Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*)

[1]Silva, J.E.S., [1]Silva, N.P.P., [1]Silva, M.M., [1,2]Costa, E.V.L., [1,2]Nogueira, R.A.

1. Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional, Depto de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE 52.171-030, Recife, PE

2. Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, UFRPE, 52.171-030, Recife, PE

jeinesilva@ymail.com, nataliabiologiaufrpe@gmail.com, smarciom@gmail.com, edbhergue@oi.com.br, ran.pe@terra.com.br

Resumo: *A membrana corioalantóide (MCA) é formada pela fusão do mesoderma somático do córion com o mesoderma esplâncnico do alantóide e é comumente usada em estudos da angiogênese. Os métodos de contagem por caixas (box-counting), massa-raio e informação foram usados para mensurar a dimensão fractal (D_f) das MCA. Ovos férteis foram desinfeccionados e incubados à temperatura de 37,5° C e 60% UR. Após 24h de incubação, foi aberta uma janela de 2,0 x 2,0 cm na casca do ovo para observar o desenvolvimento embrionário bem como da vascularização da MCA. Às 96h de incubação, as MCA foram digitalizadas, segmentadas semi-automaticamente e binarizadas (imagem em preto e branco). Os cálculos das D_f das imagens binarizadas dos vasos foram realizadas no programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System. O teste ANOVA, ao nível de significância de 5%, mostra que os métodos utilizados para análise da D_f das MCA diferem estatisticamente entre si. Isto indica que dependendo do método usado para mensurar a D_f de uma mesma estrutura os valores obtidos podem ser bastante diferentes.*

Palavras-chave: dimensão fractal, vascularização, membrana corioalantóide, contagem por caixas, massa-raio, informação.

Introdução

A análise fractal tem sido bastante usada na descrição de fenômenos e processos complexos da natureza, tais como a ruptura de dielétricos, abertura e fechamento de canais, processos de vascularização, dentre outros. As estruturas ou processos fractais se caracterizam pela auto-similaridade, dependência de escala e dimensão fractal (D_f).

O termo fractal foi cunhado por Mandelbrot, que reuniu, criou e popularizou uma grande coleção de tais objetos. Esses objetos são caracterizados por suas propriedades que são: i) auto-similaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo parecem com o objeto ou processo todo; ii) dependência de escala (*scaling*), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual foi medida; iii) dimensão fractal, a qual provê uma descrição quantitativa da auto-similaridade e dependência de escala e iv) as propriedades estatísticas anômalas das grandezas fractais [1].

A dimensão fractal, definida como dimensão de auto-similaridade, descreve quantos novos pedaços geometricamente similares ao objeto são observados quando a resolução é aumentada. Assim, se reduzirmos a escala por um fator F, encontramos que existem N pedaços similares ao original, então a dimensão de auto-similaridade é dada por $N = F^d$, onde d é a dimensão de auto-similaridade. Aplicando-se logaritmo: $d = \log N / \log F$. Na Fig. 1 que representa a curva de Koch a dimensão de auto-similaridade é igual a d= log 4 / log 3 = 1,2619.

Figura 1. A curva de Koch - construção de um objeto fractal (d = 1,2619)[1].

A geometria fractal tem se mostrado bastante apropriada para descrever e avaliar a complexidade de certas estruturas [7] dentre elas, sistemas vasculares [15,16]. A complexidade é dada pela dimensão fractal (D_f). Esta dimensão pode ser medida por vários métodos, como dimensão de contagem por caixas (box-counting) [1,2,9], dimensão de massa-raio [18] e dimensão de informação.

Membrana corioalantóide e sua utilização como modelo experimental

A membrana corioalantóide é formada pela fusão do mesoderma somático do córion com o mesoderma esplâncnico do alantóide, sendo comumente usada em estudos da angiogênese normal [4,5,14,15,17], com enxerto de células tumorais [4,6], para avaliar o potencial de irritação de solventes [18] e ainda com o uso de estimulantes [10,11] e inibidores [12] da angiogênese por ser um órgão extra-embrionário extenso, vascularizado, que cresce bidimensionalmente numa fina camada de tecido.

Análise fractal da membrana corioalantóide

Diversos autores utilizaram a dimensão fractal como metodologia de mensuração do processo de desenvolvimento vascular na membrana corioalantóide. Em um estudo da evolução da D_f durante o processo da angiogênese em MCA de pintos, foi observado que no estado estacionário a dimensão fractal atinge valor médio de 1.7 [14]. Outros trabalhos relatam que a D_f da MCA pode apresentar diferentes valores, levando-se em consideração o calibre dos vasos, encontrando-se valores de D_f próximos a 1.1 para os capilares,1.3 a 1.5 para os vasos de médio calibre e para os vasos maiores, a D_f foi igual a 2.0 em MCA de embriões de galinha [5]. Utilizando o método de contagem por caixas, foi observado que a D_f atingiu valores próximos a 1.8 no 13º dia de incubação, decrescendo discretamente após o 16º dia de incubação [4]. Já outros trabalhos relatam que D_f próximas a 1.7 podem ser atingidas no 4º dia de incubação em MCA de embriões de galinha [17].

Trabalhos utilizando MCA de embriões de codornas japonesas relatam valores de D_f 1.37±0.01, 1.38±0.01 e 1.38±0.02, para o 7º dia de incubação [10,11,12]. Portanto, a análise fractal parece ser um método eficiente para parametrizar o processo de vascularização da membrana corioalantóide em embriões de codornas japonesas.

Este trabalho teve como objetivo parametrizar a vascularização da membrana de embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) usando diferentes métodos de cálculo de dimensão fractal, tais como contagem por caixas, dimensão de informação e massa-raio e verificar se os valores de D_f dependem do método utilizado.

Metodologia

Incubação dos ovos

Ovos fertilizados oriundos do Núcleo de Coturnicultura da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EEPAC/ UFRPE) foram incubados a 37,5ºC e 60% UR em incubadora construída no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC). Após 24h de incubação, foram abertas janelas de aproximadamente 2,0 x 2,0 cm na porção superior dos ovos, com posterior remoção de 1,0 mL de albume para facilitar a visualização da vascularização da membrana corioalantóide dos embriões.

Análise das imagens das membranas corioalantóides

No 4º dia (96 h) de incubação as MCAs foram fotografadas com câmera digital. As imagens digitalizadas foram segmentadas semi-automaticamente, usando-se uma rotina computacional desenvolvida em nosso laboratório, onde foram usados os programas Word e Paint da Microsoft®. A segmentação foi feita no Word clicando-se sobre a imagem digitalizada, ao longo dos vasos sangüíneos e de segmentos deles.

Após a segmentação dos vasos, a imagem da MCA foi deletada, sendo coletada apenas a informação dos vasos segmentados. Para obtenção de uma imagem binária com fundo em preto e os vasos segmentados em branco foi usado o programa Paint. Este procedimento se fez necessário devido o programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, o qual foi utilizado para o cálculo da dimensão fractal da imagem segmentada dos vasos, operar com a imagem nesse formato.

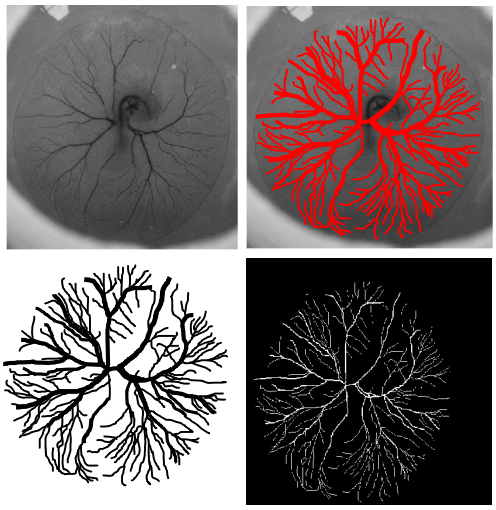

Figura 2. Processo de segmentação da MCA de codornas japonesas para obtenção de imagem binária.

Cálculo da Dimensão Fractal (D_f)

A dimensão fractal (D_f) da vascularização das MCA de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) (n = 12) foi calculada utilizando-se diferentes métodos, a saber: o de contagem por caixas, o de dimensão de informação e o de massa-raio, utilizando o Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System.

O método de contagem por caixas consiste em cobrir o objeto fractal com *N(r)* caixas que contenham pelo menos um ponto (pixel) do objeto. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo-log de *N(r)* em função de *r* (lados das caixas). O ângulo de inclinação desse gráfico é a dimensão por contagem por caixas [8], que pode ser definida formalmente, através da expressão

$$d = \lim_{\varepsilon \to 0} \left[\frac{\log N(r+\varepsilon) - \log N(r)}{\log(r+\varepsilon) - \log(r)} \right].$$

A dimensão de massa-raio é obtida construindo-se círculos de diferentes raios localizados no centro de massa da região de maior densidade do objeto fractal e calculando-se o número de pixels (massa) dentro de cada um desses círculos. Para um objeto fractal, a massa *M* (pixel) escala com o *r* (raio) dos círculos através da seguinte expressão:

$$M(r) \sim r^D,$$

onde *M* é a massa, *r* é o raio e *D* é a dimensão de massa-raio [18].

Para obtermos o valor da dimensão de massa-raio linearizamos a equação

$$M(r) = r^D.$$

Aplicando o logaritmo de ambos os lados da expressão, obtém-se a aproximação de uma reta com coeficiente angular α, onde D = α é a dimensão fractal.

O programa Flatfile, desenvolvido no LABTEC em linguagem C, permitiu o cálculo das coordenadas do centro de massa da região de maior densidade de pixels das imagens das MCA. A determinação do centro de massa da região de maior densidade se faz necessário, pois o Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System executa o cálculo da dimensão de massa-raio a partir do centro da figura e isto induz erro na mensuração da D_f.

A dimensão de informação é uma dimensão de cobertura, definida pela equação

$$d = \lim_{\varepsilon \to 0} \left[\frac{(S(r+\varepsilon) - S(r)}{\log(r+\varepsilon) - \log r} \right]$$

onde $S(r) = -\lim_{N \to \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} mi \log(mi)$ é denominada Entropia de Kolmogorov. N é o número de caixas e *mi= MI/M*, sendo *MI* o número de pontos na enésima caixa e *M* é o número total de pontos do objeto fractal. Portanto, a dimensão de informação atribui pesos às caixas de tal maneira que aquelas que contêm um número maior de pontos do objeto pesam mais do que as caixas com menos pontos. O cálculo da dimensão de informação é obtido através da inclinação do gráfico da entropia de Kolmogorov em função do logaritmo dos lados das caixas usadas para cobrir o objeto fractal.

Análise estatística

Inicialmente foi calculado o valor médio e os desvios-padrão da D_f das membranas corioalantóides de embriões de codornas japonesas para os diferentes métodos. Para testar a normalidade da distribuição dos valores das D_f das membranas corioalantóides realizou-se um teste de Shapiro-Wilks. Em seguida, realizou-se uma análise de variância para verificar se havia diferenças significativas entre as D_f obtidas para os métodos de contagem por caixa, massa-raio e dimensão de informação.

Resultados e Discussão

Diferentes métodos para o cálculo da D_f de estruturas vasculares como a MCA têm sido indicados na literatura especializada. Entre eles podem-se citar os métodos de contagem por caixas, informação e massa-raio. Neste trabalho estes métodos foram testados para calcular a D_f da vascularização em MCA de ovo de codornas japonesas (*Coturnix japonica*).

Os histogramas mostram que os valores para a D_f da vascularização da MCA de embriões de codornas japonesas obtidas pelos três métodos seguem uma curva normal com valores de probabilidades iguais a: 63,85% para contagem por caixas (W = 0,95 e p = 0,73), 21,72% para dimensão de informação (W = 0,91 e p = 0,25) e 95,19% para massa-raio (W = 0,918, p = 0,97). (Figs. 3, 4 e 5).

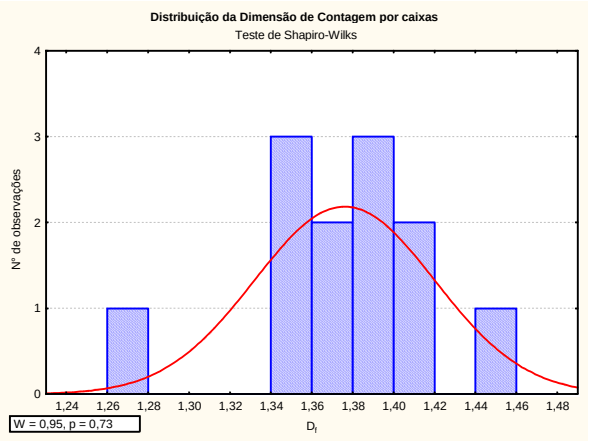

Figura 3. Gráfico de normalidade para dimensão de contagem por caixas da vascularização da MCA de embriões de codornas japonesas.

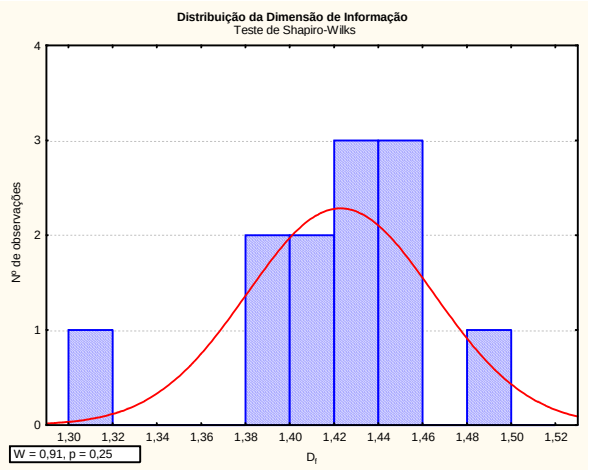

Figura 4. Gráfico de normalidade para dimensão de informação da vascularização da MCA de embriões de codornas japonesas.

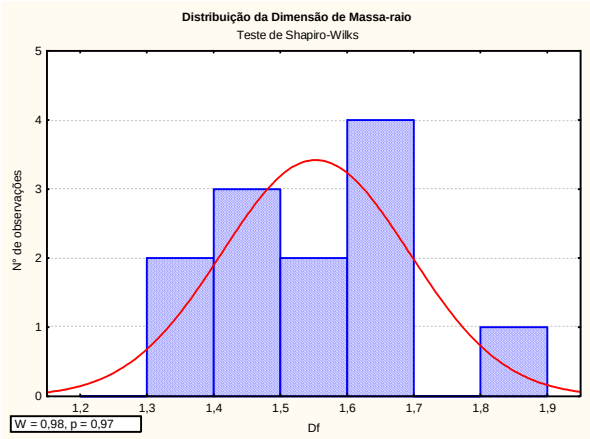

Figura 5. Gráfico de normalidade para dimensão de massa-raio da vascularização da MCA de embriões de codornas japonesas.

A análise de variância e o teste de Post-hoc de Tukey mostraram que os valores médios das D_f (Tab. 1) ao nível de 5% de significância diferem significativamente entre si ($F = 12{,}80$, $p \approx 0$, $n = 12$). Isto indica que dependendo do método usado para mensurar a D_f de uma mesma estrutura os valores obtidos podem ser bastante diferentes.

Tabela 1: Valores médios e desvios-padrão das dimensões fractais obtidos pelos métodos de contagem por caixas, informação e massa-raio.

Método	N	$D_f \pm$ SD
Contagem por caixas	12	1.38±0.04
Informação	12	1.42±0.04
Massa-raio	12	1.55±0.14

O valor médio da D_f obtido pelo método de contagem por caixas para a distribuição dos vasos nas MCA de embriões de codornas japonesas no 4º dia de incubação (1.38±0.04) está próximo aquele citado por Parsons-Wingerter *et al.* (1998; 2000a; 2000b) que encontraram valores médios de 1.37 para a D_f de contagem por caixas no 7º dia de incubação. A diferença existente entre os valores relatados nos trabalhos pode ser decorrente do tempo de incubação dos embriões, como pelo método de segmentação utilizado e ainda da área segmentada, visto que os autores citados realizaram segmentação das extremidades das MCA, o que pode ter influenciado nos valores de D_f obtidos por Parsons *et al*. (1998; 2000a; 2000b).

O valor médio da D_f obtida pelo método de informação (1.42±0.04) foi superior aquele obtido pelo método de contagem por caixas (1.38±0.04). Isso decorre do fato de que a dimensão de informação atribui pesos às caixas de tal maneira que aquelas que contêm um número maior de pontos pesam mais do que as caixas com menos pontos, enquanto que no método de contagem por caixas, as mesmas possuem o mesmo peso, independente da quantidade de pixels contidos dentro das caixas.

O método de massa-raio é mais adequado para caracterização de objetos que mantém simetria em relação a um ponto central, o que não é o caso das imagens da vascularização da MCA, apresentando o inconveniente de calcular o centro de massa a partir do centro da estrutura analisada, o que pode levar a resultados de D_f inadequados. Para corrigir esse problema, determinou-se as coordenadas do centro de massa da região de maior densidade da imagem, tomando essa região com centro de massa da figura para cálculo da D_f utilizando esse método. A D_f média da vascularização da MCA de codornas obtida pelo método de massa-raio (1.55±0.14) foi superior aos valores de D_f obtida pelos demais métodos.

Conclusão

Dependendo do método usado para mensurar a D_f de uma mesma estrutura os valores obtidos podem ser bastante diferentes.

Agradecimentos

Ao CNPq-UFRPE pela concessão de bolsa, através Programa de Bolsa de Iniciação Científica, a Jeine Emanuele Santos da Silva.

Referências

[1] J. B. Bassingthwaighte, L. S. Liebovitch, B. J. West. *Fractal physiology*. New York: Oxford University Press, 1994. 364p.

[2] C. Huan-Huan, Y. Li-Li, L. Shang-Bin. Artesunate reduces chicken chorioallantoic membrane revascularization and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on human microvascular dermal endothelial cell. *Cancer Letters*, 211:163-173, 2004.

[3] J. Feder. *Fractals.* New York: Plenum press. 1988. 283p.

[4] L. M. Kirchner, S. P. Schmidt, B. S. Gruber. Quantitation of Angiogenesis in the Chick Chorioallantoic Membrane Model Using Fractal Analysis. *Microvascular Research* 51:2–14, 1996.

[5] H. Kurzs, J. Wilting, B. Christ. Multivariate characterization of the blood vessel morphogenesis in the avian chorioallantoic membrane (CAM): cell proliferation, length, density and fractal dimension. In: T.F. Nonnenmacher, G.A. Losa, E.R. Weibel, *Fractals in biology and medicine*. Basel: Birkhaüser Verlag, 1994.132-140p.

[6] A. Malik, A. Meyhofer-Malik, C. H. Berg, W. Bohm, K. Kanzi-rapp, K. Diedrich, A. Ruck. Fluorescence diagnosis of endometriosis on the chorioallantoic membrane using 5-aminolaevulinic acid. *Human Reproduction*, 15(3):584-588, 2000.

[7] B. Mandelbrot. *The fractal geometry of nature*. New York: W.H. Freeman and Company, 1982. 468p.

[8] B. Mandelbrot. *Objetos fractais*. 1ª ed. Lisboa: Grandiva, 1991. 254p.

[9] M. H. Nusseiveig. *Complexidade e caos*. Rio de Janeiro: COPEA, 1999. 280p.

[10] P. Parsons-Wingerter, B. Lwai, M. C. Yang, K. E. Elliott, A. Milaninia, A. Redlitz, J. I. Clark, E. H. Sage. 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*, 55(3):201-214, 1998.

[11] P. Parsons-Wingerter, K. E. Elliott, J. I. Clark, G. Andrew, A. G. Farr. Fibroblast Growth Factor-2 Selectively Stimulates Angiogenesis of Small Vessels in Arterial Tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20:1250-1256, 2000.

[12] P. Parsons-Wingerter, K. E. Elliott, A. G. Farr, K. Radhakrishnan, J. I. Clark, E.H. Sage. Generation analysis reveals that TGF-β1 inhibits the rate of angiogenesis in vivo by selective decresase in the number of new vessels. *Microvascular Research*, vol. 59(2):221-232, 2000.

[13] D. Ribatti, M. T. Conconi, B. Nico, S. Baiguera, P. Corsi, P. P. Parnigotto, G. G. Nussdorfer. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane. *Brain Research*, vol 989(1(3):9-15, 2003.

[14] H. E. Stanley, P. Meakin. Multifractal phenomena in physics and chemistry. *Nature*. 335(29):405-409, 1988.

[15] P. G. Vico, L. H. Cartelier. A new approach in the study of skin vascularization. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 92(3): 463-468, 1993.

[16] P. G. Vico, H. Boyer, L. H. Cartelier. New concepts in the study of tissue vascularization: a mathematic model of skin vascularization. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 94(1):174-179, 1994.

[17] P. G. Vico, S. Kyriacos, O. Heymans, S. Louryan, L. Cartelier. Dynamic study of the extraembryonic vascular network of the chick embryo by fractal analysis. *Journal Theoretical Biology*, 195(4):525-532, 1998.

[18] M. P. Vinardell, M. Mitjans. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation induced by commonly used laboratory solvents. *Toxicology in Vitro*, 20(6): 1066-1070, 2006.

[19] T. Vicsek. The fractal phenomena, *World Scientific*, Singapure, 81-82, 1991.