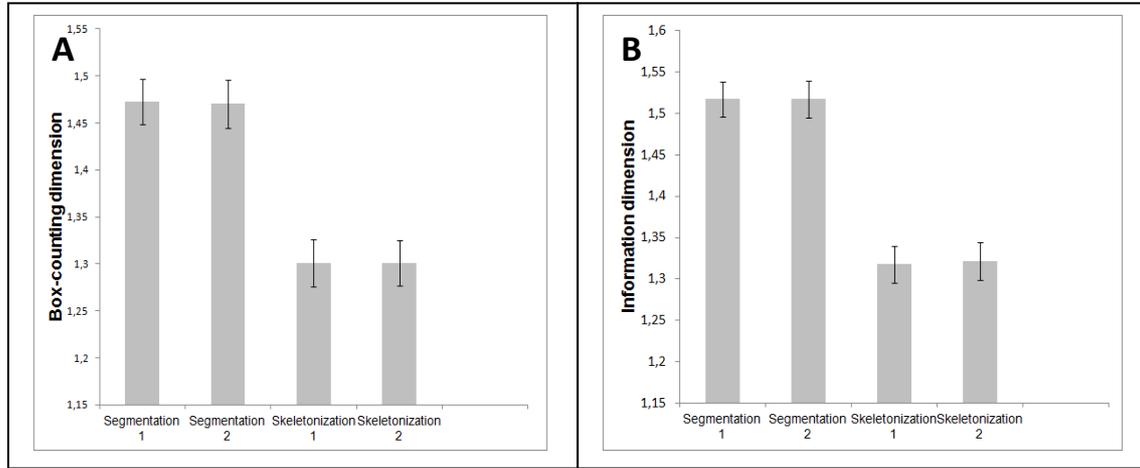


Figure 3 - Box-counting dimension (A) and information dimension (B) of the network of retinal vessels by 2 different observers.

Table 2. Fractal dimensions of all regions and whole retina of the control group and NPDR

Retinal region	$D_{bc}$ of control group	$D_{bc}$ of NPDR group	p- value of $D_{bc}$	$D_{inf}$ of control group	$D_{inf}$ of NPDR group	p-value of $D_{inf}$
Whole	1.29±0.02	1.28±0.02	0.30	1.31±0.02	1.30±0.02	0.39
Nasal superior	1.07±0.03	1.08±0.02	0.67	1.10±0.04	1.13±0.02	0.71
Optic disc	1.14±0.02	1.14±0.04	0.49	1.21±0.03	1.21±0.04	0.49
Nasal inferior	1.03±0.03	1.02±0.03	0.38	1.07±0.04	1.05±0.03	0.28
Superior	1.09±0.03	1.07±0.01	0.33	1.14±0.04	1.12±0.02	0.31
Macular	1.10±0.04	1.10±0.02	0.43	1.15±0.03	1.15±0.02	0.45
Inferior	1.08±0.02	1.06±0.03	0.23	1.13±0.03	1.11±0.02	0.23
Superotemporal	1.01±0.04	1.02±0.03	0.50	1.06±0.05	1.06±0.02	0.51
Temporal	1.06±0.04	1.04±0.06	0.30	1.11±0.04	1.08±0.07	0.22
Inferotemporal	1.03±0.03	1.00±0.05	0.23	1.07±0.03	1.05±0.07	0.22

All regions were submitted to the Z-normal test. The Shapiro-Wilk's test was used to test the normality.

### 3.3 Lacunarity parameter

Table 3 depicts the lacunarity values. Some regions of the two groups were submitted to the Mann-Whitney test (values with asterisks) and others to the Z-test. Statistically, there is no difference between the lacunarity parameters for the control group and NPDR ( $p>0.05$ ). The Shapiro-Wilk's test was used to test the normality.

Table 3. Lacunarity parameters of all regions and whole retina of the control group and NPDR

Retinal region	Control group	NPDR group	p-value
Whole	0.219±0.016	0.211±0.008	0.33
Nasal superior	0.331±0.064	0.309±0.058	0.37
Optic disc	0.246±0.030	0.267±0.044	0.75
Nasal inferior*	0.344±0.072	0.326±0.080	0.54
Superior*	0.227±0.047	0.208±0.022	0.58
Macular	0.216±0.027	0.249±0.020	0.88
Inferior	0.237±0.030	0.230±0.023	0.41
Superotemporal	0.300±0.049	0.321±0.066	0.66
Temporal	0.234±0.024	0.242±0.018	0.62
Inferotemporal*	0.291±0.037	0.361±0.131	0.27

The Mann-Whitney test was used in the regions with asterisks and the Z-normal test was used in the others. The Shapiro-Wilk's test was used to test the normality.

### 3.4 Multifractal analysis

There was statistical difference to dimension  $D_{-1}$  in the inferotemporal region ( $p=0.04$  to the Z-test), whilst other generalized dimensions of that same region corresponding to both groups were not significantly different. The generalized dimensions of other regions and the whole retina did not show any statistically significant difference. Table 4 presents the mean and standard deviations of following generalized dimensions for both groups:  $D_{-10}$ ,  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$  and  $D_{10}$ .

Table 4.  $D_{10}$ ,  $D_0$ ,  $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_{10}$  of all regions and whole retina of the control group and NPDR.

Retinal region	$D_{10}$ of		p	$D_0$ of		p	$D_1$ of		p	$D_2$ of		p	$D_{10}$ of		p
	control group	NPDR group		control group	NPDR group		control group	NPDR group		control group	NPDR group				
Whole	2.07±0.06	2.02±0.04	0.23	1.67±0.02	1.65±0.01	0.20	1.64±0.02	1.62±0.02	0.23	1.63±0.02	1.61±0.02	0.27	1.54±0.05	1.54±0.04	0.49
Nasal superior	2.15±0.45	2.43±0.52	0.17	1.48±0.14	1.56±0.12	0.70	1.43±0.13	1.49±0.10	0.67	1.40±0.13	1.46±0.09	0.66	1.28±0.14	1.33±0.09	0.63
Optic disc	2.01±0.11	1.99±0.10	0.45	1.62±0.06	1.60±0.11	0.39	1.60±0.06	1.58±0.10	0.38	1.59±0.06	1.57±0.12	0.38	1.49±0.10	1.43±0.19	0.39*
Nasal inferior	1.83±0.26	2.00±0.05	0.73	1.37±0.12	1.35±0.11	0.41	1.34±0.12	1.32±0.10	0.43	1.32±0.11	1.30±0.11	0.42	1.20±0.13	1.14±0.17	0.31
Superior	1.93±0.11	1.98±0.11	0.68	1.54±0.04	1.54±0.06	0.53	1.52±0.05	1.52±0.06	0.50	1.51±0.05	1.51±0.06	0.52	1.42±0.05	1.44±0.07	0.58*
Macular	2.06±0.08	2.02±0.15	0.32	1.62±0.05	1.59±0.04	0.30	1.57±0.05	1.55±0.03	0.20*	1.54±0.05	1.52±0.03	0.34*	1.41±0.07	1.40±0.05	0.44
Inferior	1.95±0.14	1.88±0.14	0.30	1.54±0.03	1.50±0.06	0.46	1.51±0.03	1.48±0.06	0.42	1.49±0.03	1.46±0.06	0.62	1.38±0.05	1.32±0.03	0.14
Superotemporal	2.42±0.52	2.50±0.49	0.88*	1.50±0.14	1.48±0.14	0.46	1.41±0.13	1.38±0.12	0.42	1.37±0.14	1.32±0.12	0.36	1.26±0.17	1.18±0.10	0.14*
Temporal	1.99±0.12	2.08±0.14	0.75	1.55±0.08	1.30±0.10	0.52	1.51±0.09	1.26±0.11	0.48	1.49±0.10	1.24±0.12	0.49	1.39±0.12	1.41±0.12	0.56
Inferotemporal	1.95±0.26	1.85±0.04	0.61*	1.40±0.09	1.55±0.16	0.14	1.36±0.09	1.51±0.17	0.13	1.34±0.09	1.49±0.16	0.14	1.22±0.12	1.14±0.14	0.24

Values  $p$  with asterisks indicate the regions compared by using the Mann-Whitney test, whereas the Z-normal test was used for the other regions.

Figure 4 shows two graphs that represent the mean and standard deviations of generalized dimensions ( $D_q$ ) versus variable  $q$  for the whole retina and for the inferotemporal region in which there was statistical difference to dimension  $D_{-1}$ . The plots follow a sigmoid fit, outlining a multifractality for blood vascular network of the retina and its regions. Each graph has two plots, one that depicts the control group and the other showing the retinopathy group. Graph 4A represents  $D_q$  versus  $q$  for the whole retina in the two groups (control and NPDR), showing a behavior with less oscillation (low standard deviation) compared to graph 4B (inferotemporal region). Figures 5A and 5B represent the graph of  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$  to the whole retina and the inferotemporal region respectively, in which each graph presents the group with and without NPDR. The graphs show the typical behavior to the multifractal structures, a parable with concavity facing down.

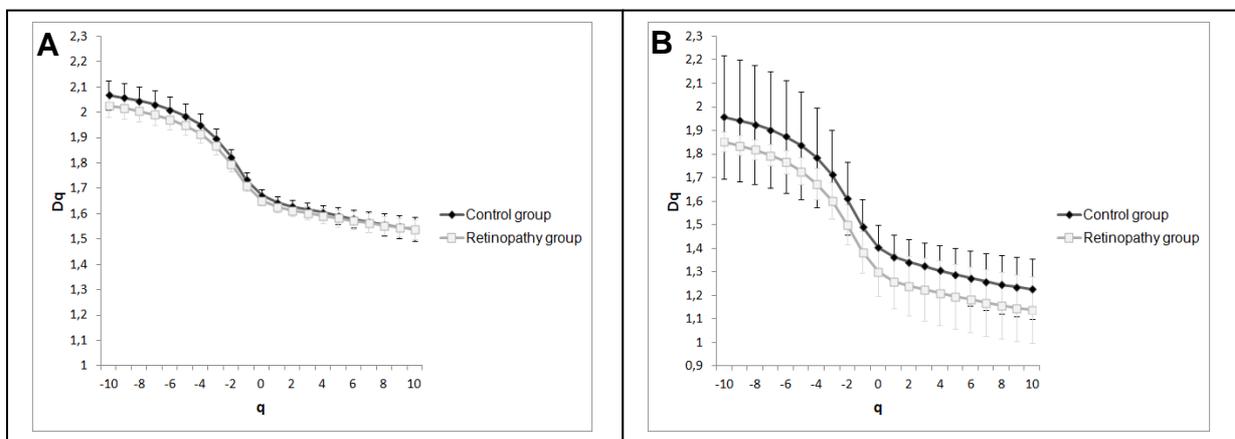


Figure 4 – Generalized dimensions of the control group and NPDR. 4A represents the whole retina and 4B represents the inferotemporal region.

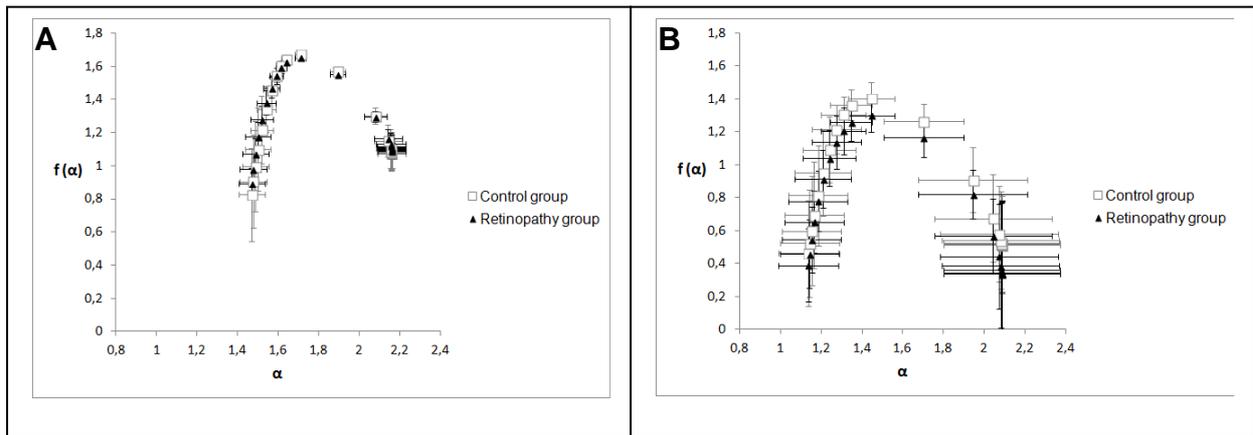


Figure 5 –  $f(\alpha)$  spectrum of the control group and the group with retinopathy. 5A represents the whole retina and 5B represents the inferotemporal region.

The means with standard deviations of  $\Delta\alpha$  and  $A$  are shown in Table 5. Values of parameter  $\Delta\alpha$  represent the multifractality of the blood vascular network of the retina and its regions. Tests revealed no statistically significant differences for parameter  $\Delta\alpha$  between the control group and the one with NPDR. In relation to the means with the respective standard deviations of parameter  $A$ , the retinas and all their regions for the two groups were observed to have values of  $A < 1$ , in other words, the curve of singularity spectrum  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$  is right-skewed. Thus, there is a greater presence of low fractal exponents and low fluctuations. For parameter  $A$ , the statistical tests revealed no significant difference between the control group and the one with NPDR.

Table 5. Values  $\Delta\alpha$  and asymmetry values of singularity spectrum (A) of all regions and whole retina of the control group and the one with NPDR

Retinal region	$\Delta\alpha$			A		
	Control group	Group NPDR	$p$	Control group	Group NPDR	$p$
Whole	0.699±0.09	0.645±0.08	0.27	0.548±0.15	0.498±0.066	0.68*
Nasal superior	1.121±0.46	1.378±0.56	0.33*	0.585±0.44	0.444±0.085	0.67*
Optic disc	0.725±0.13	0.815±0.18	0.75	0.476±0.20	0.552±0.266	0.70*
Nasal inferior	0.844±0.23	1.154±0.63	0.9	0.623±0.33	0.492±0.201	0.34
Superior	0.698±0.15	0.725±0.12	0.57	0.450±0.16	0.370±0.093	0.33*
Macular	0.879±0.12	0.846±0.2	0.39	0.677±0.17	0.611±0.143	0.33*
Inferior	0.783±0.18	0.771±0.14	0.47	0.578±0.21	0.672±0.181	0.67
Superotemporal	1.458±0.64	1.650±0.64	0.62	0.463±0.17	0.457±0.199	0.48
Temporal	0.807±0.19	0.886±0.12	0.66	0.516±0.14	0.419±0.124	0.25
Inferotemporal	0.951±0.36	0.940±0.16	0.64*	0.495±0.15	0.458±0.073	0.40

Values  $p$  with asterisks indicate the regions compared by using the Mann-Whitney test. For the other regions, the Z-normal test was used.

#### 4. Discussion

The non-proliferative diabetic retinopathy is characterized by microaneurysms, hemorrhages and capillary closure [Crawford et al., 2009; Chen; Shah, 2011]. The rise in hemodynamic alterations and compensatory mechanisms due to the presence of such signs may promote changes in vascular architecture. In this paper, we have used methods that are capable of identifying the geometric complexity of the blood vascular network.

The fractal dimension is a statistical descriptor of the space-filling pattern and density serving as a tool capable of evaluating the vascular development and therefore of helping in the diagnosis of diseases related to the vascular disorders [Family et al., 1989; Parsons-Wingter et al., 2000; Mancardi et al., 2008]. The retinal vascular network has a fractal dimension that ranges between 1 and 2, as being close to 2 indicates a more complex network

or higher vascular density. For instance, Doubal et al. (2010) have associated a low value of fractal dimension of retinal vessels to the lacunar stroke subtype. Also, according to Cavallari et al. (2011), the decrease in fractal dimension is related to the reduction in complexity of retinal vessels, which reflects in the alteration in brain microvessels in patients with CADASIL. Cheung et al. (2009) observed that the increase in the fractal dimension of the retinal vasculature is associated with early NPDR signs in young individuals with type 1 diabetes. Conversely, Avakian et al. (2002), when investigating NPDR in skeletonized images from 60-degree fundus fluorescein angiography by fractal analysis, observed that the density of vessels in normal retina macular region was greater than the vascular density of the retinal macular region with NPDR.

To identify possible vascular alterations not disclosed by fractal dimensions, the parameter of lacunarity which has the capacity to recognize different fractal structures with the same fractal dimension was employed, describing how the pixels are organized in the full image. This is a way to measure heterogeneity, as well as the degree of invariance to change of the fractal object in an image. Whereas the fractal dimension indicates how much space is filled by vessels, this parameter (reflected in the distribution of gaps) represents how the vessels fill the space wherein they are embedded [Gould et al., 2011]. This parameter has been used to discover alterations in the arteries and retinal veins [Landini et al., 1995], as well as to diagnose retinas with amblyopia [Țălu et al., 2012]. The lacunarity parameters obtained were not statistically different as regards the normal state and the disease, thus ratifying the results obtained by using the number of bifurcation points, box-counting and information dimensions.

In the multifractal analysis, only one related value  $D_{-1}$  of the inferotemporal region showed statistical difference between the two groups. We can say that the single exponent  $q=-1$  is not enough to characterize the retinal vascular architecture with NPDR. All generalized

dimensions to retinas and their other regions showed no difference. The multifractal analysis ensures more information about the behavior of the network of blood vessels once it reveals several values that estimate simultaneously the level of geometric complexity or filling of space by the vessels. The graphs in figure 4 present a behavior that defines them as a multifractal structure, represented by the descending sigmoid curve of  $D_q$  spectrum (generalized dimensions) versus  $q$  for the two groups. In case the object presents constant values for fractal dimensions, graph  $D_q$  versus  $q$  should be a straight parallel to  $q$  axis, and the object must be considered a monofractal structure.

Singularity spectrum  $f(\alpha)$  calculates the fractal dimension of the subset of pixels in an image described by a particular exponent, referring to the relative dominance of various fractal exponents involved in the structure [Telesca et al. 2004]. Figure 5 showed that spectrum  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$  also represents the multifractality of retinal vessels for both groups; in this case, the spectrum is a parabola with concavity facing down [Barabási; Vicsek, 1990]. Stösić and Stösić, (2006) have shown that the singularity spectrum (graph  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$ ) of retinal vascular network follows a multifractal geometry for both normal and pathological states; they have also shown that a group of retinas with different diseases presented lower singularity compared to normal retinas. In our case, we showed a group diagnosed just with NPDR and that there was no distinct singularity spectrum in relation to the control group (figure 5). In order to assess the multifractality of the vascular networks of retinas and their regions, length  $\Delta\alpha$  [Telesca et al., 2004; Shi et al., 2009; Hu et al., 2009] was used, which was not statistically different when comparing the two groups as observed in Table 5. Another way to analyse the singularity spectrum is through its curve asymmetry [Hu et al., 2009]. As already mentioned, this parameter was not statistically different within the two groups. Moreover, both groups showed values of low fractal exponents ( $A < 1$ ).

Diabetic patients, despite not having the signs that characterize mild early diabetic retinopathy, show a vascular geometry similar to the patients with the disease, according to the results revealed by fractal methods (box-counting dimension, information dimension, generalized dimensions, singularity spectrum and lacunarity parameter) and the number of bifurcation points.

Condition  $D_{\text{cap}} \geq D_{\text{inf}} \geq D_{\text{co}}$  has been established for each method that these exponents represent in measuring the fractal processes [Grassberger; Procaccia, 1983]. In terms of generalized dimensions, this condition can be described as follows:  $D_0 \geq D_1 \geq D_2$  [Posadas et al., 2003; Stošić; Stošić, 2006; Gould et al., 2011]. Each retina in both groups presented this condition, but when the regions were analyzed, some images from those regions lost this criterion, even for decreasing  $D_q$  values with the increase in exponent  $q$ . The superior region was the one with the highest number of images (7) not following such criterion. All images of the inferior region, macular and nasal superior are within this condition. Nevertheless, we can state that the vascular network of retinal regions presents multifractality, not only the vascular network of the whole retina, but its regions can also be considered a superposition of monofractal structures [Stošić; Stošić, 2006; Lopes; Betrouni, 2009].

The fractal dimensions obtained by the box-counting and information methods are not ruled by the condition stated by Grassberger; Procaccia (1983) in that  $D_{\text{cap}} \geq D_{\text{inf}}$ . Likewise, results obtained by Mendonça et al. (2007); Kunicki et al. (2009) and Voinea; Popescu (2011) were also found to be out of that condition. Considering that the mass-radius dimension of a structure is higher than the box-counting dimension (capacity dimension) [Mendonça et al., 2007; Voinea; Popescu, 2011], Family et al. (1989) obtained a higher correlation dimension than the mass-radius one for retinal blood vascularization, contradicting the principle  $D_{\text{cap}} \geq D_{\text{inf}} \geq D_{\text{co}}$ .

## 5. Conclusion

We can state that fractal methods (box-counting dimension, information dimension, generalized dimensions, singularity spectrum and lacunarity parameter), as well as the number of bifurcation points did not disclose geometrical alterations in the retinal vascular network for either group of diabetic patients, with or without non-proliferative diabetic retinopathy. In addition, we observe that not only the vascular network of whole retina, but its several regions follow a multifractal behavior.

## 6. Acknowledgements

We thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - (CAPES).

## 7. References

Antonetti D.A., Barber A.J., Bronson S.K., Freeman W.M., Gardner T.W., Jefferson L.S., Kester M., Kimball S.R., Krady J.K., LaNoue K.F., Norbury C.C., Quinn P.G., Sandirasegarane L., Simpson I.A. 2006. Diabetic retinopathy seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 55, 2401-2411.

Avakian A., Kalina R.E, Sage E.H., Rambhia A.H., Elliott K.E., Chuang E.L., Clark J.I. Hwang J.N., Parsons-Wingter P. 2002. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Curr Eye Res*. 24, 274–280.

Barabási A.L., Vicsek T. 1990. Self-similarity of the loop structure of diffusion-limited aggregates *J. Phys. A: Math. Gen.* 23, L729 - L733.

Bassingthwaight J.B., Liebovitch L.S., West B.J. 1994. *Fractal Physiology*. Oxford University Press. New York.

Cavallari M., Falco T., Frontali M., Romano S., Bagnato F., Orzi F. 2011. Fractal analysis reveals reduced complexity of retinal vessels in CADASIL. *Plos one*. 6, 1-4.

- Che Azemin M.Z., Kumar D.K., Wong T.Y., Kawasaki R., Mitchell P., and Wang J.J. 2011. Robust methodology for fractal analysis of the retinal vasculature. *IEEE Trans Med Imaging*. 30, 243 - 250.
- Chen C., Shah C.P. 2011. Review of therapeutic advances in diabetic retinopathy. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2, 39-53.
- Cheung N., Donaghue K.C., Liew G., Rogers S.I., Wang J.j., Lim S.W., Jenkins A.J., Hsu W., Lee M.I., Wong T.Y. 2009. Quantitative assessment of early diabetic retinopathy using fractal analysis. *Diabetes Care*. 32, 106-110.
- Costa E.V.L., Jimenez G.C., Barbosa C.T.F., Nogueira R.A. 2013. Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 34,114-121.
- Crawford T.N., Alfaro D.V., Kerrison J.B., Jablon E.P. 2009. Diabetic Retinopathy and Angiogenesis. *Curr Diabetes Rev.*; 5, 8-13.
- Doubal F.N., MacGillivray T.J., Patton N., Dhillon B., Dennis M.S., Wardlaw J.M. 2010. Fractal analysis of retinal vessels suggests that a distinct vasculopathy causes lacunar stroke. *Neurology.*; 74, 1102 – 1107.
- DRIVE: Digital retinal images for vessels extraction.  
<http://www.isi.uu.nl/Research/database/DRIVE:index.php> accessed October 9, 2012.
- Family F., Masters B.R., Platt D.E. 1989. Fractal pattern formation in human retinal vessels. *Physica D*. 38, 98-103.
- Kunicki A.C.B., Oliveira A.J., Mendonça M.B.M., Barbosa C.T.F., Nogueira R.A. 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy?. *Braz J Med Biol Res*. 42, 930-934.
- Gould D.J, Vadakkan T.J., Poché R.A., Dickinson M.E. 2011. Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. *Microcirculation*; 18, 136–151.
- Grassberger P., Procaccia I. 1983. Measuring the strangeness of strange attractors. *Physica D*. 9, 189-208.
- Hu M-H., Wang JF, Ge Y. Super-resolution reconstruction of remote sensing images using multifractal analysis. *Sensors* 2009; 9: 8669-8683.
- Mancardi D., Varetto G., Bucci E., Maniero F., Guiot C. 2008. Fractal parameters and vascular networks: Facts & artifacts. *Theor Biol Med Model*. 5,1–8.
- Mandelbrot, B.B. 1983. *The fractal geometry of nature*. Freeman. New York.
- Mandelbrot B. 1991. *Objetos Fractais*. Gradiva Lisboa,.

- Mendonça M.B.M., Garcia C.A.A., Nogueira R.A., Gomes M.A.F., Valença M.M., Oréface F. 2007. Fractal analysis of retinal vascular tree: segmentation and estimation methods. *Arq Bras Oftalmol.* 70, 413-22.
- Landini G., Murray P.I., Misson G.P. 1995. Local Connected Fractal Dimensions and Lacunarity Analyses of 60° Fluorescein Angiograms. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 13, 2749-2755.
- Lopes R., Betrouni N. 2009. Fractal and multifractal analysis: A review. *Medical Image Analysis.* 2009. 13, 634–649.
- Parsons-Wingenter P., Elliott K.E., Clark J.I., Farr A.G. 2000. Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20,1250–1256.
- Posadas A.N.D., Giménez D., Quiroz R., Protz R. 2003. Multifractal characterization of soil pore systems. *Soil Sci Soc Am J.* 67, 1361-1369.
- Shi K., Liu C.Q., Ai N.S. 2009. Monofractal and multifractal approaches in investigating temporal variation of air pollution indexes. *Fractals.* 4, 513-521.
- Stanley H.E., Meakin P. 1988. Multifractal phenomena in physics and chemistry. *Nature.* 335, 405-409.
- Stošić T., Stošić B.D. 2006. Multifractal analysis of human retinal vessels. *IEEE trans med. imaging.* 25, 1101-1107.
- Țălu Ș., Vlăduțiu C., Popescu L. A., Lupașcu C. A., Vesa Ș.C., Țălu S.D. 2012. Fractal and lacunarity analysis of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes. *HVM Bioflux.* 5, 45-51.
- Telesca L., Lapenna V., Macchiato M. 2004. Mono- and multifractal investigation of scaling properties in temporal patterns of seismic sequences. *Chaos, Solitons and Fractals.* 19, 1-15.
- Tremolada G., Del Turco C., Lattanzio R., Maestroni S., Maestroni A., Bandello F., Zerbini G. 2012. The role of angiogenesis in the development of proliferative diabetic retinopathy: impact of intravitreal anti-vegf treatment. *Exp Diabetes Res.* 2012, 1-7.
- Voinea V., Popescu D. 2011. Fractal analysis in electrography for biological systems diagnosing. *UPB. Sci. Bull.* 73, 29-42.

## EXPERIMENTAL EYE RESEARCH

The official journal of the International Society for Eye Research

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### GUIDE FOR AUTHORS

.

#### INTRODUCTION

The goal of *Experimental Eye Research* is to publish original research papers on all aspects of the cell biology, physiology, genetics, biochemistry, biophysics, molecular biology, biophysics, pharmacology, developmental biology, microbiology, and immunology of the eye. The journal is subdivided into four sections; Aqueous Humor and Blood Flow, Cornea and Ocular Surface, Lens and Retina and Choroid, each with their own section editors. Short Communications, Letters to the Editor, Methods in Eye Research; individual Review Articles or collections of Review Articles specifically commissioned by the Journal are also published.

Research areas include:

production and circulation of ocular fluids and the dysfunction of these pathways underlying ocular disease;

angiogenesis, neovascularization and regulation of blood flow in the eye in health and disease; cell biology, molecular biology, biochemistry, and biophysics of the eye or eye tissue; developmental and regenerative biology of the eye;

human and molecular genetics studies of inherited eye diseases;

gene therapy and neuroprotection targeted at preventing inherited ocular diseases;

neural and general physiology of the visual process.

#### ***Types of communications***

1. **Research Articles** :Original Research Articles describing the results of experimental studies that address fundamental biological issues on vision, the eye, or specific ocular tissues constitutes the majority of communications published in *Experimental Eye Research*. Detailed instructions for formatting regular research articles are provided below under the subheading “**Preparation**”.

2. **Letters to the Editor**: Letters to the Editor should provide substantive comment(s) on a publication in this Journal or an eye research article published elsewhere; or on issues of broad interest to the eye and vision research community. A Letter should be concise, to the point (generally no more than 750 words), contain only text (no abstract, figures, tables, acknowledgments, or reference list), and be written in continuous narrative style (no headings/subheadings). The Editor-in-Chief or a designated member of the Editorial Board will be responsible for reviewing Letters. Receipt of a Letter does not guarantee that it will be accepted for publication. In the event that the Letter challenges some aspect of a prior publication, a complete citation of the publication in question should be fully spelled out in the body of the text. The authors of the publication in question will be given the opportunity to respond to the comments made, and the two Letters (if accepted) will be published sequentially in the same issue of the Journal.

3. **Short Communications**: Short Communications are intended for preliminary reports of original, significant research results that are limited in scope and, thus, do not warrant publication in the form of a regular Research Article. Communications should be no longer than 4,500 words (generally not to exceed 4 printed pages in the Journal), inclusive of all literature citations, and should contain no more than two Figures (which may be multi-panel) and/or Tables; “Supplementary Data” is not permitted.

The word count pertains only to the main body of text, excluding the title, author/institution details, abstract, figures/tables, figure legends, and acknowledgments; the Abstract should not exceed 250 words. Communications should not contain headings/subheadings (*i.e.*, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion), other than References, but otherwise should follow the rules pertaining to the preparation, text-formatting and submission of Research Articles for this Journal.

4. **Focus on Molecules**: Focus on Molecules articles are no longer accepted by Experimental Eye Research.

5. **Methods in Eye Research**: These feature articles provide a detailed overview of a specific method or technique used in experimental research of the visual system. This contribution should contain sufficient information to allow successful reproduction of the experimental method/ technique in another laboratory. Each article should contain the following headings (the first four being numbered): Introduction Materials and Supplies Detailed Methods Potential Pitfalls and Trouble Shooting

*References Article Specification:* The article should not exceed 12 published pages in length including equivalent space for figures. For members of ISER, colour figures will be printed without charge.

Include enough detailed information to allow researchers in independent laboratories to successfully reproduce this method. Please highlight the potential "problem areas" for the method and provide "trouble shooting" solutions. Please ensure you select the correct article type (Methods in Eye Research) when uploading your article via <http://ees.elsevier.com/yexer>. If you would like to submit an unsolicited Methods In Eye Research article for consideration, or if you have any editorial queries, please, please contact the Methods in Eye Research Editor, Dr. Abe Clark, at [abe.clark@unthsc.edu](mailto:abe.clark@unthsc.edu).

**6. Special Issues:** Periodically, Experimental Eye Research will publish a special issue containing review articles that cover selected topics in depth relevant to eye research. While the breadth and scope of these special issues can vary widely, they are intended to contain in a single issue the state of the art in specific areas of eye research. Up to four color plates will be published free of charge in each review articles commissioned by the journal. If you are interested in developing a special issue, please contact the Editor-in-Chief, or the *Special Issues and Review Articles Editor*, Dr. Steven J. Fliesler, at: [fliesler@buffalo.edu](mailto:fliesler@buffalo.edu). Each review included in a special issue will undergo peer review before being accepted for publication.

**7. Review Articles:** Single review articles are periodically published in Experimental Eye Research. Most published review articles are solicited, but the Editor-in-Chief is always willing to consider new topics for a review. Prior to preparing a review article it is important to first contact the Editor-in-Chief, or Dr. Steven J. Fliesler, *Special Issues and Review Articles Editor*, ([fliesler@buffalo.edu](mailto:fliesler@buffalo.edu)) as to whether such a review would be appropriate for publication consideration. No reviews will be published without full peer review. We want all reviews to be succinct and pithy. While the length of a review will be governed by the scope of the topic covered, we suggest to authors that the length be approximately 6000 words, including space for tables, figures and references. Up to four color plates will be published free of charge in each review articles commissioned by the journal.

#### **Contact details for submission**

Experimental Eye Research Editorial Office, 525 B Street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA Tel.: (619) 699-6278; Fax: (619) 699-6850; E-mail: [exer@elsevier.com](mailto:exer@elsevier.com)

#### **BEFORE YOU BEGIN**

#### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### **Human and animal rights**

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

#### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### *Contributors*

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

#### *Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts*

*Before the accepted manuscript is published in an online issue* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: The reason the name should be added or removed or the author names rearranged. Written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests. Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

#### *After the accepted manuscript is published in an online issue*

Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. *After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

#### *For subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For open access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### ***Role of the funding source***

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### ***Open access***

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for Open Access in this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the

article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

*Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/yexer>.

### **Referees**

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 5 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

*US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy* Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

## **PREPARATION**

### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### ***LaTeX***

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls* (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography. For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

### ***Article structure***

#### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### ***Material and methods***

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### ***Results***

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

A concise and factual abstract of no more than 500 words is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be in paragraph form with no abbreviations or subheadings.

#### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 8 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing

with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Accession numbers**

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. There is no charge for colour in print for members of ISER, or for *invited* Reviews. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

#### **References**

##### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

##### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

##### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and

to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation - mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

#### *Further considerations*

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

#### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections

cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>. © Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

## APÊNDICE II

### **Multifractal dimension and lacunarity of the vascularization of yolk sac exposed to magnetic field**

Edbhergue Ventura Lola Costa <sup>1,2</sup> and Romildo de Albuquerque Nogueira <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Theoretical, Experimental and Computational Biophysics, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author: R.A. Nogueira. Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil, phone: (+55) 81-3320 6395. Email: [ran.pe@terra.com.br](mailto:ran.pe@terra.com.br)

## ABSTRACT

Several studies have reported the effects of magnetic fields (MF) in the blood vascular tissue. Extremely low frequency magnetic fields (ELF-MFs) can promote both the inhibition and the stimulation of vasculogenesis and angiogenesis, depending on the intensity and time of exposure to the MF. In order to investigate the possible effects of the ELF-MF on the vascular process it is necessary to employ methods that allow parameterizing the blood vascular network. This network is a structure with fractal geometry, therefore fractal methods have been used to evaluate its morphometric complexity. The lacunarity parameter (complementary method of fractal analysis) and multifractal analysis were used to investigate angiogenesis and vasculogenesis in the embryonic yolk sac membrane (YSM) of Japanese quail (*Coturnix japonica*), both in normal condition and subjected to an external MF of 1 mT and 60 Hz. The lacunarity showed that there was low vascular density for the group exposed to the magnetic field for 9 h/day, whereas the multifractal analysis showed a reduction in vascularization for experimental groups (6 h/day and 9 h/day of exposure to the MF). Furthermore, multifractal analysis showed a difference between the groups exposed for 12 and 24 h/day. By the multifractal methods (generalized dimensions and singularity spectrum), it was possible to characterize the vascular network of the YSM of the quail embryo as a multifractal object, being therefore a more appropriate application than the traditional monofractal methods.

Keywords: vasculogenesis, angiogenesis, multifractal analysis, lacunarity parameter, yolk sac membrane, magnetic field.

## INTRODUCTION

Researchers have been concerned about studying the effects generated by electric field (EF), magnetic field (MF) and electromagnetic field (EMF) on organisms, focusing on various cells and tissues. Several studies report the MF effects on the blood vascular tissue (McKay et al., 2007). Static magnetic fields (SMF), depending on the intensity, can either promote the increase in the proliferation of human umbilical vessel endothelial cells (HUVECs) (Martino et al., 2010) or prevent the growth of those very cells (Li et al., 2007). Extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) is capable of stimulating the proliferation, migration and endothelial tube formation (Delle Monache et al., 2008). Studies have also shown that the ELF-EMF produces vasodilatation, vasoconstriction and alterations in angiogenesis and vasculogenesis (Tepper et al., 2004; McKay et al., 2007; Bekhite et al., 2010). The MF and the EMF can act inhibiting (Costa et al., 2013) or stimulating vasculogenesis (Tepper et al., 2004; Bekhite et al., 2010), as well inhibiting (Ruggiero et al., 2004; Wang et al., 2009; Balanezhad et al.; 2010) or stimulating angiogenesis (Roland et al., 2000).

Both vasculogenesis and angiogenesis are involved with growth, as well as wound healing, tumors and several diseases (Folkman, 1989; Carmeliet et al., 2003; Folkman, 2007; Boscolo; Bischoff, 2009; Liu et al., 2012). Hence, knowledge about the effects caused by the MF or the EMF on the vessels suggests using them as an alternative therapy against cancer and other diseases related to vasculogenesis and angiogenesis (Bassett, 1993; Cameron et al., 2007; Ishida 2008).

The blood vascular network is considered a fractal structure due to its geometric complexity resulting from the ramification process of the vessels (Mandelbrot, 1983), a process observed at various scales in which the vessels

generate smaller ones. This process has self-similarity, which it is one of the properties that define fractal objects (Mandelbrot, 1983; Bassingthwaighte et al., 1994). Other characteristics are: scaling, meaning that the measurements depend on the scale used to take them; fractal dimension, which provides a quantitative description of the self-similarity and scaling, a dimension which is normally fractional (Mandelbrot, 1983; Bassingthwaighte et al., 1994).

Several studies have used the fractal dimension to measure the behavior of vascular network in diseases like retinopathies (Avakian et al., 2002; Cheung et al., 2009; Kunicki et al., 2009), in the study of drug action on vascular growth (Parsons-Wingenter et al., 2006; Mckay et al., 2008; Výboh et al., 2010) and tumor angiogenesis (Kirchner et al., 1996; Taverna et al., 2009). Nevertheless, the fractal dimension estimation has two hindrances: firstly, it refers to the amount of space filled by the object under study without describing the organization of such object in the space, hence different fractal objects may have the same fractal dimension value (Mandelbrot, 1983; Gould et al., 2011); secondly, the method to obtain the fractal dimension is related to one single dimension and as some fractal objects present different fractal properties in their different regions, it is therefore necessary to represent them in more than one dimension (Stanley; Meakin, 1988).

To solve the first question, there is a way to calculate how the fractal object is organized in the space called lacunarity (Mandelbrot, 1983; Gould et al., 2011). This parameter measures the distribution of holes or gaps throughout the object embedded in the image, working as a complementary analysis to the methods of the fractal dimension. Regarding the second question, the object with the characteristics mentioned above is known as a multifractal object, represented by various fractal

dimensions through the generalized dimension spectrum, as well as the singularity spectrum.

Costa et al. (2013), working with the fractal dimension method (box-counting and information dimension), showed the inhibition of vasculogenesis and angiogenesis in the YSM of quail embryo (*Coturnix japonica*) when exposed to some extremely low frequency magnetic field doses (ELF-MF). Our aim is to test whether the lacunarity and multifractal analysis are able to identify any alteration in the YSM vasculature of quail embryo which was not detected by monofractal analysis.

## **MATERIALS AND METHODS**

Animals were used in the experiments following the protocol (number 028/2012-012531/2011-E09/ CEUA-UFRPE) approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Rural Federal University of Pernambuco. The experimental protocol was performed as shown in Costa et al. (2013), which consisted of obtaining the YSM of quail embryo, its exposure to the MF, as well as obtaining and processing the images. After 2 days of incubation, a window of about 3 cm<sup>2</sup> was open in the egg shells, from which 2.5 ml of albumen was removed, and then covered with PVC film (polyvinyl chloride). This window enabled the visualization of YSM and its direct exposure to the MF. In the period between 48 h and 96 h of incubation the macroscopic expansion of the vascular network of YSM was clearly observed.

Exposure to the MF was performed with a pair of Helmholtz coils (PHYWE, Göttingen, Germany) and the MF intensity was measured by a teslameter (PHYWE, model 13610.93) connected to a probe (PHYWE, model 13610.02) placed on the

horizontal axis of each Helmholtz coil. The eggs were placed along the horizontal axis between the coils for uniform exposure to the MF, with an intensity of 1 mT.

Five groups of 20 eggs were used, each group being exposed at different times, under the same experimental conditions, with the same incubator and pair of Helmholtz coils. The eggs were placed in the incubator two hours after being laid and remained in the incubator between two Helmholtz coils for 96 h. For the control group, the coils were switched off. All groups (except the control group) were exposed to the MF as from 48 h of incubation. Group 1 was exposed to the MF for 2 h, three times a day, with intervals of 6 h between applications, resulting in a total exposure of 6 h/day. Group 2 was exposed to the MF for 3 h, with an interval of 5 h between applications, amounting to 9 h/day. Group 3 was exposed for 4 h, with an interval of 4 h between applications (total of 12 h/day). Group 4 was only exposed for 24 h (continuously).

To process the image, after 72 h of incubation the vascular network of the YSM was photographed with a digital camera (Sony DSC W-130, San Diego, CA, USA). The visual field was limited by the size of the egg, especially by the egg minor axis, which ranged from 2.39 to 2.62 cm (Figure 1A). The images of the vascular network of the YSM (1920x1080 pixels) were manually skeletonized (Figure 1B) by the Microsoft Paint program in order to be evaluated by the lacunarity parameter and by the multifractality analysis. The same procedure was repeated at 96 h of incubation.

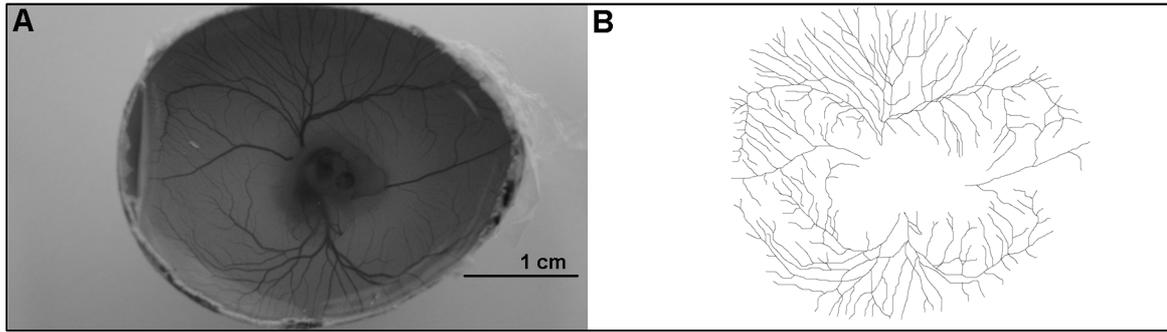


Figure 1 – Extra-embryonic vascular network of the YSM and corresponding skeletonized image.

### Lacunarity analysis

We used software Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, USA) with plug-in FracLac (A. Karperien – Charles Sturt University, Australia) to obtain the lacunarity values (distribution of gaps in an image). Lacunarity is related to the pixel distribution of an object in an image. The count is made on pixels of the image, covering the skeletonized vasculature with a series of grids, each grid containing a number of boxes with different sizes ( $r$ ) and with different orientations ( $g$ ).

The mean value to the lacunarity is calculated as follows:

$$\Lambda = \left[ \sum_g \sum_i (1 + (\sigma/\mu)^2) \right] / n \quad (1).$$

where  $\sigma$  is the standard deviation and  $\mu$  is the mean pixel value per box at a side size  $r$ , and  $n$  is number of box sizes in a box count at an orientation  $g$ . The sum is made over all values of  $r$  and  $g$ .

## Multifractal analysis

Program Image J was also used with plug-in Fraclac to carry out the multifractality analysis. The analysis is based on the generalized dimension spectrum, represented by  $D_q$  which is dependent on variable  $q$ . Variable  $q$  is the exponent which expresses the fractal properties in different scales to an object,  $q \in (-\infty, +\infty)$ . For a multifractal object, the plot of  $D_q$  versus  $q$  is generally sigmoidal and decreasing, with  $q$  ranging between -10 and +10, thus generating dimensions from  $D_{-10}$  to  $D_{+10}$ . Twenty-one  $D_q$  values were generated for each image and all images were statistically tested.  $D_q$  is calculated as follows:

$$D_q = \tau(q)/(q - 1) \quad (2).$$

We can define  $\tau$  as:

$$\tau(q) = \lim_{r \rightarrow 0} \left[ \ln \left( \sum_i P_i(r)^q \right) \right] / \ln(1/r) \quad (3),$$

where  $P_i(r) = \frac{M_i}{M_0}$  is density,  $M_i$  is the number of pixels within the  $i^{\text{th}}$  box and  $M_0$  is the number of pixels for the whole image.  $\sum P_i$  is the density for all boxes (i) at a determined scale  $r$ .

The multifractal spectrum can also be calculated by the plot of parameters  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$ , where

$$N(\alpha) = r^{-f(\alpha)} \quad (5),$$

represents the number of boxes  $N(\alpha)$  in which the probability  $P_i(\epsilon)$  of finding pixels of the fractal object within a region of given scales  $i$  is

$$P_i = r^{\alpha_i} \quad (6),$$

$f(\alpha)$  being the fractal dimension of the union of regions with singularity length between  $\alpha$  and  $\alpha + d\alpha$ , where  $\alpha$  is a value that may range between  $-\infty$  and  $+\infty$ . These variables are obtained by Legendre transformation from  $\tau$  and  $q$ , as described below:

$$\alpha(q) = d\tau(q)/dq \quad (7)$$

and

$$f(\alpha(q)) = q\alpha(q) - \tau(q) \quad (8).$$

Also,  $\alpha$  and  $f(\alpha(q))$  can be calculated with the following equations:

$$\alpha = \sum_i [\mu_i \cdot \ln P_i] / \ln r \quad (9)$$

and

$$f(\alpha) = \sum_i [\mu_i \cdot \ln \mu_i] / \ln r \quad (10),$$

where

$$\mu_i(q, r) = P_i^q(r) / \sum_i p_i^q(r) \quad (11).$$

$P_i^q(r)$  is the probability of pixels in the  $i^{\text{th}}$  box to exponent  $q$ . Plotted graph  $\alpha$  versus  $f(\alpha)$  fits a parabola with concavity facing down when the object has a multifractal structure.

### Statistical analysis

Groups were compared within the following categories: lacunarity values in 72 h and 96 h of incubation, generalized dimensions in 72 h and in 96 h. For groups that

followed a normal distribution according to Shapiro-Wilk's test, ANOVA statistical test with Tukey's post-hoc test was used. For groups that did not follow a normal distribution, Kruskal-Wallis's test with Dunn's post-hoc test was used. Both tests were carried out to the significance level of 5%.

## **RESULTS**

### **Lacunarity analysis**

In 72 h of incubation, the lacunarity parameters showed a significant difference between the control group (no MF) and group 2 (9 h/day of exposure to the MF) by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). There was no statistically significant difference among the groups in the 96 h of incubation. Table 1 shows the means and the standard deviations of lacunarity parameters of all groups in 72 h and 96 h of incubation. We can observe in the table that the lacunarity values in 72 h were higher than in 96 h for the same group, denoting a reduction in the distribution of gaps. There is an inverse relationship in the lacunarity parameter with the space-filling by vessels, in other words, the increase in vascular density indicates a smaller lacunarity value. The values clearly demonstrate that the blood vasculature growth of the YSM occurs between 72 and 96 h of incubation. Table 1 also shows the mean variation of lacunarity between 72 and 96 h of incubation. Several embryos died during the experiments, thus the number of individuals (N) varied in each group.

Table 1. Mean and standard deviation of the lacunarity values calculated on YSM vasculature in 72 and 96 h of incubation.

Groups	N	72 hours of incubation	N	96 hours of incubation	Variation of Lacunarity ( $10^{-5}$ /hours)
Control	7	0.351±0.025	6	0.267±0.019	351±87.7
Group 1	7	0.431±0.086	5	0.320±0.105	398±241.3
Group 2	14	0.441±0.068*	8	0.297±0.040	596±296.5
Group 3	10	0.388±0.057	7	0.279±0.064	261±242.4
Group 4	15	0.426±0.052	13	0.276±0.034	616±246.3

Value with asterisk marks significant difference between the group exposed to MF and the control group

### Multifractal analysis

The multifractal evaluation was carried out by using the values of generalized dimension  $D_q$  versus  $q$  and graph  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$  (singularity spectrum). Figure 2 reveals the spectrum of generalized dimensions which are graphs  $D_q$  versus  $q$ . The graph shows the means and the standard deviations of  $D_q$  values related to their respective  $q$  to all groups in 72 h (2A) and in 96 h (2B) of incubation. Both graphs in figure 2 show a decreasing sigmoidal plot, characterizing the vascular network of quail YSM as a multifractal object.

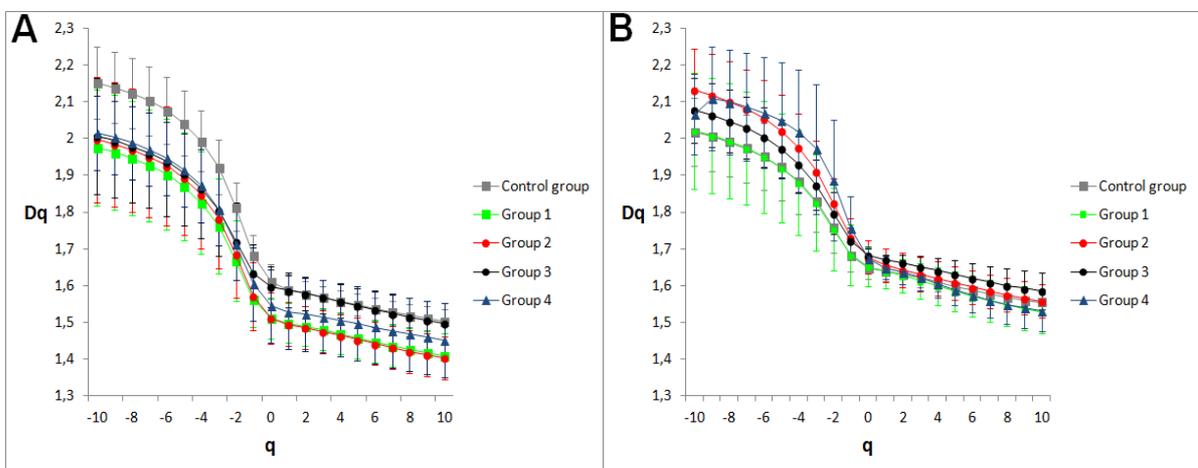


Figure 2. Generalized dimension ( $D_q$  vs  $q$ ). Figure A refers to all groups in 72h of incubation. Figure B to all groups in 96h of incubation.

Table 2 represents the range of means and standard deviations of generalized dimensions that had significant differences in 72 h of incubation. Groups 1 and 2 presented statistical differences in relation to the control group regarding the range of generalized dimensions from  $D_{-1}$  to  $D_{+10}$  ( $p < 0,05$ ). Moreover, groups 1 and 2 were statistically different from group 3 regarding the corresponding values from  $D_0$  to  $D_{+10}$ . The values for  $D_{+1}$  and  $D_{+2}$  of group 3 were significantly different from group 4. On the other hand, in the 96 h of incubation, groups did not show significant differences between  $D_q$  values.

Table 2, Generalized dimensions of the experimental groups and the control group in 72 h

Groups	D <sub>-1</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>+1</sub>	D <sub>-2</sub>	D <sub>-3</sub>	D <sub>-4</sub>	D <sub>-5</sub>	D <sub>-6</sub>	D <sub>-7</sub>	D <sub>-8</sub>	D <sub>-9</sub>	D <sub>+10</sub>
Control	1.68±0.06ab	1.61±0.05ab	1.59±0.04ab	1.58±0.03ab	1.57±0.03ab	1.56±0.03ab	1.55±0.03ab	1.54±0.03ab	1.53±0.03ab	1.52±0.03ab	1.51±0.03ab	1.50±0.03ab
Group 1	1.56±0.08a	1.51±0.05ac	1.50±0.05ac	1.49±0.05ac	1.48±0.05ac	1.47±0.05ac	1.46±0.06ac	1.47±0.06ac	1.43±0.06ac	1.42±0.06ac	1.42±0.06ac	1.41±0.06ac
Group 2	1.57±0.09b	1.51±0.07bd	1.49±0.06bd	1.48±0.06bd	1.47±0.06bd	1.46±0.06bd	1.45±0.06bd	1.44±0.06bd	1.43±0.06bd	1.42±0.06bd	1.41±0.06bd	1.40±0.06bd
Group 3	1.63±0.09	1.60±0.07cd	1.59±0.06cde	1.58±0.06cde	1.57±0.06cd	1.56±0.06cd	1.55±0.06cd	1.53±0.06cd	1.52±0.06cd	1.51±0.06cd	1.50±0.06cd	1.50±0.06cd
Group 4	1.63±0.08	1.60±0.05	1.59±0.05e	1.58±0.04e	1.57±0.04	1.56±0.05	1.55±0.05	1.53±0.05	1.52±0.05	1.51±0.05	1.50±0.05	1.50±0.05

Same letter means that there was statistically significant difference between the groups to each value of D<sub>q</sub>.

Figure 3 shows graphs  $f(\alpha)$  versus  $\alpha$ , which represents the singularity spectrum. Graph 3A represents the means and standard deviations of  $f(\alpha)$  related to the means and standard deviations of  $\alpha$  for all groups in 72 h of incubation, whereas figure 3B represents, in the same way, spectrum  $f(\alpha)$  for all groups in 96 h of incubation. Both graphs reveal that the blood vascular network of quail YSM has indeed a multifractal nature, as the multifractal object is characterized when the plot is a parabola. Still, both graphs show that all points of the plot for each group are close or overlap, meaning that there were no differences of singularity among the groups regarding the two different periods of incubation.

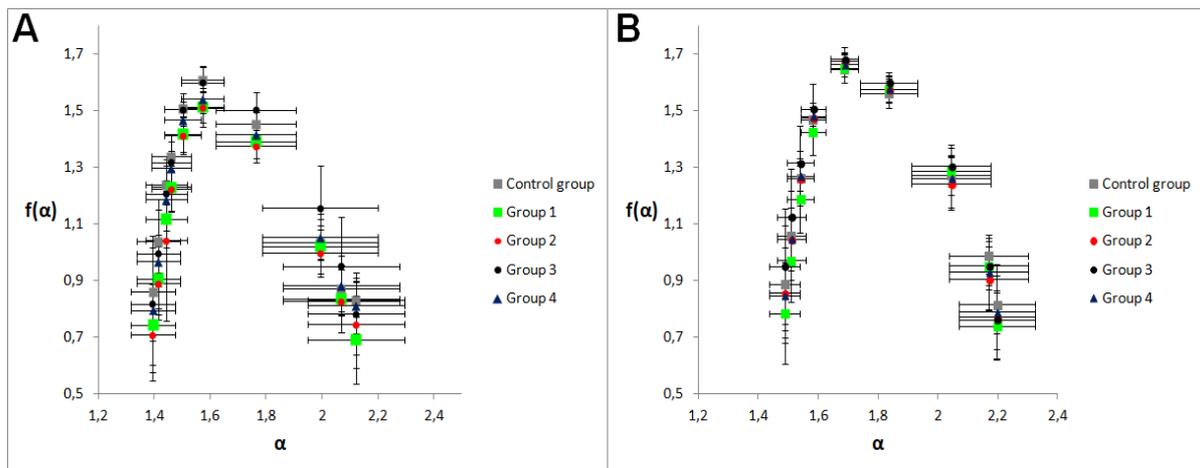


Figure 3. Graphs of spectrum  $f(\alpha)$  vs  $\alpha$ . Figure A refers to all groups in 72 h of incubation. Figure B refers to all groups in 96 h of incubation.

Table 3 shows some means and standard deviations of  $D_q$  in 96 h of incubation, where  $D_0$ ,  $D_1$  and  $D_2$  can be used to represent the values of monofractal dimensions (capacity, information and correlation dimensions, respectively). The mean values of fractal dimensions did not differ significantly under the various experimental conditions for the different generalized dimension values.

Table 3. Mean and standard deviation of generalized dimensions for experimental and control groups in 96 h.

Groups	D <sub>-10</sub>	D <sub>-5</sub>	D <sub>0</sub>	D <sub>+1</sub>	D <sub>+2</sub>	D <sub>+5</sub>	D <sub>+10</sub>
Control	2.02±0.09	1.92±0.09	1.65±0.03	1.64±0.03	1.63±0.03	1.60±0.03	1.55±0.03
Group 1	2.02±0.16	1.92±0.15	1.65±0.05	1.64±0.04	1.63±0.05	1.58±0.05	1.53±0.06
Group 2	2.13±0.11	2.02±0.10	1.68±0.05	1.65±0.05	1.64±0.05	1.61±0.05	1.56±0.05
Group 3	2.08±0.09	1.97±0.08	1.68±0.02	1.67±0.01	1.66±0.02	1.63±0.04	1.58±0.05
Group 4	2.07±0.11	2.05±0.16	1.67±0.03	1.65±0.03	1.64±0.03	1.57±0.05	1.53±0.05

## DISCUSSION

The YSM has been an experimental model used to study vasculogenesis and angiogenesis. Our previous study using fractal dimensions (box-counting and information dimension) identified an inhibition in the formation process of blood vessels induced by the application of the MF (1mT and 50 Hz) for 6 and 9 h/day between 48 h and 96 h of incubation. With respect to that study, the exposure of the MF for 3, 12 and 24 h/day on the vasculature of the YSM did not make remarkable changes, thus suggesting a possible window effect regarding exposure time (Costa et al., 2013).

We can consider the lacunarity method a complementary analysis of fractal dimension, since it offers information on the fractal object organization in the space. It measures the distribution of holes or gaps embedded in an image found in the fractal object (Zaia et al., 2006). A higher lacunarity value corresponds to a higher presence of gaps and lower quantity of vessels (Gould et al., 2011). This parameter has been used to standardize the retinal vasculature (Gould et al., 2011), as well as to diagnose retinal disorders (Landini et al., 1995; Tălu et al. 2012). In our study, this parameter revealed a significant difference between the control group and the group with 9 daily hours of exposure to the MF in 72 h of incubation, confirming the result

shown in our previous study using fractal dimension analysis (Costa et al., 2013). For the group with 9 h daily of exposure, the lacunarity values were higher among the groups in the 72 h (Table 1), meaning that their vascular density was lower. In the same table, it can also be observed that there was a reduction in the lacunarity values in the 96 h in relation to the 72 h, meaning that the extraembryonic vascular networks grew in that period.

Firstly, the multifractal analysis showed that the vascular network of YSM is a multifractal structure, as observed in Figures 2 and 3. A multifractal object has different regions with different fractal properties (Stanley; Meakin, 1988). This object can also be described as a set of interwoven monofractal objects embedded into one another (Stösić; Stösić, 2006). When  $q$  ranges from -10 to +10,  $D_q$  assumes different decreasing values for the YSM vasculature. For a monofractal object, variable  $D_q$  is steady when exponent  $q$  varies. For topological reason, we have hoped that the YSM vasculature would be a multifractal object, due to its similar geometry to the retinal vasculature, regarded as a multifractal structure. Generalized dimensions with lower values were found in groups 1 and 2 (Table 2), showing that the blood vascular density was smaller among other groups in 72 h. The vascular network development was probably inhibited by the MF exposure in that period.

Studies have reported the inhibitory effects on angiogenesis by the static MF with different intensities and application time in the chorioallantoic membrane of chick embryos (Ruggiero et al., 2004; Wang et al., 2009; Balanezhad et al. 2010). Biomolecules, cellular components and various cell types probably have different sensitivity levels to the MF action. This sensitivity can become more specific for intensity, frequency and exposure time to the MF. The occurrence of a window effect based on our data was suggested, in which the exposure time varied, but the

intensity and frequency of the MF were constant. There is a threshold to exposure time to the ELF-MF, where over 9 h of MF daily application did not affect the vascularization of the YSM.

The survival, proliferation, motility and differentiation of endothelial cells are angiogenesis stages (Ding et al., 2006) that depend on the cytosolic calcium dynamics (Munaron, 2006). The exposure time-dependent effect can be related to the ELF-MF action on calcium entry through the channels (Grassi et al., 2004; Morabito et al., 2010), as well as on the calcium released from the endoplasmic reticulum (Ikehara et al., 2010), both involved with the regulation formation of vessels. The electric field induced in the vascular cells by action of the ELF-MF (1 mT and 50 Hz) might alter the potential membrane which modulates some calcium entry routes, such as: the receptor-mediated channel coupled to the second messenger, channels dependent on the calcium electrochemical gradient and sodium-calcium exchangers (Adams et al., 1989). However, other ways may be considered, once the cytoplasmic calcium concentration is also controlled by the growth factor (Villereal; Byron, 1992), like the vascular endothelial growth factor (VEGF) (Bates; Harper, 2003).

The VEGF promotes important cellular reactions that regulate vasculogenesis and angiogenesis (Risau, 1997; Drake et al., 2000; Liang et al., 2001; Fearnley et al., 2013). The ELF-EMF is capable of triggering an increase in the phosphorylation and expression of the receptor to VEGF-2 in HUVECs (Delle Monache et al., 2008). Besides, the MF can act on molecules such as prostaglandin E1, which acts in the transcription of VEGF and other factor genes involved in angiogenesis (Ruggiero et al., 2004). However, Martino et al. (2010) have observed that weak static MF (60 and 120  $\mu$ T) had no effect on VEGF gene expression; they nevertheless had an influence

on the HUVECs' proliferation, suggesting that the MF may be involved with other molecular mechanisms related to angiogenesis. Li et al. (2007) observed that the static MF with intensity of 10 mT induced apoptosis and necrosis of HUVECs and increased expression of VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and of ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), which trigger the endothelial-related inflammation.

## **CONCLUSION**

The lacunarity and multifractality parameters revealed that the magnetic field action of 1 mT intensity and 60 Hz frequency on the blood vascular network of the yolk sac membrane of Japanese quail embryos (*Coturnix japonica*) promoted an inhibition of vascular growth in between 48 and 72 h of incubation for exposures of 6 h/day and 9 h/day. More than 9 h daily exposures (12 h and 24 h) did not affect the YSM vascular network. Furthermore, the extraembryonic vascular network of quails was shown to be a multifractal structure, due to the sigmoidal behavior of its  $D_q$  generalized dimensions and the parabolic behavior of the singularity spectrum ( $f(\alpha)$  versus  $\alpha$ ), independently of the exposure time to the magnetic field.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - (CAPES) and the Foundation of Support for Science and Technology of the Pernambuco State (FACEPE).

## REFERENCES

- Adams, D.J., Barakeh, J., Laskey, R., Van Breemen, C., 1989. Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 3, 2389 - 2400.
- Avakian, A., Kalina, R.E., Sage, E.H., Rambhia, A.H., Elliott, K.E., Chuang, E.L., Clark, J.I., Hwang J.N., Parsons-Wingerter, P., 2002. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Curr. Eye Res.* 24, 274–280.
- Balanezhad, S.Z., Parivar, K., Baharara, J., Kouchesfehiani, H.M., Ashraf, A., 2010. The effect of extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis. *Res. J. Environ. Sci.* 4, 300-304.
- Bassett, C.A.L., 1993. Effects of electromagnetic fields. *J. Cell Biochem.* 51, 387-393.
- Bassingthwaighte, J.B., Liebovitch, L.S., WEST, B.J., 1994. *Fractal physiology.* Oxford University Press. New York.
- Bates, O., Harper, S.J., 2003. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vasc. Pharmacol.* 39, 225– 237.
- Bekhite, M.M., Finkensieper, A., Abou-Zaid, F.A., El-Shbagy, I.K., Omar, K.M., Figulla, H-R., Sauer, H., Wartenberg, M., 2010. Static electromagnetic fields induce vasculogenesis and chondro-osteogenesis of mouse embryonic stem cells by reactive oxygen species-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Stem Cells Dev.* 19, 731-743.
- Boscolo, E., Bischoff, J., 2009. Vasculogenesis in Infantile Hemangioma. *Angiogenesis.* 12, 197–207.
- Cameron, I. L., Short, N. J., Markov, M.S., 2007. Safe alternative cancer therapy using electromagnetic fields. *Environmentalist.* 27, 453–456.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.
- Cheung, N., Donaghue, K.C., Liew, G., Rogers, S.I., Wang, J.j., Lim, S.W., Jenkins, A.j., Hsu, W., Lee, M.L., Wong, T.Y., 2009. Quantitative assessment of early diabetic retinopathy using fractal analysis. *Diabetes Care.* 32, 106-110.
- Costa, E.V.L., Jimenez, G.C., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A., 2013. Fractal analysis of extra-embryonic vascularization in japanese quail embryos exposed to extremely low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 34,114 -121.
- Delle Monache, S., Alessandro, R., Iorio, R., Gualtieri, G., Colonna, R., 2008. Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells. *Bioelectromagnetics.* 29, 640-648.

Ding, Z.; Lambrechts, A.; Parepally, M.; Roy, P., 2006. Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. *J. Cell Sci.* 119, 4127-4137.

Drake, C.J., LaRue, A., Ferrara, N., Little, C.D., 2000. VEGF regulates cell behavior during vasculogenesis. *Dev. Biol.* 224, 178–188.

Fearnley, G.W., Smith, G.A., Harrison, M.A., Wheatcroft, S.B., Tomlinson, D.C., Ponnambalam, S., 2013. Vascular endothelial growth factor-A regulation of blood vessel sprouting in health and disease. *OA Biochemistry* 1,1-5.

Folkman, J., 1989. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer. Inst.* 82, 4-6.

Folkman, J., 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature.* 6, 273-286.

Gould, D.J., Vadakkan, T.J., Poché, R.A., Dickinson, M.E., 2011. Multifractal and lacunarity analysis of microvascular morphology and remodeling. *Microcirculation.*18, 136–151.

Grassi, C., D'Ascenzo, M., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., Azzena, G.B., 2004. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell. Calcium.* 35, 307-315.

Ikehara, T., Nishisako, H., Minami, Y., Ichinose (Sasaki), H., Shiraishi, T., Kitamura, M., Shono, M., Houchi, H., Kawazoe, K., Minakuchi, K., Yoshizaki, K., Kinouchi, Y., Miyamoto, H., 2010. Effects of exposure to a time-varying 1.5 T magnetic field on neurotransmitter-activated increase in intracellular  $Ca^{2+}$  in relation to actin fiber and mitochondrial functions in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 1221-1230.

Ishida, M., Fujioka, M., Takahashi, K.A., Arai, Y., Kubo, T. 2008. Electromagnetic fields a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466, 1068–1073.

Kirchner, L. M., Schmidt, S.P., Gruber, B.S.,1996. Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. *Microvasc. Res.* 54,2 - 14.

Kunicki, A.C.B., Oliveira, A.J., Mendonça, M.B.M., Barbosa, C.T.F., Nogueira, R.A., 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42, 930-934.

Landini, G., Murray, P.I., Misson, G.P. 1995. Local connected fractal dimensions and lacunarity analyses of 60° fluorescein angiograms. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 13, 2749-2755.

Li, F., Xu, K-W., Wang, H-C., Guo, W-Y., Han, Y., Liu, B., Zhang, R-Q., 2007. Effects of static magnetic field on human umbilical vessel endothelial cell. *J. Med. Coll. PLA.* 22, 106-110.

Liang, D., Chang, J.R., Chin, A.J., Smith, A., Kelly, C., Weinberg, E. S., Ge, R., 2001. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. *Mech. Dev.* 108, 29–43.

Liu, J.T., Chen, Y.L., Chen, W.C., Chen, H.Y. Lin, Y.W., Wang, S.H., Man, K.M., Wan, H.M., Yin, W.H., Liu, P.L., Chen, Y.H., 2012. Role of pigment epithelium-derived factor in stem/progenitor cell-associated neovascularization. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 1-10.

Mandelbrot, B.B. 1983. *The fractal geometry of nature.* Freeman. New York.

Martino, C.F., Perea, H., Hopfner, U., Ferguson, V.L., Wintermantel, E., 2010. Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells. *Bioelectromagnetics.* 31, 296-301.

McKay, J.C., Prato, F.S., Thomas, A.W., 2007. A Literature Review: The effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetics.* 28, 81-98.

Mckay, T.L., Gedeon, D.J., Vickerman, M.B., Hylton, A.G., Ribita, D., Olar, H.H., Kaiser, P.K., Parsons-Wingenter, P., 2008. Selective inhibition of angiogenesis in small blood vessels and decrease in vessel diameter throughout the vascular tree by triamcinolone acetonide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 1184-1190.

Morabito, C., Rovetta, F., Bizzarri, M., Mazzoleni, G., Fanò, G., Marigliò, M.A., 2010. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 579-589.

Munaron, L. 2006. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Rec. Pat. Anti-Cancer Drug. Discov.* 1, 105-119.

Parsons-Wingenter, P., Chandrasekharan, U.M., McKay, T.L., Radhakrishnan, K., DiCorleto, P.E., Albarran, B., Farr, A.G., 2006. A VEGF<sub>165</sub>-induced phenotypic switch from increased vessel density to increased vessel diameter and increased endothelial NOS activity. *Microvasc. Res.* 72, 91-100.

Risau, W., 1997. Mechanism of angiogenesis. *Nature.* 386, 671-674.

Roland, D., Ferder, M., Kothuru, R., Fairman, T., Strauch, B., 1999. Effects of pulsed magnetic energy on a microsurgically transferred vessels. *Plast. Reconstr. Surg.* 105, 1371-1374.

Ruggiero, M., Bottaro, D.P., Liguri, G., Gulisano, M., Peruzzi, B., Pacini, S., 2004. 0.2 T magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics*. 25, 390-396.

Stanley H.E., Meakin P., 1988. Multifractal phenomena in physics and chemistry. *Nature*. 335,405-409.

Stošić T., Stošić B.D. 2006. Multifractal analysis of human retinal vessels. *IEEE trans med. imaging*. 25, 1101-1107.

Țălu, Ș., Vlăduțiu, C., Popescu, L.A., Lupașcu, C.A., Vesa, Ș.C., Țălu, S.D., 2012. Fractal and lacunarity analysis of human retinal vessel arborisation in normal and amblyopic eyes. *HVM Bioflux*. 5, 45-51.

Taverna, G., Colombo, P., Grizzi, F., Franceschini, B., Ceva-Grimaldi, G., Seveso, M., Giusti, G., Piccinelli, A., Graziotti, P., 2009. Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. *Pathol. Res. Pract*. 205, 438–444.

Tepper, O.M., Callaghan, M.J., Chang, E.I., Galiano, R.D., Bhatt, R.D., Baharestani, S., Gan, J., Simon, B., Hopper, R.A., Levine, J.P., Gurtner, G.C., 2004. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J*. 18, 1231–1233.

Villereal, M.L., Byron K. L., 1992. Calcium signals in growth factor signal transduction. *Ver. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 119, 67-121.

Výboh, P., Zeman, M., Bilčík, B., Šárniková, B., Košťál L., 2010. Angiogenic effect of leptin in the quail chorioallantoic membrane. *Acta. Vet. Brno*. 79, 13-17.

Wang, Z., Yang, P., Xu, H., Qian, A., Hu, L., Shang, P., 2009. Inhibitory effects of a gradient static magnetic field on normal angiogenesis. *Bioelectromagnetics*. 30, 446-53.

Zaia, A., Eleonori, R., Maponi, P., Rossi, R., Murri, R., 2006. MR imaging and osteoporosis: fractal lacunarity analysis of trabecular bone. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed*. 10,484-489.

# MICROVASCULAR RESEARCH

## AUTHOR INFORMATION PACK

### GUIDE FOR AUTHORS

#### INTRODUCTION

*Microvascular Research* is an international journal dedicated to the dissemination of fundamental information related to the microvascular field. Research areas include:

- Angiogenesis
- Biochemistry
- Bioengineering
- Biomathematics
- Biophysics
- Cancer
- Circulatory homeostasis
- Comparative physiology
- Drug delivery
- Neuropharmacology
- Pathology
- Rheology

#### *Types of paper*

*Research article Brief (Short) Communications.* Preliminary reports will be reviewed for prompt publication; however, the comments must be restricted to no more than six typewritten pages, including references, tables, and illustrations. *Technical Reports.* Please contact the Editors-In-Chief through [mvr@elsevier.com](mailto:mvr@elsevier.com) before submission. *Letters to the Editor.* Letters to the Editor may consist of either of two types of correspondence: (1) a question or challenge to an article published recently in the journal or (2) a brief communication describing a preliminary research report or a review.

Letters to the Editor should be limited to no more than three double-spaced typewritten pages and a maximum of five references.

#### BEFORE YOU BEGIN

##### ***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

##### ***Human and animal rights***

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

##### ***Conflict of interest***

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Contributors**

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

### **Addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts**

*Before the accepted manuscript is published in an online issue*

Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include:

The reason the name should be added or removed or the author names rearranged. Written confirmation (email, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests. Publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

*For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see

<http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For Open Access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

#### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for: Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>. Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

#### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

#### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

##### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts,

abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for Open Access in this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### ***Submission***

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/mvr/>. If you are unable to provide an electronic version of your paper, please contact the Editorial Office prior to submission (e-mail: [mvr@elsevier.com](mailto:mvr@elsevier.com); telephone: +1-619-699.6354; fax: +1-619-699.6211).

#### *Referees*

*To facilitate the publication of manuscripts, especially those papers based upon a new, theoretical concept, the Editors invite each contributor to submit the names of at least three scientists who could review the submitted manuscript.*

#### ***Additional information*** US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm> by posting the peer reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via email (by e-mailing us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com)) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

## **PREPARATION**

### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Title*

The title of the paper should be brief; no longer than 100 characters in length, and should capture and communicate the key message of your research to a broader audience. To aid this, abbreviations, unless familiar to a broad audience, should be avoided.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. There should be no subtitles.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### *Keywords*

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of

footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or

use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

## **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

## **References**

### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below. *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.(2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### *Examples:*

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

### ***Video data***

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### ***AudioSlides***

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### ***Supplementary data***

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### ***Submission checklist***

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal

- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### ***Use of the Digital Object Identifier***

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### ***Online proof correction***

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### ***Offprints***

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via email (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

## **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be

provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>