



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JEINE EMANUELE SANTOS DA SILVA

Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a dietas enriquecidas com ácidos graxos em diferentes concentrações

Recife - PE

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JEINE EMANUELE SANTOS DA SILVA

Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a dietas enriquecidas com ácidos graxos em diferentes concentrações

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

Orientador: Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

Recife - PE

2011

Ficha catalográfica

S586a Silva, Jeine Emanuele Santos da
Análise fractal da vascularização da membrana vitelina de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a dietas enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados em diferentes concentrações / Jeine Emanuele Santos da Silva. – 2011.

103 f.: il.

Orientador: Romildo de Albuquerque Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2011.

Inclui referências e apêndice.

1. Ácidos graxos poliinsaturados 2. Fractal 3. Membrana vitelina 4. Vascularização I. Nogueira, Romildo de Albuquerque, orientador II. Título

CDD 636.0891

JEINE EMANUELE SANTOS DA SILVA

Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a dietas enriquecidas com ácidos graxos em diferentes concentrações

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

Dissertação defendida em 28 de fevereiro de 2011.

Banca examinadora

Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira

PPGBA – UFRPE

Dr. Adolpho Marlon Antoniol de Moura

CPqAM – FIOCRUZ

Dr. Pedro Hugo de Figueirêdo

DF – UFRPE

Dr. Thiago Salazar e Fernandes

PPGBA – UFRPE

Dra. Isvânia Maria Serafim da Silva

PPGBA – UFRPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita graça e misericórdia, que se fizeram novas sobre minha vida a cada amanhecer.

A meus pais, Ednaldo e Jecilene, e meu irmão, Erikson, pelo amor incondicional, apoio e compreensão. Amo vocês.

A Guilherme Carcavilla, pelo amor, carinho, pelas palavras de incentivo, pela compreensão, pelo ombro pra chorar, e por saber ouvir, mesmo quando eu não queria falar... Amo você.

Ao Professor Dr. Romildo Nogueira, pela orientação dedicada, desde a época da graduação. Também pela amizade, confiança e ensinamentos, que tem sido preciosos para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Ao Dr. Adolpho Marlon Anthoniol de Moura, que abraçou este projeto, colaborando na melhoria da metodologia do mesmo, pela formulação das rações experimentais e discussões pertinentes a elaboração dessa dissertação. Sua orientação e participação foram fundamentais para a realização deste trabalho. Ao Professor Dr. George Chaves Jimenez, por sua colaboração preciosa desde a concepção deste trabalho, por seus ensinamentos e amizade.

A professora Marliete Soares, pelo apoio, amizade e carinho, mesmo quando longe. Aos que se tornaram meus amigos, não só na bancada do laboratório, mas no dia-a-dia, que suportaram o desespero, estresse e desânimo que por vezes se fizeram presentes durante essa jornada, e que, principalmente nessas horas, se fizeram presentes. E que nos momentos felizes também estavam lá. A todos vocês o meu MUITO OBRIGADO. A Natália Priscila Pessoa da Silva, pela colaboração no manejo dos animais, que posso dizer ter sido a mais desafiadora etapa deste projeto. Obrigada por estar comigo. A Danielle Dutra, Daniella Tavares, Thais Heloíse, Edbhergue Costa, Renato Moraes, Leandro Alcântara, Gabriel Santos, Márcio Marques, Sarah Fonseca, Walter Santos, Bruno Tenório e Marcela... Aprendi muito com vocês. A Dra Isvânia Serafim e ao Dr. Thiago Salazar e Fernandes, pela colaboração e companheirismo, obrigada.

Ao professor Joaquim Evêncio Neto, pelo empréstimo das gaiolas utilizadas para alojar as gaiolas. Ao professor Carlos Boaviagem, ao mestrando Cristiano e ao

graduando Thiago do Departamento de Zootecnia pelo auxílio prestado na elaboração das rações. Ao CENAPESQ, pelo espaço físico cedido para realização das análises laboratoriais.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, que dividiram dos seus saberes, colaborando para a minha formação acadêmica e profissional. Aos colegas Júlio, Sheylla, Diego, Bruno Oliveira, Sandra, Mariana, Gustavo, Rosangêla, Patrícia, Mirivaldo, Ana Cláudia, Ana Paula, Paulo, Eduardo, Flaviane... Obrigada pela convivência partilhada.

A meus amigos que independente do caminho trilhado, permanecem presentes: Amanda Duarte, Patrícia Jasset, Thiago Andrade, Ana Luíza, Joely Vieira, Pablo Oliveira, Ismaela Melo, Bruno Araújo, Humberto Fernandes... É sempre bom estar com vocês e saber que os anos não nos afastaram...

À Netuno Alimentos S/A pela doação do óleo de peixe utilizado neste trabalho. Ao Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) pelo espaço físico cedido para a realização dos experimentos. Ao Professor Joaquim Evêncio Neto pelo empréstimo das gaiolas metálicas utilizadas para alojamento das aves. Ao Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ/UFRPE) e Laboratório de Química Analítica pela autorização ao uso do Espectrofotômetro.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de estudos durante o curso e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE, pelo apoio financeiro deste projeto.

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes dietas sobre o perfil lipídico sérico de codornas japonesas e sobre o crescimento vascular na membrana vitelina (MV) dos embriões das aves suplementadas com óleo de peixe e óleo de soja. Foram utilizadas 80 codornas, distribuídas em cinco tratamentos denominados Dieta Controle (DC), Óleo de Peixe 2% (OP 2%), Óleo de Peixe 4% (OP 4%), Óleo de Soja 2% (OS 2%) e Óleo de Soja 4% (OS 4%), numa relação de 1 macho para 3 fêmeas. Ovos fertilizados incubados a 37,5°C durante 24 horas foram abertos e após a remoção de 1 mL de albúmen a abertura foi selada com parafilme. A partir de 72 horas de incubação imagens da rede vascular da MV foram capturadas em intervalos de 24 horas durante 3 dias. DLA foram gerados a fim de comparar a sua dimensão fractal com a da MV e testar se o método usado interfere no valor da dimensão. Para obtenção do valor médio da dimensão fractal da vascularização das MV e dos DLA foram utilizados os métodos de box-counting (D_{bc}) e dimensão de informação (D_i). Método enzimático com reação colorimétrica foi usado para estimar o perfil lipídico das aves. Os níveis de colesterol total (CT) dos grupos não apresentaram diferença entre si. Os níveis de triglicérides totais (TG) das aves do grupo OP 2% e OP 4% foram superiores aos dos grupos DC, OS 2% e OS 4%. Para o HDL, apenas o grupo OP 4% apresentou diferença em relação aos demais grupos. A vascularização da MV dos embriões, avaliada pela dimensão fractal D, do grupo OP 4% foi inferior a vascularização das MV dos grupos DC, OS 2% e OP 2%. A vascularização da MV do grupo OS 4% foi inferior apenas quando comparada ao grupo DC. A suplementação com PUFA nos grupos OP 2% e OS 2% não interferiu na vascularização das MV. A dimensão fractal do DLA obtida pelos métodos de D_{bc} e D_i foi superior aquelas observadas para as dimensões das MV de todos os grupos experimentais. As diferenças entre as dimensões obtidas por estes métodos (D_{bc} e D_i) foram estatisticamente significativas para todos os grupos avaliados. A membrana vitelina se mostra um modelo experimental adequado para o estudo da vasculogênese. A geometria fractal se mostra um método matemático confiável para a quantificação do crescimento vascular em modelos in vivo como a membrana vitelina.

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, fractal, membrana vitelina, vascularização.

Abstract

The aim of the study was to investigate the effect of different fat dietary on serum lipid profile in Japanese quails and on vascular growth in the embryos vitelline membrane (VM). These birds were fed with supplemented feed with fish oil or soybean oil. The experiment was conducted with 80 quail, distributed in five treatments named Diet Control (DC), Fish Oil (FO 2%), Fish Oil 4% (FO 4%), Soybean Oil 2% (SO 2%) and Soybean Oil 4% (SO 4%), in a ratio of 1 male to 3 females. Fertilized eggs incubated at 37.5°C for 24 hours were opened and after removal of 1 mL of albumen the window was sealed with parafilm. From 72 hours incubation images of VM vascular network were captured at intervals of 24 hours over three days. DLA were generated in order to compare their fractal dimension (D) with the VM and test whether the method affects the value of D. To obtain the average value of D of the VM vascularization and DLA were used box-counting (D_{bc}) and information dimension (D_i) methods. An enzymatic colorimetric method was used to estimate lipid profile. The total cholesterol (TC) levels of the groups showed no difference between itself. The total triglycerides (TG) of the FO 2% and FO 4% groups were higher than the groups DC, SO 2% and SO 4%. For HDL, the group FO 4% differ in relation to other groups. The embryos MV vascularization, evaluated by fractal dimension (D), of the group FO 4% was less than the MV vascularization of the group DC, SO 2% and FO 2%. The MV vascularization of the group SO 4% was lower only when compared with group DC. The PUFA supplementation in groups FO 2% and SO 2% did not interfered with MV vascularization. The DLA fractal dimension obtained by the D_{bc} and D_i was higher than those observed for the MV fractal dimension for all experimental groups. Differences between the values of D obtained by these methods (D_{bc} e D_i) were statistically significant for all groups. The vitelline membrane shows an experimental model suitable for vasculogenesis study. The fractal analysis shows to be a reliable mathematical method to quantify vascular growth in vivo such as the vitelline membrane.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, fractal, vitelline membrane, vascularization.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Lipídeos e sua importância nos mecanismos celulares	16
2.2 Características das codornas japonesas (<i>Coturnix japonica</i>)	17
2.3 Membrana vitelina	18
2.4 Vasculogênese e angiogênese	21
2.5 Ácidos graxos poliinsaturados e ativação endotelial	25
2.6 Geometria fractal	31
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivos geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. METODOLOGIA	36
4.1 Local e instalações	36
4.2 Manejo dos animais	36
4.3 Delineamento experimental	36
4.4 Manejo alimentar	37
4.5 Manejo dos ovos	39
4.6 Método Computacional	40
4.6.1 Vascularização da membrana vitelina (MV).....	40
4.6.2 Difusão limitada por agregação (DLA).....	41
4.7 Cálculo da dimensão fractal (D)	41
4.8 Coleta de material biológico	42
4.8.1 Colesterol total	43
4.8.2 Triglicerídeos	45
4.8.3 Colesterol HDL	47
4.9 Análise estatística	48
5. REFERÊNCIAS	49
CAPÍTULO II	
Artigo – Ácidos graxos essenciais alteram o perfil lipídico sérico e a vascularização da membrana vitelina em codornas?	60
CAPÍTULO III	
Artigo – Análise fractal do crescimento vascular em membrana vitelina de embriões de codornas japonesas suplementada com ácidos graxos n-3 e n-6	76
ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1.** Exemplos de codorna japonesa (*Coturnix japonica*). Macho (E) e fêmea (D)..... 18
- FIGURA 2.** Organização geral de tecidos extra-embrionários de uma ave. (A, B) embrião E5 (horas de incubação). (C, D) embriões E2 (horas de incubação). (A) Vista superior de um embrião E5 antes de romper a membrana vitelina e córion. (B) vista lateral-superior após a remoção parcial da membrana vitelina e córion para revelar o embrião propriamente dito (com o âmnio) e alantóide. Nesta fase, a área vascular atingiu o equador e a área vitelina atingiu o pólo oposto (não visualizado aqui). (C) vista de cima de um embrião E2, mostrando a zona pelúcida e área vascular. (D) diagrama esquemático de (C)..... 20
- FIGURA 3.** Esquema da vasculogênese e angiogênese, mostrando como os precursores (angioblastos e hemangioblastos) coalescem e se diferenciam em células endoteliais (A), e formam uma rede vascular primitiva (vasculogênese) (B). O remodelamento dessa rede ocorre através da angiogênese (C), que envolve brotamento, intussuscepção e/ou ligação, resultando na formação de microvasos..... 22
- FIGURA 4.** Metabolismo dos ácidos graxos essenciais..... 26
- FIGURA 5.** O conjunto de Cantor é obtido a partir de uma reta, onde se divide esta em 3 segmentos de igual medida. O terço médio da reta é retirado, obtendo-se dois segmentos de $1/3$ da reta anterior. A seguir aplica-se o mesmo procedimento a cada uma dessas retas, e se obtém 4 segmentos de retas de comprimento igual a $1/3$ da reta anterior. Assim, sucessivamente, o terço médio dos segmentos de retas vão sendo retirados, obtendo-se sempre dois novos segmentos de comprimento igual a $1/3$ da reta anterior..... 33
- FIGURA 6.** A curva de Koch é obtida aplicando-se sucessivamente o procedimento de dividir um segmento de reta em três partes iguais e construir um triângulo equilátero no terço central e desprezar a base 33

- FIGURA 7.** O triângulo de Sierpinski é obtido construindo um triângulo congruente, dentro de outro triângulo, com os vértices nos pontos médios..... 34
- FIGURA 8.** DLA com 2000 pontos, gerado em programa de linguagem C para uma grade de 300 x 300 pixels..... 34
- FIGURA 9.** Incubação dos ovos férteis de codorna japonesa a 37,5°C 39
- FIGURA 10.** Abertura dos ovos com auxílio de tesoura esterilizada para visualização do embrião..... 39
- FIGURA 11.** Processo de segmentação e esqueletização da imagem da vascularização da MV de embriões de codorna japonesa. A rede vascular da MV; B obtenção do negativo da imagem, com destaque da vascularização em contraste com o fundo da imagem e segmentação dos vasos da MV; C binarização e esqueletização da imagem, para obtenção de padrão em preto e branco..... 41
- FIGURA 12.** Preparo das amostras para determinação dos níveis de CT, TG e HDL..... 43
- FIGURA 13.** Espectrofotômetro de absorção em luz ultravioleta visível (UV-visível)..... 43

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Processo de segmentação e esqueletização da imagem da vascularização da MV de embriões de codorna japonesa. A rede vascular da MV; B obtenção do negativo da imagem, com destaque da vascularização em contraste com o fundo da imagem e segmentação dos vasos da MV; C esqueletização da imagem 67

FIGURA 2. Comportamento da dimensão fractal (D_{bc}) da vascularização da MV em 72, 96 e 120 horas de incubação para os grupos experimentais..... 70

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Processo de segmentação e esqueletização da imagem da vascularização da MV de embriões de codorna japonesa. A rede vascular da MV; B obtenção do negativo da imagem, com destaque da vascularização em contraste com o fundo da imagem e segmentação dos vasos da MV; C esqueletização da imagem 82

FIGURA 2. DLA com 2000 pontos, gerado em programa de linguagem C para uma grade de 300 x 300 pixels..... 83

FIGURA 3. Dimensão fractal obtida pelos métodos de Box-counting (D_{bc}) e dimensão de informação (D_i) para o DLA e para a vascularização da membrana vitelina dos grupos experimentais. A Método de box-counting (D_{bc}). B Método de dimensão de informação (D_i). Dieta controle (DC), Óleo de peixe 2% (FO 2%), Óleo de peixe 4% (FO 4%), Óleo de soja 2% (SO 2%) e Óleo de soja 4% (SO 4%) em 120 horas de incubação 86

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

QUADRO 1. Moléculas envolvidas na sinalização celular e no processo de formação vascular e seus mecanismos de ação 24

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. Composição do óleo de peixe e de soja em relação ao teor de ácidos graxos..... 37

TABELA 2. Composição centesimal e nutricional das rações experimentais para codornas em fase de postura..... 38

CAPÍTULO II

TABELA 1. Composição centesimal e nutricional das rações experimentais para codornas em fase de postura..... 66

TABELA 2. Tabela 2. Valores médios obtidos para colesterol (CT), triglicerídeos (TG) e HDL no sangue de codornas submetidas a diferentes dietas..... 69

TABELA 3. Dimensão fractal ($M \pm SD$) obtida pelos métodos de box-counting (D_{bc}) para os diferentes tratamentos em distintos tempos de incubação..... 70

TABELA 4. Taxa de variação (%) da dimensão fractal obtida pelo método de contagem por caixas para os diferentes tratamentos..... 71

CAPÍTULO III

TABELA 1. Composição centesimal e nutricional das rações experimentais para codornas em fase de postura..... 81

TABELA 2. Dimensão fractal ($M \pm SD$) obtida pelos métodos de box-counting (D_{bc}) e dimensão de informação (D_i) para os diferentes tratamentos em distintos tempos de incubação e para o DLA..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
AG	Ácidos graxos
AGS	Ácidos graxos saturados
AHA	American Heart Association
AL	Ácido linoléico
Ang-1	Angiopietina 1
Ang-2	Angiopietina 2
ANOVA	Análise de variância
COX-2	Cicloxigenase 2
CT	Colesterol total
D	Dimensão fractal
DBC	Delineamento em blocos casualizados
D _{bc}	Dimensão de box-counting
D _i	Dimensão de informação
DC	Dieta controle
DHA	Ácido docosahexaenóico
DLA	Difusão limitada por agregação
EM	Energia metabolizável
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
HDL	Lipoproteínas de densidade alta
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa

MCA	Membrana corioalantóide
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
MV	Membrana vitelina
N-3	Ômega-3
N-6	Ômega-6
N-9	Ômega-9
NRC	National Research Council
OP 2%	Dieta Óleo de Peixe 2%
OP 4%	Dieta Óleo de Peixe 4%
OS 2%	Dieta Óleo de Soja 2%
OS 4%	Dieta Óleo de Soja 4%
PB	Proteína bruta
PDGF	Fator de crescimento derivados de plaquetas
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
PGE	Prostaglandinas
TG	Triglicerídeos totais
TGF- α	Fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
UV	Ultra-violeta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O sistema vascular está envolvido no crescimento e proliferação celular normal e patológica, nos processos de reparação de tecidos e nos distúrbios circulatórios. Este sistema responde diretamente aos fatores inibitórios, moduladores e estimulantes com regressão, proliferação e remodelação da microvasculatura, alterando a dinâmica do fluxo sanguíneo e, portanto, modificando o aporte de oxigênio e nutrientes aos diversos tecidos do organismo.

A forma como os fatores de estímulo, modulação e inibição atuam sobre o processo de crescimento vascular tem sido estudada, buscando-se compreender a interação entre estes diferentes fatores e suas implicações para o metabolismo celular. Dentre os fatores que interferem na dinâmica do crescimento vascular estão os lipídios e seus derivados, que começam a ser caracterizados.

Na avaliação desse processo de crescimento está na utilização de modelos *in vivo* como a membrana vitelina de embriões de aves, devido a sua acessibilidade a observação e experimentação. Uma forma de verificar alterações na estrutura vascular é avaliando sua complexidade através da geometria fractal, que permite quantificar o crescimento dos vasos na membrana pela ação dos fatores de estímulo e inibição da proliferação das células endoteliais. Essa quantificação é feita através da segmentação dos vasos e de suas ramificações sobre a superfície da membrana vitelina e posterior análise fractal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídios e sua importância nos mecanismos celulares

Os lipídios são definidos como um grupo heterogêneo de compostos quimicamente diferentes entre si que possuem como característica definidora e comum a sua insolubilidade em água. De acordo com a função que desempenham, são classificados em:

- ✓ Lipídios de reserva - sob a forma de triacilgliceróis;

- ✓ Lipídios estruturais de membrana - como os fosfolipídios, esfingolipídios e esteróis;
- ✓ Lipídios que atuam como sinalizadores, co-fatores e pigmentos - a exemplo das prostaglandinas, eicosanóides, hormônios esteróides e carotenóides.

Os triacilgliceróis (ou triglicerídeos) contêm três moléculas de ácidos graxos (AG) esterificando as três hidroxilas do glicerol, sendo primariamente gorduras de reserva, estando presentes em muitos alimentos. Os esteróis são componentes estruturais presentes na maioria das biomembranas, sendo o colesterol o principal representante deste grupo nos tecidos animais. Esteróis similares são encontrados em outros eucariotos, como o estigmasterol em vegetais e o ergosterol em fungos. Uma vez que os lipídios são essencialmente insolúveis em água, eles são transportados no plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas plasmáticas – complexos macromoleculares de proteínas transportadoras específicas denominadas apolipoproteínas, que se combinam de distintas maneiras com moléculas de fosfolipídios, colesterol, ésteres do colesterol e triglicerídeos (LEHNINGER, 2006).

De acordo com Santos (2001) as lipoproteínas são classificadas em quilomicrons (maiores, menos densas, ricas em triglicerídeos e de origem intestinal), lipoproteínas de densidade muito baixa ou VLDL (de origem hepática, possuem altas concentrações de triglicerídeos e concentrações moderadas de colesterol e fosfolipídios), lipoproteínas de densidade intermediária ou IDL (resultam da remoção de grande parte dos triglicerídeos da VLDL), lipoproteínas de densidade baixa ou LDL (resultantes da remoção de triglicerídeos da IDL, com concentrações de colesterol e fosfolipídios elevadas), lipoproteínas de densidade alta ou HDL (contem altas concentrações de proteínas e baixas concentrações de colesterol e fosfolipídios).

O resultado da hidrólise dos triglicerídeos são os ácidos graxos. Nas aves os AG são absorvidos diretamente para o sangue e deste passam ao sistema porta-hepático. Os triglicerídeos e o colesterol que excedem as necessidades dos hepatócitos são utilizados para a síntese das VLDL. À medida que essas lipoproteínas circulam pelos capilares extra-hepáticos os triglicerídeos são hidrolisados pelas lipoproteínas e dão origem as IDL. Uma fração destas retorna ao

tecido hepático e o restante, sofre nova remoção de parte de triglicerídeos e dá origem as LDL (FURLAN e MACARI, 2002). Já nos mamíferos, os quilomicrons são transportados pelo sistema linfático e atingem a corrente sanguínea (SPECTOR, 1984).

Já as partículas de HDL são formadas no plasma e no compartimento extra-vascular (SANTOS 2001). A HDL é uma classe de lipoproteínas com capacidade de interagir com as células na vascularização sistêmica, revertendo a disfunção celular do endotélio, estimulando a produção de prostaciclina, diminuindo a agregação plaquetária, inibindo a apoptose celular do endotélio e a oxidação do LDL, possuindo efeito antiaterogênico, dentre outras funções (TOTH, 2004). Através do transporte reverso a HDL carrega o colesterol até o fígado, onde o mesmo será eliminado (SANTOS 2001). Nas aves, a principal via de eliminação do colesterol é o ovo (NABER, 1990).

2.2 Características das codornas japonesas

A codorna japonesa (*Coturnix japonica*) pertence a família fasianidae e é considerada uma espécie distinta da codorna comum (AINSWORTH et al., 2010). Essa ave apresenta dimorfismo sexual, caracterizado pela presença de pintas pretas na região peitoral das fêmeas, inexistentes nos machos. Esta diferenciação só pode ser feita após os 14 dias de vida, quando inicia o desenvolvimento das penas dessa região. Na codorna japonesa, as fêmeas são ligeiramente mais pesadas do que os machos e possuem o aparelho reprodutivo bastante desenvolvido, podendo chegar a 10% do seu peso vivo (VILLELA, 1998).



Figura 1. Exemplos de codorna japonesa (*Coturnix japonica*). Macho (E) e fêmea (D).

Essa espécie apresenta maturidade sexual aos quarenta e dois dias nas fêmeas e aos quarenta e oito dias nos machos. É uma ave resistente, que se adapta a regiões de climas quente ou frio, tendo como condição de conforto a temperatura entre 21 e 25°C (ALBINO e NEME, 1998). Apresenta alta produtividade (média de 300 ovos/ano), com grande longevidade de produção (12 meses) e pico de produção da 10^a a 24^a semana de idade (ALBINO e NEME, 1998; PINTO et al., 2002).

A primeira menção da codorna como um modelo experimental em pesquisas foi feita por Padgett e Ivey (*apud* AINSWORTH et al., 2010), devido à sua rusticidade, facilidade de manuseio e precocidade. Desde então, a codorna configurou-se como um modelo comum para uma série de investigações, incluindo investigações comportamentais, ambientais e sobre desenvolvimento, sendo atualmente utilizada de forma ampla nesses tipos de estudos, principalmente aqueles relacionados ao desenvolvimento da crista neural, tireóide, coração, dentre outras estruturas (CHEN et al., 2008; EAMES e SCHNEIDER, 2008; HOGERS et al., 2009; QUINN et al., 2009; ROWAN-HULL et al., 2009). O período de incubação da codorna japonesa é de aproximadamente 16 dias (AINSWORTH et al., 2010).

2.3 Membrana vitelina

O ovo é uma estrutura complexa física e quimicamente, por ser responsável em fornecer proteção e condições de sobrevivência para o embrião. É formado basicamente por quatro componentes, entretanto não há homogeneidade química

ou estrutural entre eles: a gema, a clara, as membranas (calazas) e a casca (REIZIS; HAMMEL; AR, 2005).

O processo de formação do ovo envolve o transporte de grande quantidade de nutrientes através de numerosas membranas biológicas como também a formação de muitos lipídios e proteínas específicas. Os fatores genéticos, ambientais e fisiológicos afetam o tamanho e a composição dos ovos. Segundo Reis (1980), em codornas a aparição do primeiro ovo fértil ocorre 18 a 20 horas após a cópula, permanecendo viável para incubação por um período de 5 a 10 dias. A viabilidade dos espermatozoides das codornas machos é considerada ótima de um a cinco dias e regular de 6 a 10 dias.

No ovo fecundado, a primeira clivagem ocorre logo que o ovo atinge o istmo (local onde se forma a membrana da casca do ovo), mais ou menos três horas depois da fertilização. Após a oviposição, os ovos das aves devem ser incubados para prosseguirem seu desenvolvimento embrionário. Concomitantemente com o desenvolvimento do embrião, ocorre uma extensão dos seus folhetos (endoderme, mesoderma e exoderme), iniciando a formação dos anexos embrionários. No início da formação não há limite visível entre o embrião e seus anexos (saco vitelino, córion, alantóide e âmnio), pois esses limites começam a aparecer com o dobramento do embrião e sua elevação sobre a gema (GARCIA e FERNÁNDEZ, 2001).

O saco vitelino é o único nicho e fonte de células para a eritropoiese primitiva, sendo o único tecido extra-embrionário existente antes da formação do âmnio, córion e alantóide. Para comodidade da descrição embriológica e da manipulação, o blastoderma inicial do embrião é separado em área pelúcida e área opaca com base na aparência opaca de células da endoderme da região externa com abundantes grânulos de vitelo intracelular e gema acelular em anexo (Fig. 2C e D). Dependendo da extensão da invasão de células do mesoderma, a área opaca é dividida em área vascularizada, área vitelina e margem de super-crescimento. A margem de super-crescimento, localizado na região periférica contém um tipo especial de células do ectoderma responsável por manter a tensão do epiblasto.

A área vitelina é a região do saco vitelino, que ainda não contém células do mesoderma. A área vascularizada, o local onde ocorre a hematopoese e vasculogênese no saco vitelino, está marcada lateralmente pela extensão da invasão do mesoderma extra-embrionário (Fig. 2B e D). Medialmente, a área vascularizada é

contínua com regiões vasculares na zona pelúcida e se expande lateralmente para substituir a área vitelina. Quando a circulação começa (Fig. 2C e D) a área vascular ocupa apenas uma pequena parte do saco vitelino, enquanto que a margem de super-crescimento já se expandiu para a região equatorial. Posteriormente, a área vascular atinge a região equatorial e a área vitelina recobre a maior parte do vitelo (Fig. 2A e B).

Com o desenvolvimento embrionário, a área vascular abrange toda a gema e área vitelina desaparece. A eritropoiese inicial do saco vitelino ocorre no mesoderma extra-embrionário, antes da expansão do celoma extra-embrionário e da invasão do alantóide, e neste contexto, abrange as três camadas germinativas (SHENG, 2010).

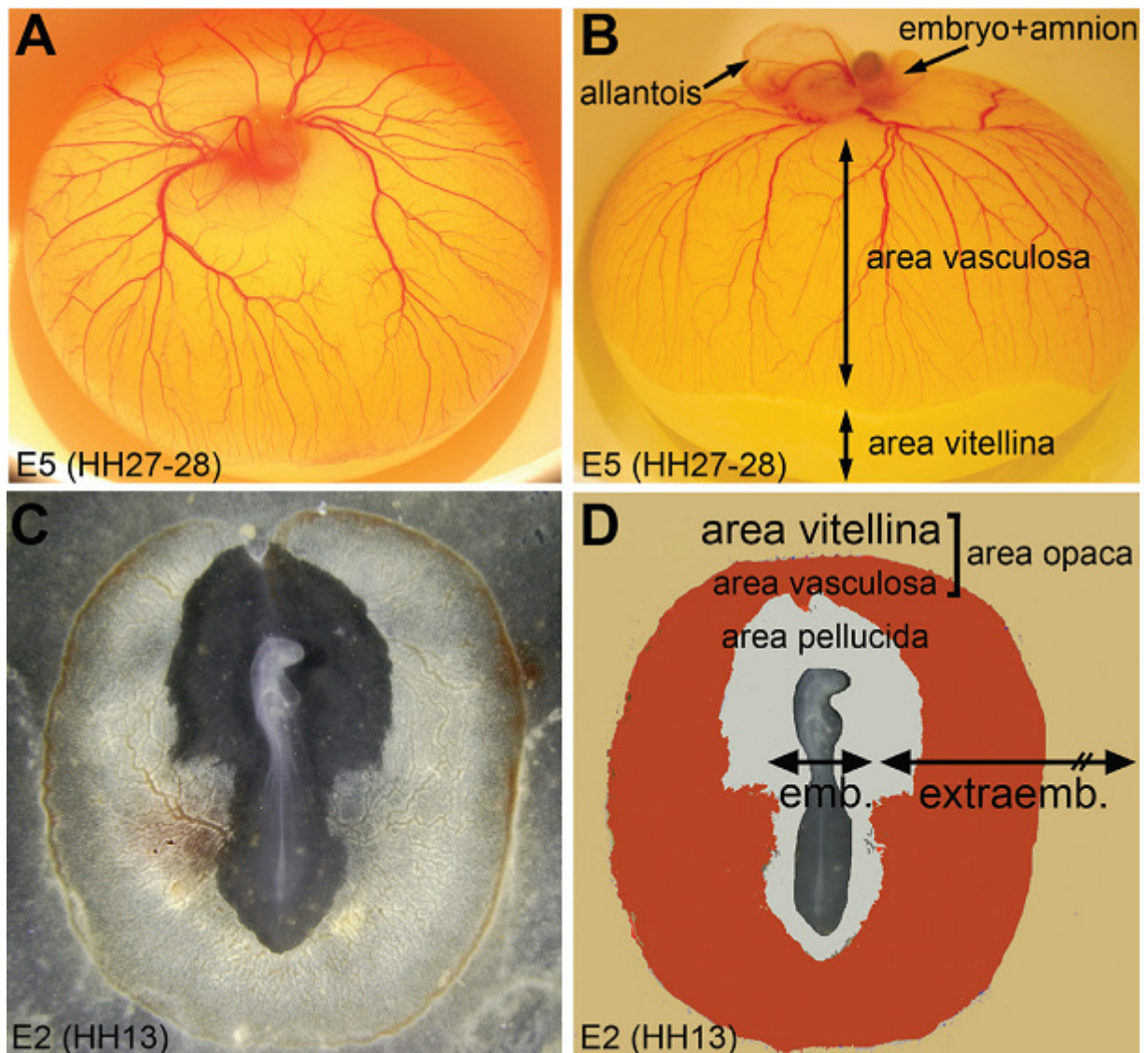


Figura 2. Organização geral de tecidos extra-embrionários de uma ave. (A, B) embrião E5 (horas de incubação). (C, D) embriões E2 (horas de incubação). (A) Vista superior de um embrião E5 antes de

romper a membrana vitelina e córion. (B) vista lateral-superior após a remoção parcial da membrana vitelina e córion para revelar o embrião propriamente dito (com o âmnio) e alantóide. Nesta fase, a área vascular atingiu o equador e a área vitelina atingiu o pólo oposto (não visualizado aqui). (C) vista de cima de um embrião E2, mostrando a zona pelúcida e área vascular. (D) diagrama esquemático de (C) (SHENG, 2010).

Após 72 horas de incubação o alantóide já pode ser visualizado e entre o 3º e o 4º dia de incubação essa estrutura torna-se mais evidente, por assumir uma forma vesicular (AINSWORTH et al., 2010). A eritropoiese tardia ocorre nos tecidos derivados do mesoderma esplâncnico adjacente ao endoderma do saco vitelino. O alantóide cresce rapidamente e a porção distal começa a se fundir com o córion, formando assim o alantocóron ou membrana corioalantóide. A porção proximal da parede do alantóide se funde com a membrana amniótica e com o saco vitelino, nos estágios finais de desenvolvimento das membranas extra-embrionárias (SHENG, 2010). Enquanto a membrana vitelínica organiza-se já no primeiro dia de incubação do ovo, a membrana corioalantóide sofre intensa vascularização entre o 4º e o 8º dia do desenvolvimento embrionário (DIAS et al., 2002).

A membrana vitelina (MV) das aves é formada a partir de secreções emitidas pelo epitélio folicular e oviduto. Essa membrana consiste de uma membrana interna (MI), que é derivada de membrana colágena que se encontra no epitélio do folículo. A membrana externa (ME) da MV é provida pelas secreções de mucina do oviduto. A ME é fibrosa e composta de uma malha de sólidas fibras cilíndricas. A MI também é fibrosa e formada de várias subcamadas que repousam umas sobre as outras. As subcamadas são constituídas de fibrilas que se expandem nas áreas de contato. Entre as camadas externa e interna há uma camada contínua que permanece unida a ME quando separadas e apresenta uma estrutura semelhante a folhas (CHUNG; LAI; HSU, 2010).

2.4 Vasculogênese e angiogênese

O sistema vascular, tanto embrionário quanto adulto, possui a capacidade de sofrer remodelação por estímulo sangüíneo ou metabólico. Entre os processos de remodelagem da vascularização é possível distinguir dois diferentes mecanismos de formação de novos vasos sangüíneos: a vasculogênese e a angiogênese (BECK; D'AMORE, 1997; CONWAY et al., 2001).

A vasculogênese é descrita como o processo de formação dos vasos sanguíneos e ocorre nos vertebrados durante o desenvolvimento embrionário, quando células mesodérmicas provenientes da parede do saco vitelino se agrupam, formando as primeiras ilhotas sanguíneas (Fig. 3A e B). Posteriormente as células que se encontram no interior das ilhotas se diferenciam em células hematopoiéticas e as que se encontram na região periférica das ilhotas se diferenciam em células endoteliais, as quais formam as primeiras estruturas tubulares, formando plexos capilares primitivos (BUSCHMAN; SHARPER, 1999; SENEGAGLIA et al., 2009).

Com o desenvolvimento do sistema vascular ocorre a angiogênese, também chamado neovascularização, um processo que pode ser descrito como a formação de novos vasos derivados da vasculatura pré-existente (Fig. 3C). As principais células envolvidas nesse processo são as células endoteliais, das quais são gerados todos os vasos sanguíneos e constituem virtualmente a totalidade dos capilares.

Para atingir a formação de novos vasos sanguíneos, as células endoteliais inicialmente escapam de sua localização, atravessando a membrana basal. Uma vez alcançada esta etapa, as células endoteliais migram em direção a um estímulo angiogênico. Esse processo é determinado e regulado por inúmeros sinais e fatores de crescimento, em um complexo conjunto de eventos.

Após a migração, as células endoteliais proliferam para prover o número de células necessário para formar o novo vaso. Subsequente à proliferação, a nova extensão das células endoteliais precisa se reorganizar dentro de uma patente estrutura tubular tridimensional. Cada um desses elementos, ruptura da membrana basal, migração celular, proliferação celular e formação do tubo pode ser alvo de intervenções, que podem ser feitas *in vitro* (AUERBACH; AUERBACH, 1994; BUSCHMANN; SCHAPPER, 1999; AUERBACH et al., 2003; GRIZZI et al., 2005; DING et al., 2006).

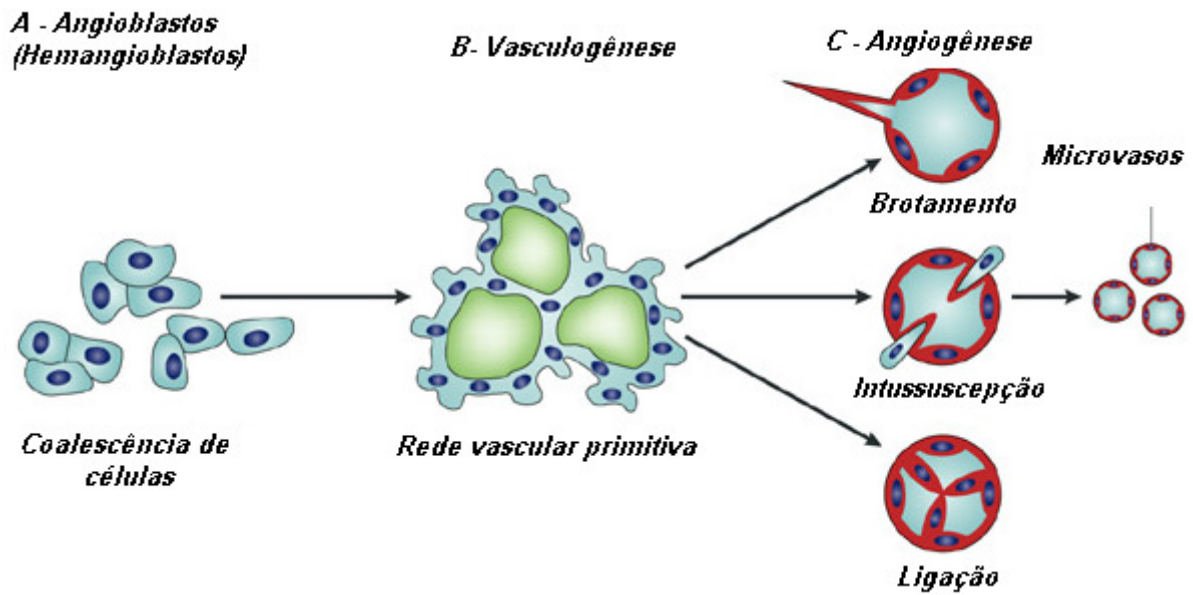


Figura 3. Esquema da vasculogênese e angiogênese, mostrando como os precursores (angioblastos e hemangioblastos) coalescem e se diferenciam em células endoteliais (A), e formam uma rede vascular primitiva (vasculogênese) (B). O remodelamento dessa rede ocorre através da angiogênese (C), que envolve brotamento, intussuscepção e/ou ligação, resultando na formação de microvasos. Traduzido de Hendrix et al. (2003).

A angiogênese ocorre naturalmente no organismo saudável durante o processo de cicatrização e para restabelecimento do fluxo sanguíneo nos tecidos após uma injúria e em fêmeas durante o ciclo reprodutivo. Em muitas doenças graves, como em alguns tipos de câncer e outras patologias que afetam o sistema cardiovascular o organismo perde o controle da angiogênese. Estas patologias que são dependentes do processo de angiogênese ocorrem quando os novos vasos crescem de forma excessiva ou insuficiente (DIAS et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2008; MELO-REIS et al., 2010).

Um exemplo de patologia associada ao crescimento vascular exacerbado é o câncer. O termo câncer é utilizado genericamente para representar um conjunto de mais de 100 doenças, incluindo tumores malignos de diferentes localizações. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) o câncer representa importante causa de doença e morte da população humana no Brasil, e desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) (BRASIL, 2009). Esse tipo de patologia é observado tanto em seres humanos quanto em animais. O processo pelo

qual o câncer se desenvolve é denominado de carcinogênese, onde diversas evidências demonstraram que em humanos e possivelmente em outras espécies animais, este seja um processo de múltiplos passos que refletem alterações genéticas (e epigenéticas) que direcionam a transformação progressiva de células normais em derivados altamente malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A formação de vasos sanguíneos que promovem o suprimento vascular do tumor permite o crescimento acelerado do mesmo, uma vez que a oferta de nutrientes e oxigênio eleva-se, há uma maior permeabilidade do vaso recém-formado a fatores de crescimento vascular e ainda maior superfície de escape de células tumorais para a circulação (FERRARA, 2004), indicando que o fenômeno de metástase é dependente da angiogênese intratumoral (BOCKHORN; JAIN; MUNN, 2007; RUDDON, 2007).

A célula cancerígena adquire a capacidade de auto-suficiência em sinais de crescimento, perde sua capacidade apoptótica, seu potencial de replicação se torna ilimitado, adquire capacidade de invadir tecidos, causando metástase, e envia sinais de crescimento para vascularização para a obtenção de um suprimento independente de nutrientes e oxigênio (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

A regulação do processo de angiogênese é feita por uma série de fatores estimulantes e inibidores, que interagem de forma complexa na formação da rede vascular (Quadro 1). Alguns desses fatores já foram bem estudados, através do sequenciamento de aminoácidos e clonagem desses fatores. Esses polipeptídios incluem os fatores de crescimento de fibroblastos ácidos e básicos (FGF) fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fatores de transformação do crescimento alfa e beta (TGF- α e - β), fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), angiopoietinas (Ang-1 e Ang-2), angionina, interferon alfa e beta (IFN- α e - β), dentre outros. Os fatores angiogênicos mais freqüentemente encontrados em tumores são o FGFb, o VEGF e o PDGF (SENGUPTA et al., 2003).

Quadro 1. Moléculas envolvidas na sinalização celular e no processo de formação vascular e seus mecanismos de ação.

Molécula	Mecanismo de ação
VEGF	Auto-regulação de proteases para organização da matriz celular Aumento da permeabilidade Estabilidade dos vasos

	Supressão da apoptose das células endoteliais (CE) Indução de especialização das CE
FGF	Estimula a proliferação de CE Promove a migração das CE Regula a adesão das CE Modula a expressão de receptores de integrinas Aumentar a expressão do VEGF
PDGF	Promove proliferação, migração e recrutamento de células murais (CM) Manutenção dos vasos sanguíneos
Ang 1	Estabilidade dos vasos pela facilitação da interação CE - CM e CE - matriz Supressão da apoptose das CE Indução da organização hierárquica da ramificação vascular na ausência de CM Coordena a polaridade vascular
Ang 2	Induz apoptose das CE na ausência de VEGF Coordena a polaridade vascular
TGF-α	Promove proliferação e migração de células de origem epidermal Estimula a proliferação de CE de microvasos
TGF-β1	Promove produção de CE e proteases Promove diferenciação dos fibroblastos Regula proliferação e migração das CE Regula maturação dos vasos
AA	Ativa o fator nuclear de transcrição kB Induz a resposta inflamatória
EPA e DHA	Inibe o FNkB Suprime a síntese de Ang2 Aumenta a expressão de TGF- β 1

O papel da angiogênese na progressão do tumor primário e sua associação com metástases hematogênicas e sobrevida tem sido extensivamente estudado, principalmente no carcinoma de mama, tumores de pulmão, trato gastrointestinal e geniturinário, demonstrando associação significativa entre a intensidade da neovascularização e um pior prognóstico (WEIDNER; HARRIS; DIRIX, 1991; DICKINSON et al., 1994).

Outros fatores angiogênicos menos caracterizados têm sido isolados, dentre eles, os lipídios e seus derivados, como o ácido aracdônico (AA), o ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosahexaenóico (DHA) e as prostaglandinas (PGE). O papel dos lipídios na angiogênese está apenas começando a ser definido (FIERRO; KUTOK; SERHAN, 2002; KERMORVANT-DUCHEMIN et al., 2005).

Stoltz, Abraham e Schwartzman (1996) identificaram a ação do citocromo P450 derivado do ácido hidroxieicosatrienóico como estimulante do processo de neovascularização, enquanto Nie et al. (2000) mostra regulação da resposta angiogênica pela lipoxigenase-12.

2.5 Ácidos graxos poliinsaturados e ativação endotelial

Os ácidos graxos são moléculas de cadeia linear com número par de carbonos, provenientes de óleos e gorduras vegetal e animal e estão presentes na dieta sob a forma de triacilgliceróis, sendo estes geralmente de cadeia longa. Os ácidos graxos que apresentam uma dupla ligação na cadeia carbônica são denominados insaturados e aqueles que apresentam mais de uma dupla ligação, poliinsaturados (PUFA – do inglês *polyunsaturated fatty acids*). Existem três importantes famílias de ácidos graxos insaturados, cuja nomenclatura refere-se à posição da primeira dupla ligação, a partir do terminal metil da cadeia carbônica: ômega-3 (n-3), ômega-6 (n-6) e ômega-9 (n-9). (BELITZ; GROSCH, 1987; CALDER, 1996).

O perfil dos ácidos graxos dos fosfolipídios das membranas biológicas reflete o tipo de AG ingerido. Assim, as funções metabólicas associadas a essas membranas podem ser moduladas pelo lipídeo presente na dieta (ARAYA; AGUILERA; BOSCO, 1991). Uma vez ingeridos, os ácidos graxos essenciais podem sofrer uma série de reações para síntese de PUFA de cadeia longa. Neste processo, estão envolvidas enzimas de dessaturação e de alongação (Fig. 4). A dessaturação é caracterizada pela introdução de uma dupla ligação na cadeia de carbono e a alongação, pela introdução de dois novos átomos de carbono (CALDER, 1997; 1998a).

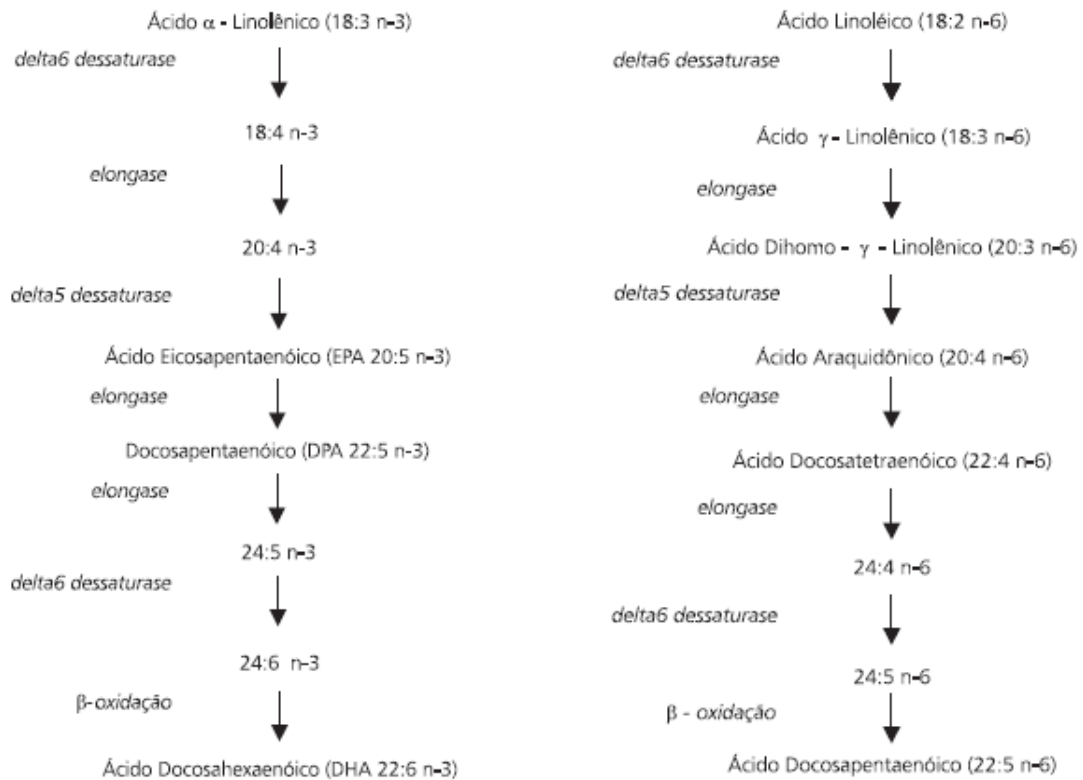


Figura 4. Metabolismo dos ácidos graxos essenciais. Vaz et al., 2006.

Os PUFA que compõem a família n-6 são encontrados na maioria das sementes e vegetais, como milho, girassol, açafrão e soja, enquanto os da família n-3 podem ser encontrados nos óleos de canola, linhaça, noz, plantas com coloração verde-escura e no óleo de peixes, principalmente naqueles provenientes das regiões polares (CALDER, 1996; BARTSCH; NAIR; OWEN, 1999). Esses ácidos graxos são considerados essenciais, pois o organismo animal não consegue sintetizá-los devido a ausência das dessaturases e elongases responsáveis pela conversão em PUFA de cadeia longa, sendo esta capacidade de síntese restrita ao reino vegetal (CALDER, 1997, 1998b, 2001, SIMOPOULOS, 2002).

Sim, Bragg e Hodgson (1973), realizando experimentos com galinhas poedeiras, verificaram que variações na fonte de óleo que compunha a dieta de animais adultos interferiram sobre a composição da gema dos ovos desses animais, bem como nas atividades metabólicas relacionadas aos tecidos adiposo e hepático.

Alparslan e Ozdogan (2006) não verificaram efeito da suplementação dietética com 2% e 4% de óleo de peixe sobre os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos de frangos de corte. Embora os níveis de colesterol e triglicerídeos das aves do grupo controle fossem ligeiramente maiores do que nos grupos que

receberam suplementação com PUFA n-3, essas diferenças não foram significativas. O HDL médio das aves que receberam suplementação com 2% de óleo de peixe (2,069 mmol/L) foi semelhante aquele observado nas aves do grupo controle (1,888 mmol/L). Entretanto houve diferença significativa entre o HDL deste último e das aves que receberam suplementação com 4% de óleo de peixe (2,112 mmol/L).

Safamehr, Aghaei e Mehmannaavaz (2008) também utilizando frangos de corte submetidos a dietas com diferentes níveis de óleo de peixe (0, 2, 3 e 4%) verificaram que não houve efeito da concentração de n-3 sobre os níveis de triglicerídeos (0,663 mmol/L, 0,680 mmol/L, 0,605 mmol/L, 0,515 mmol/L, respectivamente) e colesterol total (3,578 mmol/L, 3,624 mmol/L, 3,672 mmol/L e 3,042 mmol/L, respectivamente). Entretanto, o aumento dos níveis de HDL séricos das aves foi significativo nos grupos que receberam suplementação de PUFA em níveis de 2% (0,604 mmol/L), 3% (0,588 mmol/L) e 4% (0,882 mmol/L) em relação ao que não recebeu suplementação com óleo de peixe (0,404 mmol/L).

Navidshad, Deldar e Pourrahimi (2010) observaram que a suplementação com 7% de óleo de peixe promoveu redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis de colesterol sérico das aves deste grupo (1,301 mmol/L) quando comparado ao grupo controle (1,391 mmol/L). Efeito oposto ao observado para os níveis de HDL dos referidos grupos, onde se obteve uma maior concentração dessa lipoproteína nas aves do grupo OP 7% (3,119 mmol/L) em relação ao grupo controle (2,475 mmol/L). Não foi observado influência da suplementação com n-3 sobre os níveis de triglicerídeos séricos do grupo tratado (0,568 mmol/L) em relação ao controle (0,607 mmol/L).

A inclusão de óleo de peixe em diferentes concentrações nas formulações de rações para codornas japonesas proporcionou um aumento percentual colesterol HDL, e redução do colesterol LDL na gema do ovo, de forma dose-dependente. Entretanto, a presença do óleo de peixe em concentrações de 2,5 e 5% na ração não produziu alterações significativas nos níveis de triacilglicerídeos no ovo (FERREIRA, 2002).

Dewailly e colaboradores (2003) realizaram um estudo buscando verificar se havia correlação entre o consumo de peixe e as concentrações plasmáticas de fosfolípidios dos ácidos graxos n-3, em especial de EPA e DHA, entre 3 amostras representativas da população canadense (Québec, James Bay Cree e Inuit de Nunavik). Estes autores observaram que houve uma associação positiva entre as

concentrações de EPA + DHA e colesterol HDL, quando o consumo de EPA + DHA era igual ou superior a 4,04%. Uma relação inversa foi encontrada para os níveis de triacilgliceróis, indicando que o aumento do consumo de peixe como fonte de n-3 ácidos graxos é vantajosamente associado com níveis de HDL colesterol e triglicerídeos.

Em estudo comparativo sobre os efeitos de ácidos graxos saturados e poliinsaturados sobre alterações do perfil metabólico e a relação dessas alterações metabólicas sobre o estresse oxidativo no tecido cardíaco, observou-se que o grupo de animais que receberam ácidos graxos saturados (AGS) apresentou maiores níveis de triglicerídeos, colesterol LDL e maior relação colesterol: HDL (índice aterogênico) quando comparados aos grupos controle e do PUFA. Apesar dos efeitos benéficos do PUFA n-3 da dieta sobre os lipídios, observou-se aumento da liperoxidação no miocárdio e hidroperóxido lipídico e redução da superóxido desmutase e da catalase. Os PUFA aumentaram os níveis de triglicerídeos e reduziram as concentrações de glicogênio no tecido miocárdico. As relações entre lactato desidrogenase e citrato sintase e entre β -hidroxiacil coenzima-A desidrogenase e citrato sintase foram aumentadas, indicando redução do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) no tecido cardíaco (DINIZ et al., 2004).

A proliferação de células endoteliais vasculares, migração e formação de capilares são estimuladas por fatores de crescimento angiogênico, que incluem as proteínas do VEGF, TGF- β , e eicosanóides que derivam dos ácidos graxos poliinsaturados n-6. O aumento da ingestão de EPA e DHA resulta no correspondente aumento dos PUFA n-3 nos tecidos e lipídios circulantes com simultânea redução de PUFA n-6, como o ácido γ -linolênico e o ácido aracdônico (DEWAILLY et al., 2001; 2003).

Os eicosanóides são potentes reguladores da função celular e, portanto, podem ser produzidos em quase todas as células do organismo, tendo função parácrina e autócrina (MARKS; MARKS; SMITH, 1996). O AA e EPA são PUFA que constituem os fosfolipídios das membranas biológicas (ROSE; CONNOLLY, 1999; TAPIERO et al., 2002).

O DHA é considerado o ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa mais importante no desenvolvimento neonatal e juntamente com o AA são os principais componentes dos ácidos graxos cerebrais (CORRIA, 2001; VALENZUELA; NIETO, 2003). Esses ácidos compõem a cascata de formação de outros mediadores

químicos pró-inflamatórios, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (O'SHEA; BASSAGANYA-RIERA; MOHEDE, 2004), e podem reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (NARAYANAM et al., 2003). A iNOS possui correlação positiva com a expressão da cicloxigenase 2 (COX-2) e com a angiogênese (CIANCHI et al., 2003; 2004).

Algumas desordens caracterizadas pela inflamação exacerbada e formação excessiva de mediadores inflamatórios estão entre as causas mais importantes de morte e debilidade no homem da sociedade moderna (SIJBEN; CALDER, 2007). Além disso, as doenças crônicas são freqüentemente associadas com anormalidades no metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados: doença coronariana, hipertensão, diabetes, câncer e desordens auto-imunes, eczema atópico, depressão, esquizofrenia, Alzheimer, esclerose múltipla, etc. (ZAMARIA, 2004). O reconhecimento de que o PUFA ômega-3 possui potencialidade de inibir a resposta inflamatória excessiva tem levado a um grande número de estudos clínicos com o uso desses PUFA em condições inflamatórias bem como em indivíduos saudáveis (SIJBEN; CALDER, 2007).

A Associação Americana do Coração (American Heart Association – AHA) concluiu que ao menos 5 - 10% do total do consumo energético (aproximadamente 12 – 22 gramas/ dia) deveria ser de PUFA ômega-6 para manutenção da saúde do coração. Também foi observado que quando a gordura saturada na dieta é substituída por ácidos graxos poliinsaturados ômega-6, os níveis de colesterol no sangue decrescem, o que pode ser uma das razões pelas quais o consumo de PUFA ômega-6 é saudável para o coração (HARRIS et al., 2009). A Associação Dietética Americana e dos Nutricionistas do Canadá recomendam 3 - 10% do total de calorias de PUFA ômega-6 e 0,6 – 1,2% de PUFA ômega-3 na dieta (KRIS-ETHERTON et al., 2007).

Embora existam inúmeras evidências dos efeitos benéficos dos PUFA-3 na vasculatura arterial e no tecido miocárdico (SCHMIDT et. al, 1999), outros estudos posteriores mostram a existência de alterações desfavoráveis desses ácidos graxos sobre o tecido cardíaco (DINIZ et al., 2004).

Dietas com maior teor de óleo de peixe induzem redução significativa no crescimento tumoral do colón de reto (RAO et al., 2001; COLEMAN et al., 2002; DAVIDSON et al., 2004), bem como da vascularização tumoral mamária em ratos

(HARDMAN et al., 2001; MUKUTMONI; HUBBARD; ERICKSON, 2001; COLAS et al., 2006). Também se verificou efeito anti-neoplásico dos PUFA n-3 em linfoma (KINSELLA; BLACK, 1993) e ainda em carcinoma cervical humano (SAGAR; DAS, 1995).

Suplementação dietética com PUFA n-3 possui um efeito anti-angiogênico em processos patológicos da retina. Connor e colaboradores (2007) observaram efeito supressor da neovascularização patológica em retina de ratos submetidos à retinopatia induzida por oxigênio que receberam suplementação dietética com óleo de peixe.

Um possível mecanismo de controle do crescimento vascular pelos PUFA n-3 e n-6 pode ser a modulação da produção do VEGF pela PGE₂. A adição de PUFA n-6 ou maiores níveis desses ácidos graxos aumenta a produção de VEGF em relação a dietas ricas em PUFA n-3, como observado por Blondeau e colaboradores (2007).

A ligação entre o consumo de PUFA n-6 e inflamação está no fato de que o AA, que pode ser formado pelo ácido linoléico (AL), está envolvido nos estágios iniciais da inflamação. Entretanto, o AA e o AL podem dar origem a moléculas antiinflamatórias, como por exemplo, nas células que formam o revestimento dos vasos sanguíneos, os PUFA ômega-6 tem propriedades anti-inflamatórias, suprimindo a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e interleucinas (HARRIS et al., 2009). Entretanto, é importante salientar que a maioria dos estudos que relacionam o PUFA n-6 com o crescimento tumoral e efeitos pró-angiogênicos utilizam óleos ricos em ácido linoléico, que não contém ou contém em pequena quantidade o ácido gama-linolênico, que também é um PUFA n-6, porém metabólitos do ácido linoléico.

A ligação entre o consumo de PUFA n-6 e inflamação está no fato de que o AA, que pode ser formado pelo ácido linoléico (AL), está envolvido nos estágios iniciais da inflamação. Entretanto, o AA e o AL podem dar origem a moléculas antiinflamatórias, como por exemplo, nas células que formam o revestimento dos vasos sanguíneos, os PUFA ômega-6 tem propriedades antiinflamatórias, suprimindo a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e interleucinas, bem como a angiogênese (HARRIS et al., 2009).

Uma vez que a proporção de PUFA presentes nas membranas celulares é fator determinante para o tipo de eicosanóide gerado, a redução de AA e da relação entre este último e o EPA levam a formação de eicosanóides da série ímpar,

derivados do EPA e suprimem a formação dos eicosanóides derivados do AA, como a PGE₂. Enquanto esta prostaglandina inibe a apoptose e induz a proliferação celular e a angiogênese (PAI et al., 2003), os eicosanóides derivados do EPA são menos reativos do que aqueles derivados do AA (ROYNETTE et al., 2004).

Devido a complexidade da formação da rede vascular, a quantificação deste processo pode ser feita por meio da geometria fractal, a qual possibilita quantificar estruturas e processos que não são adequadamente descritos pela geometria euclidiana.

2. 6 Geometria Fractal

A natureza é repleta de estruturas fractais, como é possível observar na costa litorânea de uma determinada região, na forma que um relâmpago se propaga num espaço tridimensional, no arcaçouço das arvores vasculares que compõem o organismo ou ainda, nas barreiras de energia que separam os diferentes estados conformacionais de uma estrutura protéica (MANDELBROT, 1967; ANSARI et al., 1985; KEIRSTEAD; HUBERMAN, 1987; CROSS et al., 1993; SCHULZE; HUTCHINGS; SIMPSON, 2008).

Sistemas euclidianos, também denominados não-fractais, apresentam dimensão euclidiana ou topológica inteira. Neste caso, a dimensão euclidiana do ponto é igual a zero, uma curva apresenta dimensão topológica igual a um, uma superfície possui dimensão igual a dois, e um volume apresenta dimensão igual a três. Assim, pode-se observar que essa dimensão se baseia em objetos regulares, suaves e diferenciáveis o que se torna sua principal limitação na caracterização de estruturas complexas e irregulares, que apresentam um comportamento não-linear, gerando padrões altamente complexos (PIRES; COSTA, 1992).

Uma alternativa que minimiza as limitações presentes na geometria euclidiana dos fenômenos irregulares da natureza é a geometria fractal que, ao contrário da euclidiana, não se baseia em objetos regulares e cujo valor de dimensão tende a ser fracionário, indicando que o sistema é fractal (SENESI, 1994). A dimensão fractal (D), definida aqui 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: $D = \log N / \log F$.

O termo fractal foi cunhado por Mandelbrot. Ele reuniu, criou e popularizou uma grande coleção de tais objetos. Esses objetos são caracterizados por suas propriedades que são: 1) auto-similaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo parecem com o 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 auto-similaridade e dependência de escala e 4) as propriedades estatísticas anômalas das grandezas fractais, que se caracterizam pela inexistência de medidas de centralidade e dispersão dos objetos e processos fractais (BASSINGTHWAIGHTE, LIEBOVITCH; WEST, 1994).

Objetos fractais podem ser gerados a partir de algoritmos recursivos, através dos quais é possível se obter curvas, funções ou formas que exibem propriedades fractais como o conjunto de Cantor ($D=0,6309$), a curva de Koch ($D=1,2618$), o triângulo de Sierpinski ($D=1,5850$) (Figs. 5, 6 e 7) (JURGENS; PEITGEN; SAUPE, 1993).

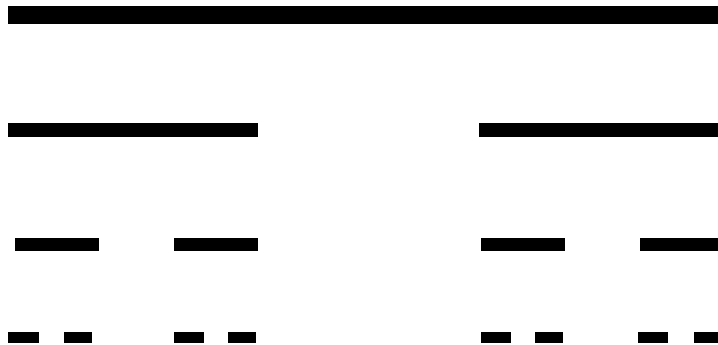


Figura 5. O conjunto de Cantor é obtido a partir de uma reta, onde se divide esta em 3 segmentos de igual medida. O terço médio da reta é retirado, obtendo-se dois segmentos de $1/3$ da reta anterior. A seguir aplica-se o mesmo procedimento a cada uma dessas retas, e se obtém 4 segmentos de retas de comprimento igual a $1/3$ da reta anterior. Assim, sucessivamente, o terço médio dos segmentos de retas vão sendo retirados, obtendo-se sempre dois novos segmentos de comprimento igual a $1/3$ da reta anterior.

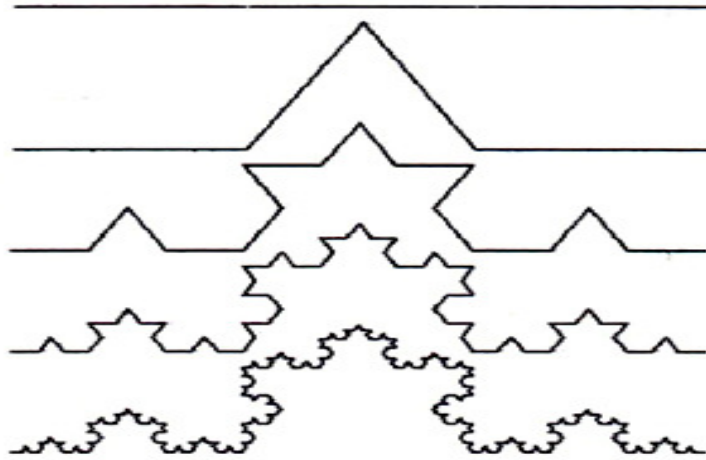


Figura 6. A curva de Koch é obtida aplicando-se sucessivamente o procedimento de dividir um segmento de reta em três partes iguais e construir um triângulo equilátero no terço central e desprezar a base

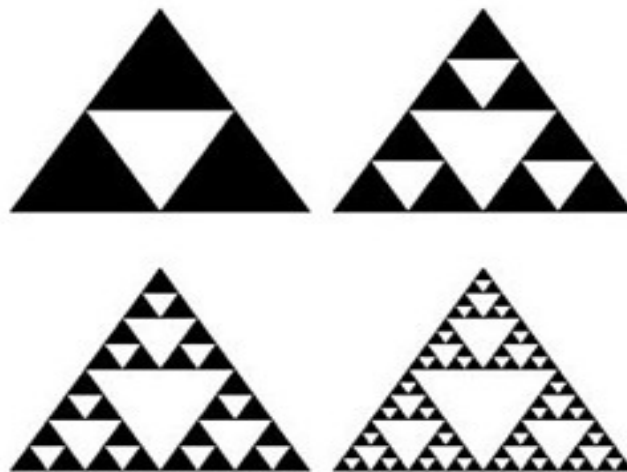


Figura 7. O triângulo de Sierpinski é obtido construindo um triângulo congruente, dentro de outro triângulo, com os vértices nos pontos médios.

Uma estrutura fractal bastante estudada e usada como modelo para descrever algumas estruturas físicas e biológicas é o DLA (difusão limitada por agregação) (Fig. 8). Esta estrutura fractal é construída a partir do seguinte procedimento: de um ponto qualquer de um círculo é liberada uma partícula que é adsorvida por uma partícula que se encontra no centro deste círculo. Quando a

partícula é adsorvida, uma nova partícula é liberada randomicamente de uma posição do círculo. Este processo vai sendo repetido um grande número de vezes e uma estrutura, denominada de DLA, bastante ramificada vai sendo formada (WITTEN; SANDERS, 1981).

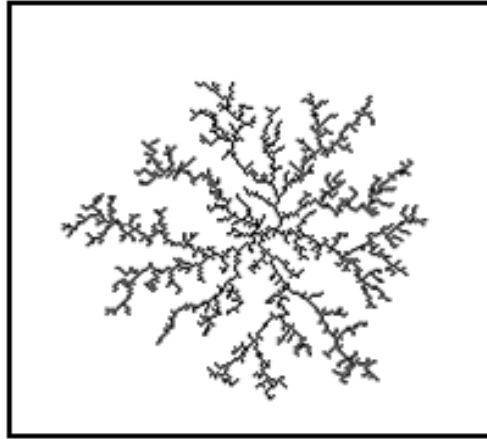


Figura 8. DLA com 2000 pontos, gerado em programa de linguagem C para uma grade de 300 x 300 pixels.

No modelo proposto por Kretzer et al. e Kretzer e Hittner (apud OLIVEIRA, 2006), a difusão dos fatores angiogênicos é o processo físico responsável pelo desenvolvimento dos padrões de vasos na retina, cuja dimensão fractal é semelhante aquela encontrada para o DLA, ou seja, $D \approx 1,7$ (MASTERS, 2004; ARAÚJO et al., 2004). Mainster et al. (1990), usando a dimensão de box-counting, mostraram que os padrões arteriais e venosos da retina humana tem dimensões fractais de $1,63 \pm 0,05$ e $1,71 \pm 0,07$, respectivamente, consistente com a dimensão do DLA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar, usando a teoria dos fractais, o processo de vascularização da membrana vitelina de embriões (MV) de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) submetidas a dietas com suplementação de diferentes fontes lipídicas.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar os efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6 sobre os níveis sanguíneos de triglicerídeos, colesterol total e HDL das aves dos grupos experimentais;
2. Usar a dimensão fractal para investigar possíveis efeitos dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6 sobre a vascularização da membrana vitelina dos embriões de codorna;
3. Verificar se o método utilizado para obtenção da dimensão interfere na avaliação do processo de crescimento vascular;
4. Verificar se há relação entre o perfil lipídico das aves e o processo de crescimento vascular na membrana vitelina dos embriões.

4 METODOLOGIA

4.1 Local e instalações

O experimento foi conduzido no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, Dois Irmãos, Recife – PE. As aves foram mantidas em uma sala de 3,4 m² e 3 m de pé direito, piso e paredes revestidos em cerâmica, 1 (um) condicionador de ar (12000 BTUs), 1 (um) exaustor, 2 (duas) lâmpadas fluorescentes. Este espaço foi lavado e sanitizado 10 (dez) dias antes da chegada das aves com solução de hipoclorito de sódio (1%).

4.2 Manejo dos animais

Inicialmente foram utilizadas 200 codornas japonesas (*Coturnix japonica*) sexadas, de 30 (trinta) dias, em perfeitas condições de saúde, oriundas da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina – Campus Avançado UFRPE (EEPAC/ UFRPE). As mesmas foram pesadas e em seguida, alojadas em gaiolas metálicas (100 x 30 x 20 cm), sobrepostas em cinco andares com quatro gaiolas cada. Cada gaiola foi equipada com comedouro e bebedouro tipo calha, e uma bandeja aparadora de fezes. As aves foram alojadas em uma densidade de cinco aves por gaiola, estando os machos separados das fêmeas. Durante o período de adaptação, as aves receberam ração crescimento (30g/ ave/ dia), água à vontade e submetidas a iluminação natural.

A partir dos 45 dias de idade, as aves passaram a receber ração postura (30 g/ ave/ dia) e água à vontade, sendo mantidas sob um programa de luz contínuo de 17 horas/ dia (artificial). A temperatura média da sala foi ajustada para 25°C.

4.3 Delineamento experimental

Após o estabelecimento da postura, 80 aves foram selecionadas e distribuídas em delineamento em blocos inteiramente casualizados (DBC), cinco tratamentos, quatro repetições para cada tratamento e quatro aves por unidade experimental, numa relação de 1 macho para 3 fêmeas.

4.4 Manejo alimentar

As aves foram alimentadas *ad libitum* e os tratamentos foram constituídos por quatro rações experimentais e uma ração referência, formuladas de acordo com as exigências para codornas em postura descritas no NRC (National Research Council, 1994), com exceção do cálcio, cujo nível foi descrito por Pereira, Barreto e Rostagno (2004). De acordo com o tratamento ao qual foram submetidos os grupos receberam a seguinte denominação: Dieta Controle (DC), Óleo de Peixe 2% (OP 2%), Óleo de Peixe 4% (OP 4%), Óleo de Soja 2% (OS 2%) e Óleo de Soja 4% (OS 4%).

Mesmo tendo composição diferente entre os grupos experimentais, as rações foram formuladas e confeccionadas para terem os mesmos níveis de proteína bruta (PB) e energia metabolizável (EM). Utilizamos como componentes das rações: milho grão, farelo de soja, fosfato bicálcico, calcário, suplemento vitamínico e mineral, cloreto de sódio, DL-metionina e L-lisina.

Inicialmente foi feita a análise da composição do óleo de pescado utilizado para a confecção das rações OP 2% e OP 4%, visando quantificar o teor de ácidos graxos do mesmo¹. Uma vez que o óleo de soja utilizado para a elaboração das rações OS 2% e OS 4% é de uso comercial, tomou-se como base da composição de ácidos graxos a informação constante na embalagem do mesmo (Tab. 1).

Tabela 1. Composição do óleo de pescado e de soja em relação ao teor de ácidos graxos.

Composição	Óleo de peixe	Óleo de soja
Ac. Graxos Saturados	3,58	16,67
Ac. Graxos Monoinsaturados	26,08	24,17
Ac. Graxos Poliinsaturados	6,92	59,17

A Dieta Controle foi utilizada visando obter uma estimativa da síntese de triacilgliceróis decorrentes do metabolismo dos constituintes da ração, não considerando o metabolismo direto dos óleos que normalmente são componentes dos grãos utilizados na ração. As dietas OP 2% e OP 4% foram formuladas, considerando-se a incorporação do óleo de peixe na dieta dos animais nas concentrações de 2% e 4%, para avaliar seus efeitos sobre a vascularização da

¹ Óleo de peixe gentilmente cedido pela Netuno Alimentos S/A.

membrana vitelina dos embriões das aves. As dietas OS 2% e OS 4%, ricas em PUFA n-6, foram preparadas de modo semelhante à OP 2% e OP 4%, respectivamente, utilizando-se, entretanto, óleo de soja. A formulação das rações foi feita utilizando-se o software SuperCrac v.5.4 da TDNet, Viçosa, MG (2002), conforme tabela 2.

Seguindo a formulação, após a pesagem dos ingredientes realizou-se a homogeneização dos mesmos com auxílio de misturador. Todas as rações foram rigorosamente tratadas da mesma forma para garantir a qualidade de preparo entre os grupos.

Tabela 2. Composição centesimal e nutricional das rações experimentais para codornas em fase de postura.

Tratamento	Controle	OP 2%	OP 4%	OS 2%	OS 4%
Componente					
Milho	52,75	52,73	52,73	52,73	52,73
Farelo de soja	35,62	34,47	34,47	34,47	34,47
Calcário calcítico	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46
Óleo de peixe	0,00	2,00	4,00	0,00	0,00
Óleo de soja	0,00	0,00	0,00	2,00	4,00
Inerte	3,00	2,19	0,19	2,19	0,19
Fosfato bicálcico	1,57	1,58	1,58	1,58	1,58
Sal comum	0,33	0,28	0,28	0,28	0,28
Premix vitamínico e mineral ⁽¹⁾	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-metionina total	0,15	0,17	0,17	0,17	0,17
L-lisina HCl total	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
Antioxidante B H T	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100	100	100	100	100
Calculado					
Proteína Bruta (%)					20,00
Energia Metabolizável (Kcal/Kg)					2.800
Fósforo disponível (%)					0,40
Cálcio (%)					3,00
Metionina + Cisteína total (%)					0,80
Metionina total (%)					0,51
Lisina total (%)					1,10

¹ Níveis de garantia por quilo de produto: Vit. A (8000000 UI), Vit. D3 (2000000 UI), Vitamina E (15000mg), Vit. K3 (1960mg), Vit. B2 (4000mg), Vit. B6 (1000mg), Vit. B12 (100000mcg), Niacina (19800mg), Ác. pantotênico (5350mg), Ác. Fólico (200mg), Manganês (32500mg), Zinco (50000mg), Ferro (20000mg), Cobre (4000mg), Iodo (1500mg), Selênio (250mg), Cobalto (200mg), Antioxidante (100000mg).

4.5 Manejo dos ovos

A coleta dos ovos foi feita duas vezes ao dia, sendo a primeira no início da manhã e a segunda no final da tarde. Os ovos de cada parcela foram contabilizados e identificados de acordo com o grupo experimental.

Para a incubação, foram selecionados ovos com formato regular e casca íntegra. Os ovos foram incubados a temperatura média de 37,5°C e umidade relativa do ar em torno de 60% (PEDROSO et al., 2006) (Fig. 9).



Figura 9. Incubação dos ovos férteis de codorna a 37,5°C.

A desinfecção da casca do ovo foi realizada com uma solução de peróxido de hidrogênio formado por 0,6 mL de peróxido de hidrogênio a 3% com 100 ml de água destilada. Os ovos foram abertos após 24 horas de incubação. Uma janela (2,0 x 2,0 cm aproximadamente) foi feita com tesoura esterilizada (Fig. 10), para remoção de 1 mL de albúmen para melhor visualização da membrana vitelina bem como de sua vascularização. Após a retirada do albúmen, a janela foi selada com parafilme para evitar dessecação do embrião.

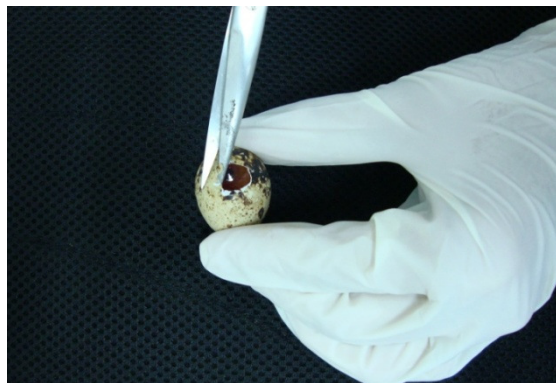


Figura 10. Abertura dos ovos com auxílio de tesoura esterilizada para visualização do embrião.

4.6 Método Computacional

A partir de 72h de incubação as imagens da rede vascular da membrana vitelina foram capturadas em intervalos de 24 horas (72, 96 e 120 horas de incubação) com câmera digital (1920 x 1080 pixels) e em seguida, transferidas para o computador para posteriormente serem trabalhadas procurando obter assim suas dimensões fractais. Finalmente, realizou-se a segmentação e esqueletização da vascularização das membranas.

4.6.1 Vascularização da membrana vitelina (MV)

A segmentação consiste em extrair a imagem dos vasos sangüíneos da imagem da MV. Nesta segmentação foi usada a dimensão de um pixel para todos os vasos, independente do seu diâmetro. Este processo é denominado esqueletização, sendo um indicador muito sensível de alterações na distribuição vascular (PARSONS-WINGERTER et al., 1998; AVAKIAN et al., 2002).

Extraído o mapa vascular, é possível determinar-se o comprimento, a área e a dimensão fractal dos vasos sangüíneos na membrana. Essas medidas após análises estatísticas podem trazer informações seguras para um diagnóstico preciso e assistido pelo computador. As imagens das membranas vitelinas (Fig. 11) foram segmentadas e esqueletizadas usando-se uma rotina computacional semi-automática:

1. Após a imagem ser aberta no Paint Microsoft[®], realiza-se a inversão de cores da imagem, obtendo-se o negativo da mesma;
2. Em seguida, na caixa de ferramentas, clica-se na ferramenta lápis;
3. Arrasta-se o ponteiro ao longo dos vasos sangüíneos da MV ou de segmentos deles, cobrindo-os;
4. Na barra de menus, escolhe-se a opção Imagem → Atributos → preto e branco. Esse procedimento é realizado para obtenção de uma imagem binária com fundo em preto e os vasos segmentados em branco, onde o segmento tem espessura única de 1 pixel;
5. Salva-se a imagem no formato bitmap monocromático (.bmp);
6. Utiliza-se o software Benoit[™] 1.3 Fractal Analysis System para calcular a D da vascularização da MV.

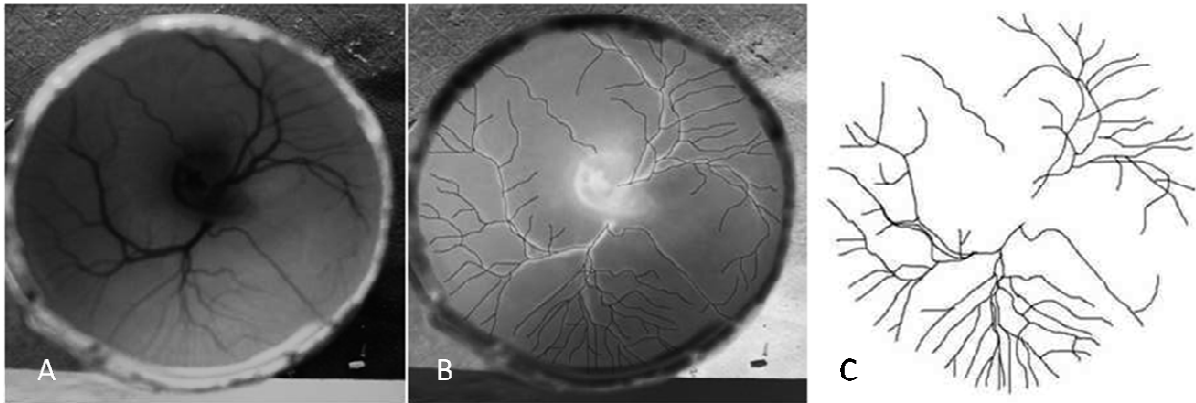


Figura 11. Processo de segmentação e esqueletização da imagem da vascularização da MV de embriões de codorna japonesa. *A* rede vascular da MV; *B* obtenção do negativo da imagem, com destaque da vascularização em contraste com o fundo da imagem e segmentação dos vasos da MV; *C* binarização e esqueletização da imagem, para obtenção de padrão em preto e branco.

4.6.2 Difusão limitada por agregação (DLA)

DLA foram gerados ($n = 45$) objetivando comparar a sua dimensão fractal com aquela da membrana vitelina e testar se o método usado interfere no valor da dimensão fractal. Cada DLA foi construído com 2000 pixels utilizando um programa desenvolvido em linguagem C para uma grade de 300×300 pixels. Em seguida, suas dimensões fractais foram calculadas pelo método de box-counting e dimensão de informação.

4.7 Cálculo da dimensão fractal (D)

Para obtenção do valor médio da dimensão fractal (D) da vascularização das MV de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) e dos DLAs foram utilizados os métodos de contagem por caixas (box-counting) e dimensão de informação (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 log-log de $N(r)$ em função de r (lados das caixas). O ângulo de inclinação desse gráfico é a dimensão de box-counting (D_{bc}), que pode ser definida formalmente, através da equação (1).

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

A dimensão de informação é uma dimensão de cobertura que 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.

Formalmente, a dimensão de informação (D_i) é definida pela equação (2).

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

onde

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

é denominada Entropia de Kolmogorov. N é o número de caixas e $m_i = MI / M$, sendo MI o número de pontos na i -ésima caixa e M o número total de pontos do objeto fractal.

A taxa de variação da dimensão fractal, obtida pelo quociente da variação da dimensão fractal pela variação do tempo ($\Delta D / \Delta t$), foi utilizada como indicador da dinâmica do crescimento vascular na membrana vitelina em relação ao período de incubação para os diferentes tratamentos avaliados.

4.8 Coleta de material biológico

No 63º dia experimental, as aves foram submetidas a jejum alimentar de 12h e em seguida realizou-se a coleta de sangue para dosagem de colesterol total (CT), triglicerídeos totais (TG) e colesterol HDL das aves. As mesmas foram processadas e analisadas no Laboratório de Química Analítica do GENAPESq / UFRPE.

Após contenção e imobilização das aves, realizou-se coleta de sangue (~1mL) através de punção venosa (veia braquial da asa). As amostras foram armazenadas em tubos sem anticoagulante, devidamente identificados. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 4000 x g, durante 15 minutos para obtenção do soro. Posteriormente, separaram-se as alíquotas necessárias às dosagens do CT, TG e HDL (Fig. 12).

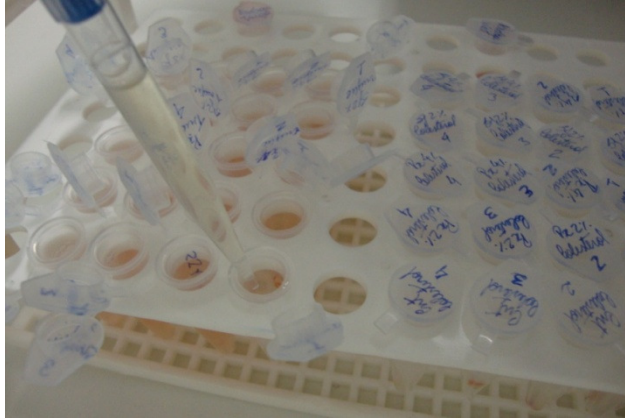


Figura 12. Preparo das amostras para determinação dos níveis de CT, TG e HDL.

As concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos e HDL foram dosadas em triplicata, através de reação enzimática de ponto final (kits Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, BR) por espectrofotometria de absorção no ultravioleta visível (UV-visível) com reação colorimétrica (Fig. 13).



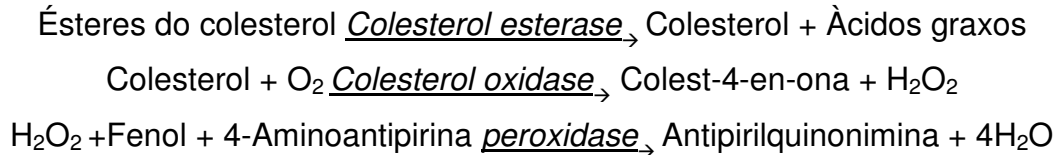
Figura 13. Espectrofotômetro de absorção em luz ultravioleta visível (UV-visível)

4.8.1 Colesterol total

Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peroxidase de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm.

A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Reação:



Reagentes:

Reagente 1:

- ✓ tampão 50mmol/L, pH 7,0;
- ✓ fenol 24mmol/L;
- ✓ colato de sódio 500 μ mol/L;
- ✓ azida sódica 15 mmol/L;
- ✓ 4-aminoantipirina 500 μ mol/L;
- ✓ colesterol esterase \geq 250U/L;
- ✓ colesterol oxidase \geq 250U/L ;
- ✓ peroxidase \geq 1000U/L.

Padrão:

- ✓ azida sódica 15mmol/L

Procedimento:

Tomou-se 19 tubos de ensaio e identificou-se cada um deles, sendo um tubo para o branco do kit, um tubo para a solução padrão e um tubo para cada amostra a ser testada, devidamente identificada, de acordo com o tratamento.

No tubo do branco pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1. No tubo do padrão, pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1 e 0,01 mL da solução padrão. No tubo de teste, pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1 e 0,01mL do soro a ser testado. Em seguida, misturou-se e incubou-se em banho-maria a 37^o C durante 10 minutos. Determinaram-se as absorbâncias dos testes e da solução padrão em comprimentos de onda de 500nm.

A concentração de colesterol nas amostras, expressa em mg/dL foi calculada através da seguinte fórmula geral:

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \text{absorbância do teste} / \text{absorbância do padrão} \times 200.$$

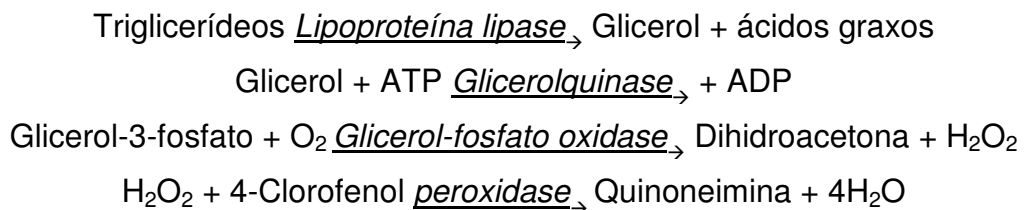
Em seguida, realizou-se a conversão dos valores de miligramas por decilitro (mg/dL) para milimoles por litro (mmol/L) dividindo-se os valores obtidos por 38,67, conforme padrão internacional de sistemas de medidas adotado pelo Sistema Internacional de Unidades (SI).

4.8.2 Triglicerídeos

A lipoproteína lípase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorvância em 505 nm.

A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos na amostra.

Reação:



Reagentes:

Reagente 1:

- ✓ tampão 50mmol/L, pH 7,0;
- ✓ íons magnésio 4mmol/L;
- ✓ 4-clorofenol 2,70 mmol/L;
- ✓ 4-aminoantipirina 300 µmol/L;
- ✓ ATP 1,8 mmol/L;
- ✓ lipoproteína lípase ≥ 1400U/L;

- ✓ glicerolquinase $\geq 1000\text{U/L}$;
- ✓ glicerol oxidase $\geq 1500\text{U/L}$;
- ✓ peroxidase $\geq 900\text{U/L}$;
- ✓ azida sódica 0,095%.

Padrão:

- ✓ triglicerídeos 200mg/dL;
- ✓ azida sódica 0,045%.

Procedimento:

Tomou-se 19 tubos de ensaio e identificou-se cada um deles, sendo um tubo para o branco do kit, um tubo para a solução padrão e um tubo para cada amostra a ser testada, devidamente identificada, de acordo com o tratamento.

No tubo do branco pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1. No tubo do padrão, pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1 e 0,01 mL da solução padrão. No tubo de teste, pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1 e 0,01mL do soro a ser testado. Em seguida, misturou-se e incubou-se em banho-maria a 37° C durante 10 minutos. Determinou-se as absorbâncias dos testes e da solução padrão em comprimentos de onda de 505nm.

A concentração de triglicerídeos nas amostras, expressa em mg/dL foi calculada através da seguinte fórmula geral:

$$\text{Triglicerídeos (mg/ dL)} = \text{absorbância do teste/ absorbância do padrão} \times 200.$$

Em seguida, realizou-se a conversão dos valores de miligramas por decilitro (mg/dL) para milimoles por litro (mmol/L) dividindo-se os valores obtidos por 88,57, conforme padrão internacional de sistemas de medidas adotado pelo Sistema Internacional de Unidades (SI).

4.8.3 Colesterol HDL

O colesterol HDL foi obtido em amostras de soro das aves através da precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa (LDL) e muito baixa densidade (VLDL). Estas lipoproteínas são quantitativamente precipitadas e, após

centrifugação, o colesterol ligado as lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante. A precipitação da VLDL e da LDL é feita pela ação do ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio.

Reagentes:

Reagente 1:

- ✓ tampão 50mmol/L, pH 7,0;
- ✓ fenol 24mmol/L;
- ✓ colato de sódio 500 μ mol/L;
- ✓ azida sódica 15 mmol/L;
- ✓ 4-aminoantipirina 500 μ mol/L;
- ✓ colesterol esterase \geq 250U/L;
- ✓ colesterol oxidase \geq 250U/L;
- ✓ peroxidase \geq 1000U/L.

Precipitante:

- ✓ ácido fosfotúngstico 1,5mmol/L ;
- ✓ cloreto de magnésio 54mmol/L.

Padrão:

- ✓ colesterol 0,52 mmol/L;
- ✓ azida sódica 14,6 mmol/L.

Procedimento:

Precipitação das VLDL e LDL – em um tubo adicionou-se 0,25 mL do soro e 0,25 mL do precipitante. Agitou-se vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugou-se a 3500rpm por 20 minutos para obtenção de um sobrenadante límpido. Pipetou-se o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Em seguida, tomou-se 19 tubos de ensaio e identificou-se cada um deles, sendo um tubo para o branco do kit, um tubo para a solução padrão e um tubo para cada amostra a ser testada, devidamente identificada, de acordo com o tratamento.

No tubo do branco pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1. No tubo do padrão, pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1 e 0,01 mL da solução padrão. No tubo de teste,

pipetou-se 1,0 mL do Reagente 1 e 0,01mL do soro a ser testado. Em seguida, misturou-se e incubou-se em banho-maria a 37^o C durante 10 minutos. Determinaram-se as absorvâncias dos testes e da solução padrão em comprimentos de onda de 500nm.

A concentração de colesterol HDL nas amostras, expressa em mg/dL foi calculada através da seguinte fórmula geral:

$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \text{absorbância do teste} / \text{absorbância do padrão} \times 40.$$

Em seguida, realizou-se a conversão dos valores de miligramas por decilitro (mg/dL) para milimoles por litro (mmol/L) dividindo-se os valores obtidos por 38,67, conforme padrão internacional de sistemas de medidas adotado pelo Sistema Internacional de Unidades (SI).

4.9 Análise estatística

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Para os dados cujos valores seguiram uma distribuição gaussiana realizou-se uma análise de variância (ANOVA) e um teste post-hoc de Tukey. Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn.

5 REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, SJ; STANLEY, RL; EVANS, DJR. Developmental stages of the Japanese quail. **Journal of Anatomy**. Vol. 216, p. 3-15, 2010.
- ALBINO, LFT; NEME, R. Codornas: **Manual prático de criação**. Viçosa: Aprenda Fácil, 1998, 56p.:il.
- ALPARSLAN, G; ÖZDOGAN, M. The Effects of Diet Containing Fish Oil on Some Blood Parameters and the Performance Values of Broilers and Cost Efficiency. **International Journal of Poultry Sciences**. Vol. 5, p. 415-419, 2006.
- ANSARI, A et al. Protein States and Protein quakes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**. Vol. 82, n.15, p. 5000 - 04, 1985.
- ARAÚJO, LS et al. Análise Fractal da vascularização da retina do cão. In: IV Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE, Recife, Imprensa Universitária, 2004.
- ARAYA, J; AGUILERA, AM; BOSCO, C. Influencia del contenido de ácidos grasos poliinsaturados n-6 dieteticos, en la actividad de enzimas asociadas a la funcion de la membrana mitocondrial de higado e placenta de ratas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. Vol. 41, p. 62 - 71, 1991.
- AUERBACH, R et al. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. **Clinical Chemistry** Vol. 49, n. 1, p. 32–40, 2003.
- AUERBACH, W; AUERBACH, R. Angiogenesis inhibition: a review. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 63,p. 265 – 311, 1994.
- AVAKIAN, A et al. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. **Current Eye Research**. Vol. 24, p. 274-280, 2002.
- BARTSCH, H; NAIR, J; OWEN, RW. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role and risks modifiers. **Carcinogenesis**. Vol. 20, n. 12, p. 2209 - 18, 1999.
- BASSINGTHWAIGHTE, JB; LIEBOVITCH, LS; WEST, BJ. **Fractal physiology**. New York: Oxford University Press, 1994. 364 p.
- BECK, LJR; D'AMORE, PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. **Faseb Journal**. 11(5): 365-373, 1997.
- BELITZ, HD; GROSCH, W. **Food chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. 774 p.

BENETTI, A et al. Transforming Growth Factor-B1 and CD105 Promote the Migration of Hepatocellular Carcinoma–Derived Endothelium. **Cancer Research**. Vol. 68, n. 20, p. 8626 - 34, 2008.

BLONDEAU, N et al. Polyunsaturated Fatty Acids Are Cerebral Vasodilators via the TREK-1 Potassium Channel. **Circulatory Research**. Vol. 101, p. 176 –84, 2007.

BOCKHORN, M; JAIN, RK; MUNN, LL. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer crawl into vessels, or are they Lpushed? **The Lancet Oncology**, Vol. 8, p. 444 – 48, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2009. 98p.

BUSCHMANN, I; SCHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessels growth. **New Physiology Science**. Vol. 14, n. 3, p. 121- 25, 1999.

CALDER, PC. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**. Vol. 55, p. 127- 50, 1996.

CALDER, PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function. **Advances in Enzyme Regulation**. Vol. 37, p. 197- 237, 1997.

CALDER, PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and mononuclear phagocyte function. In: **Medicinal fatty acids in inflammation**. Kremer, JM. Birkhauser Verlag Basel (Switzerland), p. 1 - 27, 1998a.

CALDER, PC. Fat chance in immunomodulation. **Trends Immunology Today**. Vol. 19, n. 6, p. 244 - 77, 1998b.

CALDER, PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fish tale? **Nutrition Research**. Vol. 21, p. 309 - 41, 2001.

CHEN, Y; SIBLE, JC; MCNABB, AFM. Effects of maternal exposure to ammonium perchlorate on thyroid function and the expression of thyroid –response genes in Japanese quail embryos. **General and Comparative Endocrinology**. Vol. 169, n. 159, p. 196 - 207, 2008.

CHENG, CF et al. Transforming Growth Factor α (TGF α)-Stimulated Secretion of HSP90 α : Using the Receptor LRP-1/CD91 To Promote Human Skin Cell Migration

against a TGF β -Rich Environment during Wound Healing. **Molecular and Cellular Biology**. Vol. 28, n. 10, p. 3344 – 58, 2008.

CHRZANOWSKA-WODNICKA, M et al. Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in Rap1b-deficient mice. **Blood**. Vol. 111, n. 5, p. 2647 - 56, 2008.

CHUNG, WS; LAI, KM; HSU, KC. Comparative Study on Histological Structures of the Vitelline Membrane of Hen and Duck Egg Observed by Cryo-Scanning Electron Microscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 58, p. 1794 – 99, 2010.

CIANCHI, F et al. Inducible nitric oxid synthase expression in human colorectal cancer. **American Journal of Pathology**. Vol. 162, n. 3, p. 793 - 801, 2003.

CIANCHI, F et al. Ciclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxid in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**. Vol. 10, n. 8, p. 2694 - 2704, 2004

COLAS, S et al. Sensitization by Dietary Docosahexaenoic Acid of Rat Mammary Carcinoma to Anthracycline: A Role for Tumor Vascularization. **Clinical Cancer Research**. Vol. 12, n. 19, p. 5879 - 86, 2006.

COLEMAN, LJ et al. A diet containing a-cellulose and fish oil reduces aberrant crypt foci formation and modulates other possible markers for colon cancer risk in azoxymethane treated rats. **Journal of Nutrition**. Vol. 132, n. 8, p. 2312 - 18, 2002.

CONCONI, MT et al. Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo. **Peptides**. Vol. 25, n. 12, p. 2179 – 85, 2004.

CONNOR, KM et al. Increased dietary intake of o-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. **Nature Medicine**. Vol. 13, n. 7, pp. 868 - 873, 2007.

CONWAY EM, COLLEN D, CARMELIET P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular Research**. Vol. 49, pp. 507-5122, 2001.

CORRIA, V. Deficiência de ácidos grasos esenciales en el feto y en el recién nacido pretérmino. **Revista Cubana de Pediatría**. Vol. 73, pp. 43 - 50, 2001.

CRAWFORD, Y et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. **Cancer Cell**. Vol. 15, pp. 21 – 34, 2009.

- CROSS, SS et al. Quantitation of the renal arterial tree by fractal analysis. **Journal of Pathology**. Vol. 170, pp. 479 – 484, 1993.
- DAMICO, FM. Angiogênese e doenças da retina. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. Vol. 70, n.3, pp. 547 - 553, 2007.
- DAVIDSON, LA et al. Chemopreventive n-3 polyunsaturated fatty acids reprogram genetic signatures during colon cancer initiation and progression in the rat. **Cancer Research**. Vol. 64, n.18, pp. 6797 - 6804, 2004.
- DEWAILLY, E et al. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. **American Journal of Clinical Nutrition**. Vol. 74, n. 4, pp. 464 - 473, 2001.
- DEWAILLY. E et al. Fish Consumption and Blood Lipids in Three Ethnic Groups of Québec (Canada). **Lipids**. Vol. 38, n. 4, pp. 359 - 365, 2003.
- DIAS, PF et al. Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Vol. 25, pp. 28 - 34, 2002.
- DICKINSON, AJ et al. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in bladder carcinomas. **British Journal of Urology**. Vol. 74, n. 6, pp. 762 - 766, 1994.
- DING, Z et al. Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. **Journal of Cell Science**. Vol. 119, pp. 4127 - 4137, 2006.
- DINIZ, YS et al. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. **Nutrition**. Vol. 20, n. 2, pp. 230 - 234, 2004.
- EAMES, BF; SCHNEIDER, RA. The genesis of cartilage size and shape during development and evolution. **Development**. Vol.135, pp. 3947 - 3958, 2008.
- FEDER, J. **Fractals**. New York: Plenum press. 1988. 283p.
- FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**. Vol. 25, n.4, pp. 581 – 611, 2004.
- FERREIRA, LJBI. Estudo sobre a concentração de colesterol total, colesterol HDL e colesterol triacilglicerol em gema de ovos de codornas. 2002. 53f. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- FIERRO, IM, KUTOK, JL; SERHAN, CN. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol. 300, pp. 385 – 392, 2002.

- FURLAN, RL; MACARI, M. Lipídios: digestão e absorção. In: **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Macari, M; Furlan, RL; Gonzales, E. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002, 375p.
- GARCIA, SML; FERNADEZ, CG. **Embriologia**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, 416p.
- GAUDIO, E et al. Fractal and fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver. **Journal of Anatomy**. Vol. 207, n. 2, pp.107 - 115, 2005.
- GRIZZI, F et al. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. **BMC Cancer**. Vol. 5, n. 14, pp. 1 - 9, 2005.
- HANAHAN D, WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. **Cell**. Vol. 100, pp. 57 - 70, 2000.
- HARDMAN, WE et al. Three percent dietary fish oil concentrate increased efficacy of doxorubicin against MDA-MB 231 breast cancer xenografts. **Clinical Cancer Research**. Vol.7, pp.2041-2049, 2001.
- HARRIS W et al. Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular disease. A Science Advisory from the American Heart Association, Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. **Circulation**. Vol.119, pp. 902-907, 2009.
- HENDRIX, MJC et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nature Reviews Cancer**. Vol.3, pp.411-42, 2003.
- HOGERS, B et al. Non-invasive tracking of avian development in vivo by MRI. **NMR in Biomedicine**. Vol. 22, pp. 365-373, 2009.
- IGARASHI , M et al. Dietary n-3 PUFA deprivation for 15 weeks upregulates elongase and desaturase expression in rat liver but not brain. **Lipid Res**. Vol. 48, pp.2463-2470, 2007.
- JURGENS, H; PEITGEN, HO; SAUPE, D. **Fractals for the Classroom**. 2ª edição. Berlin: Springer-Verlag, 1993.
- KEIRSTEAD, WP; HUBERMAN BA. Dynamical singularities in ultradiffusion. **Physical Review A**. Vol.36, pp.5392-5400, 1987.
- KELLEY, DS. Modulation of Human Immune and Inflammatory Responses by Dietary Fatty Acids. **Nutrition**.Vol.17, pp.669-673, 2001.

- KERMORVANT-DUCHEMIN, E et al. Trans-arachidonic acids generated during nitrate stress induce a thrombospondin-1-dependent microvascular degeneration. **Nature Medicine**. Vol.11, pp.339–1345, 2005.
- KINSELLA, JE; BLACK, JM. Effects of polyunsaturated fatty acids on the efficacy of antineoplastic agents toward L5178Y lymphoma cells. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 45, pp 1881 - 1887, 1993.
- KRIS-ETHERTON PM, INNIS S, AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, DIETITIANS OF CANADA. Position of American Dietetic Association and Dietitians of Canada: Dietary Fatty Acids. **Journal of the American Dietetic Association**. Vol. 107, pp. 599 - 1611, 2007.
- LANDRY, JR et al. Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. **Blood**. Vol. 111, n. 6, pp. 3005 - 3014, 2008.
- LEHNINGER, AL. Lipídios. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 341 - 367 p.
- LORTHOIS, S; CASSOT, F. Fractal analysis of vascular networks: Insights from morphogenesis. **Journal of Theoretical Biology**. Vol.262, pp. 614 – 633, 2010.
- MACHEIN, MR et al. Angiopoietin-1 Promotes Tumor Angiogenesis in a Rat Glioma Model. **American Journal of Pathology**. Vol.165, n. 5, pp. 1557 - 1570, 2004.
- MAINSTER, MA. The fractal properties of retinal vessels: Embryological and clinical implications. **Eye**, Vol. 4, pp. 235 - 241, 1990.
- MASTERS, BR. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina, **Annual Review of Biomedical Engineering**. Vol.6, pp. 427 – 452, 2004.
- MANCARDI, D et al. Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. **Theoretical Biology and Medical Modelling**. Vol.5, n. 12, pp. 1 - 8, 2008.
- MANDELBROT, BB. How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractal dimension. **Science**. Vol. 156, n. 3775, pp. 636 - 638, 1967.
- MANDELBROT, BB. **The fractal geometry of nature**. New York. W.H. Freeman and Company, 1983. 468p.
- MARKS, DB; MARKS, AD; SMITH, CM. **Basic medical biochemistry: A clinical approach**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. 806p.
- MELO-REIS, PR et al. Angiogenic activity of Synadenium umbellatum Pax latex **Brazilian Journal of Biology**. Vol. 70, n. 1, pp. 189 - 194, 2010.

- MUKUTMONI, M; HUBBARD, NE; ERICKSON, KL. Prostaglandin E[2] modulation of vascular endothelial growth factor production in murine macrophages. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. Vol. 65, n. 3, pp. 123 - 131, 2001.
- NARAYANAM, BA et al. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. **Cancer Research**. Vol.63, n.5, pp. 972 - 975, 2003.
- NATIONAL RESEARCH CONCIL. **Nutrient Requirements of Poultry**. 9 ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1994, 44-45 p.
- NAVIDSHAD, B; DELDAR, H; POURRAHIMI, G. Correlation between serum lipoproteins and abdominal fat pad in broiler chickens. **African Journal of Biotechnology** Vol. 9, n. 35, pp. 5779 - 5783, 2010.
- NIE, D et al. Eicosanoid regulation of angiogenesis in human prostate carcinoma and its therapeutic implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**. Vol. 905, pp. 165 - 176, 2000.
- OLIVEIRA, AJ. Análise estatística de índices morfométricos e dimensão fractal da vascularização da retina humana. **Dissertação**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.
- O'SHEA, M; BASSAGANYA-RIERA, J; MOHEDE, IC. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**. Vol. 79, n. 6, pp. 1199S-1206S, 2004.
- PAI, R et al. Prostaglandins promote colon cancer cell invasion, signaling by cross-talk between two distinct growth factor reports. **Faseb Journal**. Vol. 17, n. 2, pp. 1640 - 1647, 2003.
- PARSONS-WINGERTER, P et al. 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**. Vol. 55, n. 3, pp. 201 - 214, 1998.
- PEDROSO, AA et al. Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Vol. 35, n. 6, pp. 2344 - 2349, 2006.

- PENG, L et al. Biological effect of ectopic expression of angiopoietin-1 and -2 in hepatocellular carcinoma cell line. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**. Vol. 2, n. 1, pp. 94 - 97, 2003.
- PEREIRA, CA; BARRETO, SLT.; ROSTAGNO, HS. Desempenho de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de cálcio durante o pico de postura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004. CD-ROM.
- PINTO, R et al. Níveis de Proteína e Energia para Codornas Japonesas em Postura. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol.31, n. 4, pp. 1761 - 1770, 2002.
- PIRES, AST; COSTA, BVA. A desordem inevitável. **Ciência Hoje**. Vol.14, n.8, pp.5-39, 1992.
- QUINN, MJJR et al. Effect of estradiol on the development of the bursa of Fabricius in Japanese quail. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**. Vol. 311, pp. 91 - 95, 2009.
- RAO, CV et al. Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids. **Cancer research**. Vol. 61, n. 5, pp. 1927 - 1933, 2001.
- REIS, LFSD. **Codornizes, criação e exploração**. Lisboa: Agros, 10, 1980. 222p.
- REIZIS, A; HAMMEL, I; AR., A. Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in chick embryo chorioallantoic membrane. **The Journal of Experimental Biology**. Vol. 208, pp. 2483 - 2488, 2005.
- ROSE, DP; CONOLLY, JM. Omega-3 fatty acids as chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**. Vol. 83, n. 2, pp. 217- 244, 1999.
- ROWAN-HULL, AM et al. ISL-1 induce in stomach mesenchyme in the presence of pancreatic epithelia. **Journal of Pediatric Surgery**. Vol. 44, pp. 348 - 352, 2009.
- ROYNETTE, CE et al. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. **Clinical Nutrition**. Vol.23, n. 2, pp. 139 - 151, 2004.
- RUDDON, RW. **Cancer Biology**, 4 ed. University of Michigan, 2007.
- SAFAMEHR, A; AGHAEI, N; MEHMANNVAZ, Y. The influence of different levels of dietary fish oil on the performance, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. **Research Journal of Biological Sciences**. Vol. 10, pp. 1202 - 1207, 2008.

- SAGAR, PS; DAS, UN. Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical carcinoma (HeLa) cells in vitro **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. Vol. 53, pp. 287 - 299, 1995.
- SAHNI, A et al. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. **Blood**. Vol.107, n.1, pp. 126 - 131, 2006.
- SANTOS, RD. III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. Vol. 77, pp. 1 - 48 (supl. 111), 2001.
- SCHMIDT, EB et al. N-3 fatty acids from fish and coronary artery disease: implications for public health. **Public Health Nutrition**. Vol. 3, n. 1, pp. 91 – 98, 1999.
- SCHULZE, MM; HUTCHINGS, N; SIMPSON, TL. The use of fractal analysis and photometry to estimate the accuracy of bulbar redness grading scales. I **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. Vol. 49, n. 4, pp. 1398 - 1406, 2008.
- SCHWARTZ, S et al. Drug Modification of Angiogenesis in a Rat Cornea Model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. Vol. 48, pp. 250 – 254, 2008.
- SENEGAGLIA, AC et al. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Vol. 31, n. 1, pp. 9 - 14, 2009.
- SENESI, N. The fractal approach to the study of humic substances (3-41). In: Senesi, N, Miano, TM. **Humic substances in the global environment and implications on human health**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. 1368p.
- SENGUPTA, S et al. Thymidine phosphorylase induces angiogenesis in vivo and in vitro: an evaluation of possible mechanisms. **British Journal of Pharmacology**. Vol. 139, pp. 219 - 231, 2003.
- SHENG, G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. **International Journal of Developmental Biology**. Vol. 54, pp. 1033 - 1043, 2010.
- SIJBEN, JW; CALDER, PC. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. **Proceedings of the Nutrition Society**. Vol. 66, n. 2, pp. 237 - 259, 2007.

- SIM, JS; BRAGG, DB; HODGSON, GC. Effect of dietary animal tallow and vegetable oil on fatty acid composition of egg yolk, adipose tissue and liver of laying hens. **Poultry Science**. Vol. 52, n. 1, pp. 51 - 57, 1973.
- SIMOPOULOS, AP. The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. Vol. 56, n 8, pp. 365 - 379, 2002.
- SPECTOR, AA. Plasm lipid transport. **Clinical Physiology and Biochemistry**. Vol. 2, n. 2 - 3, pp. 123 - 134, 1984.
- STOLTZ, RA; ABRAHAM, NG; SCHWARTZMAN, ML. The role of NF-KB in the angiogenic response of coronary microvessel endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. Vol. 93, pp. 2832 - 2837, 1996.
- SUN, J et al. Inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by a synthetic molecule that blocks binding of both VEGF and PDGF to their receptors. **Oncogene**. Vol. 24, pp. 4701 – 4709, 2005.
- TABIBIAZAR, R; ROCKSON, SG. Angiogenesis and the ischemic. **European Heart Journal**. Vol. 22, pp. 903 - 918, 2001.
- TAIT, CR; JONES, PF. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. **Journal of Pathology**. Vol. 204, pp. 1 – 10, 2004.
- TAPIERO, H et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. Vol. 56, pp. 215 - 222, 2002.
- TEITELBAUM, JE; WALKER, WA. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. Vol. 12, n. 1, pp. 21 - 32, 2001.
- TOTH, P. High-density lipoprotein and cardiovascular risk. **Circulation**. Vol. 109, pp. 809 – 1812, 2004.
- VALENZUELA, AB, NIETO, SK. Ácidos grasos omega-6 y omega- 3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. **Revista Chilena de Pediatría**. Vol. 74, pp. 149 - 157, 2003.
- VILLELA, JL. **Criação de codornas**. Cuiabá: SEBRAE/MT. 1998. 91p. (Coleção Agroindústria, vol. 14).
- WEIDNER, N; HARRIS, AL; DIRIX, LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. **European Journal of Cancer**. Vol. 38, pp. 1564 - 1579, 2002.

WITTEN, TA; SANDER, LM. Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon. **Physical Review Letters**. Vol. 47, n. 19, pp. 1400 – 1403, 1981.

ZAMARIA, N. Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. **Reproduction Nutrition Development**. Vol. 44, pp. 273 – 282, 2004.

ZHANG, H et al. Interaction between angiogenin and fibulin 1: evidence and implication. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. Vol. 40, n. 5, pp. 375 - 380, 2008.

CAPÍTULO II

Ácidos graxos essenciais alteram o perfil lipídico sérico e a vascularização da membrana vitelina em codornas?

Essentials fatty acids change the serum lipid profile and vitelline membrane vascularization in quails?

SILVA, J.E.S.¹, MOURA, A.M.A.², NOGUEIRA, R.A.³

1,3 Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional – UFRPE Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor correspondente R. A. Nogueira, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: 81-3320-6057. E-mail: ran.pe@terra.com.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito dos ácidos graxos essenciais ômega-3 e ômega-6 sobre o perfil lipídico de codornas japonesas e sobre o crescimento vascular na membrana vitelina dos embriões das aves suplementadas com óleo de peixe e óleo de soja. Método enzimático com reação colorimétrica foi usado para estimar o perfil lipídico das aves. A vascularização na membrana vitelina foi quantificada através da geometria fractal, utilizando-se o método de box-counting. Os níveis de colesterol dos grupos não apresentaram diferença entre si. Os níveis de triglicérides das aves suplementadas com óleo de peixe foram superiores aos dos demais grupos. Para o HDL, apenas o grupo que recebeu maior proporção de óleo de peixe na ração apresentou diferença em relação aos demais. A vascularização da membrana vitelina dos embriões dos grupos que receberam maiores concentrações de óleo de peixe e de soja foi inferior a dos demais.

Palavras-chave: ácidos graxos, fractal, membrana vitelina, vascularização.

Abstract

The aim of the study was to investigate effect of omega-3 and omega-6 essential fatty acids on serum lipid profile in Japanese quails and on vascular growth in the embryos vitelline membrane. These birds were supplemented with fish oil or soybean oil. Enzymatic colorimetric method was used to estimate the birds lipid profile. The quantification of vitelline membrane vascularization was obtained by fractal dimension using the box-counting method. The cholesterol levels of the groups showed no difference between itself. The triglycerides levels of birds supplemented with fish oil were higher than the other groups. For HDL, only the group that received diet with a higher proportion of fish oil differs from the other. The vitelline membrane vascularization of the groups receiving higher fish and soybean oil concentrations was lower than the others groups.

Keywords: fatty acids, fractal, vitelline membrane, vascularization.

INTRODUÇÃO

O ômega-3 (*n-3*) e o ômega-6 (*n-6*) são ácidos graxos essenciais que participam de diversas funções metabólicas. Além disso, doenças crônicas como hipertensão, diabetes, câncer e desordens auto-imunes são frequentemente associadas com anormalidades no metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados, o que tem despertado o interesse acerca dos possíveis benefícios do consumo destes compostos à saúde, dentre eles, alterações nos níveis de colesterol, triglicerídeos e HDL e prevenção de diversas patologias.

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA, do inglês *polyunsaturated fatty acids*) que compõem a família *n-6* são derivados do ácido linoléico, sendo encontrados na maioria das sementes e vegetais, como milho, girassol, açafrão e soja, enquanto os da família *n-3*, derivados do ácido α -linolênico, podem ser encontrados nos óleos de canola, linhaça, noz, plantas com coloração verde-escura e no óleo de peixes, principalmente naqueles provenientes das regiões polares (Calder, 1996; Bartsch et al., 1999).

Sim et al. (1973) realizando experimentos com galinhas poedeiras e Ferreira (2002), utilizando codornas japonesas, verificaram que variações na fonte de óleo que compunha a dieta de animais adultos interferiram sobre a composição da gema dos ovos desses animais, enquanto Murata et al. (2003), Alsparlan & Ozdogan (2006), Safamehr et al. (2008) e Navidshad et al. (2010) observaram distintos efeitos da suplementação com óleo de peixe e de soja em diferentes concentrações sobre os níveis de colesterol, triglicerídeos e HDL de galinhas de postura e frangos de corte.

Em estudo comparativo sobre os efeitos de ácidos graxos saturados e poliinsaturados sobre alterações do perfil lipídico em ratos, Diniz et al. (2004) observaram que o grupo de animais que receberam ácidos graxos poliinsaturados apresentou menores níveis de triglicerídeos, colesterol e LDL quando comparado ao grupo tratado com ácidos graxos saturados. Além disso, a suplementação com ácidos saturados provocou maior índice aterogênico quando comparados aos grupos controle e suplementado com *n-3*.

Molena-Fernandes et al. (2010) verificaram que não houve alteração nos níveis de colesterol de ratos suplementados com farinha de linhaça marrom e linhaça dourada. Entretanto foi observado aumento nos níveis de HDL nos grupos tratados em relação ao grupo controle, indicando possivelmente que a

suplementação levou à redução das lipoproteínas séricas de LDL e VLDL, contribuindo para a redução do risco de aterosclerose nesses animais.

A HDL possui a capacidade de interagir com as células na vascularização sistêmica, revertendo a disfunção celular do endotélio, estimulando a produção de prostaciclina, diminuindo a agregação plaquetária, inibindo a apoptose celular do endotélio e a oxidação do LDL, possuindo efeito antiaterogênico, dentre outras funções (Toth, 2004).

O sistema vascular está envolvido no crescimento e proliferação celular normal e patológica, nos processos de reparação de tecidos e nos distúrbios circulatórios. Este sistema responde diretamente a fatores estimulantes, moduladores e inibitórios com regressão, proliferação e remodelação da microvasculatura, alterando a dinâmica do fluxo sanguíneo e, portanto, modificando o aporte de oxigênio e nutrientes aos diversos tecidos do organismo. Entre os processos de remodelagem da vascularização é possível distinguir dois diferentes mecanismos de formação de novos vasos sanguíneos: a vasculogênese e a angiogênese (Conway et al., 2001). Na vasculogênese, angioblastos e hemangioblastos coalescem e se diferenciam em células endoteliais, e formam uma rede vascular primitiva. O remodelamento dessa rede ocorre através da angiogênese, que envolve brotamento, intussuscepção e/ou ligação, resultando na formação de microvasos (Hendrix et al., 2003).

Os ácidos graxos interferem em diversas etapas do processo de formação vascular, atuando na contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese e morte celular. Essa atuação se dá através dos derivados dos eicosanóides e do ácido aracdônico (Calder, 2003; O'Shea, 2004). Estes ácidos também estão relacionados com a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Narayanan et al., 2003) que possui correlação positiva com a expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) e com a angiogênese (Cianchi et al., 2003; 2004).

Em humanos o aumento da ingestão de n-3 resulta no correspondente aumento deste PUFA nos tecidos e lipídios circulantes, com simultânea redução de n-6, como o ácido γ -linolênico e o ácido aracdônico (Dewailly et al., 2001; 2003). A ligação entre o consumo de n-6 e inflamação está no fato de que o ácido aracdônico (AA), que pode ser formado pelo ácido linoléico (AL), está envolvido nos estágios iniciais da inflamação. Entretanto, o AA e o AL podem dar origem a moléculas antiinflamatórias, como por exemplo, nas células que formam o revestimento dos

vasos sanguíneos, os PUFA n-6 tem propriedades antiinflamatórias, suprimindo a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e interleucinas, bem como a angiogênese (Harris et al., 2009).

A proliferação de células endoteliais vasculares, bem como a migração e formação de capilares são estimuladas por fatores de crescimento angiogênico, que incluem as proteínas do VEGF, TGF- β , e eicosanóides que derivam dos ácidos graxos poliinsaturados n-6 (Dewailly et al., 2001; 2003).

Na avaliação do processo de crescimento vascular tem sido utilizados modelos *in vivo* como a membrana vitelina de embriões de aves, devido a sua acessibilidade a observação e experimentação. A membrana vitelina (MV) das aves é formada a partir de secreções emitidas pelo epitélio folicular e oviduto, sendo constituída de uma membrana interna e uma membrana externa (Chung et al., 2010). A MV é dividida em área vitelina (região da membrana que ainda não contém células do mesoderma) e área vasculosa (local onde ocorre a hematopoese e vasculogênese no saco vitelino, marcada lateralmente pela extensão da invasão do mesoderma extra-embriônico). Com o desenvolvimento embrionário, a área vasculosa abrange toda a gema e a área vitelina desaparece. A eritropoiese inicial do saco vitelino ocorre no mesoderma extra-embriônico, antes da expansão do celoma extra-embriônico e da invasão do alantóide, e neste contexto, abrange as três camadas germinativas (Sheng, 2010).

Uma maneira de verificar alterações na estrutura vascular é através da avaliação de sua complexidade, por meio da quantificação do crescimento dos vasos utilizando-se a geometria fractal. O termo fractal (do radical *fractus*) foi cunhado por Mandelbrot que reuniu, criou e popularizou uma grande coleção de objetos 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 (Bassingthwaight et al., 1994) e reflete as irregularidades na forma dos objetos ou processos fractais. A geometria fractal tem se mostrado bastante apropriada para descrever e avaliar a complexidade de certas estruturas dentre elas, sistemas vasculares (Grizzi et al., 2005; Lorthois, Cassoti, 2009).

A geometria fractal se constitui como uma ferramenta que possibilita a quantificação de processos complexos como a rede vascular. Por outro lado, dietas enriquecidas com n-3 e n-6 tem sido investigadas quanto a sua utilização para prevenção, tratamento e controle de patologias associadas ao crescimento vascular, podendo ser usada com fins terapêuticos e trazendo benefícios a saúde da população. Sendo assim, este estudo teve como objetivo verificar efeitos da suplementação com n-3 e n-6 sobre o perfil lipídico de codornas e analisar, usando a dimensão fractal, o processo de vascularização da membrana vitelina dos embriões dessas aves.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas 80 codornas japonesas (*Coturnix japonica*) de sessenta dias de idade (60 fêmeas e 20 machos), oriundas da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina – Campus Avançado UFRPE (EEPAC/ UFRPE). As codornas foram pesadas e distribuídas em delineamento em blocos inteiramente casualizados (DBC), cinco tratamentos, quatro repetições para cada tratamento e quatro aves por unidade experimental (1 macho: 3 fêmeas). O experimento teve duração de 63 dias.

As codornas foram alojadas em gaiolas metálicas (100 x 30 x 20 cm), sobrepostas em cinco andares com quatro gaiolas por andar. Cada gaiola foi equipada com comedouro e bebedouro tipo calha e bandeja aparadora de excretas. As aves foram alimentadas com ração *ad libitum* e água fresca, sendo mantidas sob um programa de luz contínuo de 17 horas/ dia (artificial). Protocolo experimental realizado em conformidade com os procedimentos descritos no protocolo n. 23082.005779/2011(CEUA/ UFRPE).

Os tratamentos foram constituídos por quatro rações experimentais e uma ração referência, formuladas de acordo com as exigências para codornas em postura (National Research Council, 1994), com exceção do cálcio, cujo nível foi descrito por Pereira et al. (2004). De acordo com o tratamento ao qual foram submetidos os grupos receberam a seguinte denominação: Dieta Controle (DC), Óleo de Peixe 2% (OP 2%), Óleo de Peixe 4% (OP 4%), Óleo de Soja 2% (OS 2%) e Óleo de Soja 4% (OS 4%).

Mesmo tendo composição diferente entre os grupos experimentais, as rações foram formuladas e confeccionadas para terem os mesmos níveis de proteína bruta e energia metabolizável. Os componentes utilizados na elaboração das rações encontram-se na Tab. 1. Para formulação das rações utilizou-se o software SuperCrac v.5.4 da TDNet, Viçosa, MG (2002), conforme Tab. 1.

Tabela 1. Composição centesimal e nutricional das rações experimentais para codornas em fase de postura.

Tratamento	Controle	OP 2%	OP 4%	OS 2%	OS 4%
Componente					
Milho	52,75	52,73	52,73	52,73	52,73
Farelo de soja	35,62	34,47	34,47	34,47	34,47
Calcário calcítico	6,46	6,46	6,46	6,46	6,46
Óleo de peixe	0,00	2,00	4,00	0,00	0,00
Óleo de soja	0,00	0,00	0,00	2,00	4,00
Inerte	3,00	2,19	0,19	2,19	0,19
Fosfato bicálcico	1,57	1,58	1,58	1,58	1,58
Sal comum	0,33	0,28	0,28	0,28	0,28
Premix vitamínico e mineral ⁽¹⁾	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
DL-metionina total	0,15	0,17	0,17	0,17	0,17
L-lisina HCl total	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
Antioxidante B H T	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100	100	100	100	100
Calculado					
Proteína Bruta (%)					20,00
Energia Metabolizável (Kcal/Kg)					2.800
Fósforo disponível (%)					0,40
Cálcio (%)					3,00
Metionina + Cisteína total (%)					0,80
Metionina total (%)					0,51
Lisina total (%)					1,10

¹ Níveis de garantia por quilo do produto: Vit. A (8000000 UI), Vit. D3 (2000000 UI), Vitamina E (15000mg), Vit. K3 (1960mg), Vit. B2 (4000mg), Vit. B6 (1000mg), Vit. B12 (100000mcg), Niacina (19800mg), Ác. pantotênico (5350mg), Ác. Fólico (200mg), Manganês (32500mg), Zinco (50000mg), Ferro (20000mg), Cobre (4000mg), Iodo (1500mg), Selênio (250mg), Cobalto (200mg), Antioxidante (100000mg).

² Antioxidante.

Após o período de adaptação, se iniciou a coleta dos ovos das aves dos referidos grupos experimentais. A coleta dos ovos foi feita duas vezes ao dia, sendo a primeira no início da manhã e a segunda no final da tarde. Os ovos de cada parcela foram contabilizados e identificados de acordo com o grupo experimental. Para a incubação, foram selecionados ovos com formato regular e casca íntegra. Os ovos foram incubados a $37,5^{\circ}$ e umidade relativa em torno de 60%. Após 24 de incubação realizou-se a desinfecção da casca dos ovos e em seguida, uma janela (2,0 x 2,0 cm aproximadamente) foi feita com tesoura esterilizada, para remoção de 1 mL de albúmen para melhor visualização da membrana vitelina bem como de sua vascularização. Após a retirada do albúmen, a janela foi selada com parafilme para evitar dessecação do embrião.

Entre 72 e 120 horas de incubação imagens da rede vascular da membrana vitelina (MV) foram capturadas com câmera digital (1920 x 1980 pixels) em intervalos de 24 horas. Em seguida foi realizada a segmentação e esqueletização da vascularização da MV. A segmentação consiste em extrair a imagem dos vasos sanguíneos da imagem da MV. Nesta segmentação foi usada a dimensão de um pixel para todos os vasos, processo denominado esqueletização, considerado um indicador muito sensível de alterações na distribuição vascular (Parsons-Wingerter et al., 1998; Avakian et al., 2002). As imagens das membranas vitelinas foram segmentadas e esqueletizadas usando-se uma rotina computacional semi-automática (Fig. 1).

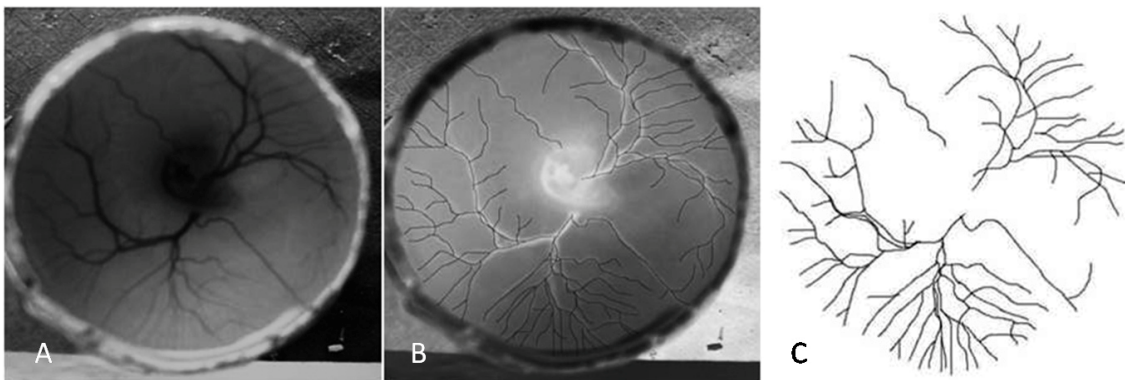


Figura 1. Processo de segmentação e esqueletização da imagem da vascularização da MV de embriões de codorna japonesa. *A* rede vascular da MV; *B* obtenção do negativo da imagem, com destaque da vascularização em contraste com o fundo da imagem e segmentação dos vasos da MV; *C* binarização e esqueletização da imagem, para obtenção de padrão em preto e branco.

Em seguida, foram obtidas as dimensões fractais da vascularização da MV utilizando-se o Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System (TruSoft International Inc. 2004, St. Petersburg, FL) através do método de box-counting (Feder, 1988; Mandelbrot, 1991). Este método é uma dimensão de cobertura que 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 log-log de $N(r)$ em função de r (lados das caixas). O ângulo de inclinação desse gráfico é a dimensão de box-counting (D_{bc}), que pode ser definida formalmente, através da equação

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

A taxa de variação da dimensão fractal, obtida pelo quociente da variação da dimensão fractal pela variação do tempo ($\Delta D / \Delta t$), foi utilizada como indicador da dinâmica do crescimento vascular na membrana vitelina em relação ao período de incubação para os diferentes tratamentos avaliados.

Para avaliar os efeitos dos PUFA n-3 e n-6 no metabolismo lipídico, no 63º dia experimental, as aves foram submetidas a jejum alimentar de 12h e em seguida foi colhido 1 mL de sangue das aves ($n = 4$ / repetição) através de punção da veia braquial da asa. O material foi colhido em tubos devidamente identificados, sem anticoagulante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g, durante 15 minutos para obtenção do soro. Posteriormente, separaram-se as alíquotas necessárias às dosagens das concentrações plasmáticas do colesterol (CT), triglicérides (TG) e HDL. As absorbâncias das mesmas foram analisadas em triplicata, por reação enzimática de ponto final com reação colorimétrica (kits comerciais Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, BR) em espectrofotômetro de luz ultravioleta visível.

A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos ($p > 10\%$). Para os dados com distribuição gaussiana realizou-se uma ANOVA e um teste post-hoc de Tukey ($\alpha = 5\%$). Os dados com distribuição não gaussiana foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn ($\alpha = 5\%$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de colesterol (CT), triglicerídeos (TG) e HDL sérico das aves dos grupos experimentais são apresentados na Tab. 2.

Tabela 2. Valores médios obtidos para colesterol (CT), triglicerídeos (TG) e HDL no sangue de codornas submetidas a diferentes dietas.

Grupos experimentais	Parâmetros avaliados		
	CT (mmol/ L)	TG (mmol/ L)	HDL (mmol/ L)
DC	11,20	6,49	1,93
OP 2%	13,30	22,72	1,89
OP 4%	13,57	25,54	5,20
OS 2%	12,24	5,90	2,05
OS 4%	14,10	10,75	2,01
Teste F	6,935 ^{NS}	10,743*	6,299*
P	> 0,05	0,0001	0,0002

* Diferença significativa entre os grupos. ^{NS} Não significativo.

As aves que não receberam PUFA de origem animal (grupos DC, OS 2% e OS 4%) apresentaram níveis séricos de CT semelhantes às que receberam dietas enriquecidas com óleo de peixe (OP 2% e OP 4%). Dada a importância do colesterol nas diversas funções metabólicas, mesmo quando este não é oferecido na dieta, o organismo cria alternativas para a produção do mesmo, através do transporte reverso do colesterol. Esses dados concordam com os resultados obtidos por Murata et al. (2003), Alparslan e Ozdogan (2006) e Safamehr et al (2008), discordando entretanto com Navidshad et al (2010) que verificaram efeito da suplementação com PUFA sobre o colesterol de frangos de corte.

Em nossos experimentos os níveis de TG foram elevados nas aves dos grupos OP 2% e OP 4%, quando comparados as aves dos grupos OS 2% , OS 4% e DC. Este efeito pode ser decorrente de um maior tempo de absorção das frações lipídicas do óleo de peixe pelo trato intestinal, colaborando para maiores níveis destes componentes no sangue. Entretanto, Alparslan, Ozdogan (2006), Safamehr et al. (2008) e Navidshad et al. (2010) não verificaram efeito da suplementação com n-3 ou n-6 sobre a concentração de TG em frangos de corte. O grupo OP 4% apresentou maiores níveis de colesterol HDL em relação aos demais tratamentos, efeito anteriormente observado em frangos de corte por Alparslan e Ozdogan (2006), Safamehr et al. (2008) e Navidshad et al. (2010) e em humanos, por Dewailly

et al. (2003), discordando entretanto dos resultados de Murata et al. (2003).

Para a quantificação do processo de crescimento vascular na membrana vitelina, os valores médios da dimensão fractal obtidos por dimensão de box-counting (D_{bc}) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dimensão fractal ($M \pm SD$) obtida pelos métodos de box-counting (D_{bc}) para os diferentes tratamentos em distintos tempos de incubação.

Período de incubação	72h		96h		120h	
Tratamento	n	D_{bc}	N	D_{bc}	n	D_{bc}
DC	31	1,25±0,06ac	14	1,31±0,06ab	7	1,34±0,04a
OP 2%	19	1,23±0,06ac	19	1,29±0,05a	14	1,30±0,06a
OP 4%	24	1,21±0,04bc	19	1,27±0,04ab	9	1,29±0,03a
OS 2%	24	1,26±0,06a	17	1,27±0,06ab	9	1,32±0,04a
OS 4%	25	1,20±0,04b	16	1,23±0,05b	11	1,27±0,04a

Letras diferentes entre colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais.

A vascularização da membrana vitelina (MV) dos embriões de codorna sofreu interferência da quantidade e qualidade da suplementação com PUFA oferecida as aves ao longo do processo de incubação (Fig. 2).

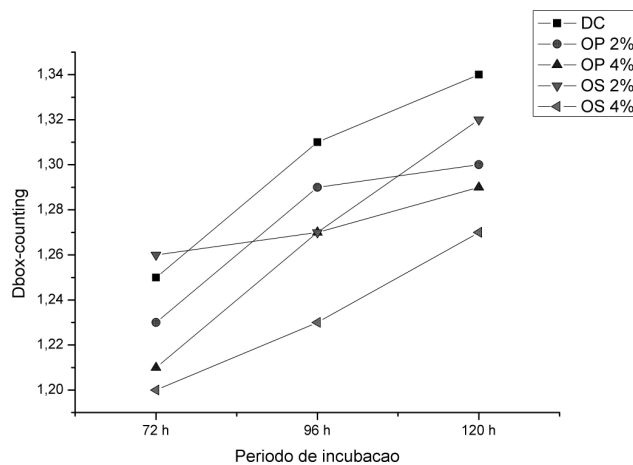


Figura 2. Comportamento da dimensão fractal (D_{bc}) da vascularização da MV em 72, 96 e 120 horas de incubação para os grupos experimentais.

Em 72 horas de incubação a vascularização da MV no grupo OS 4% foi inferior a vascularização das MV dos grupos DC ($p < 0,01$) e OS 2% ($p < 0,001$). A vascularização da MV no grupo OP 4% foi inferior apenas quando comparada ao

grupo OS 2% ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Em 96 horas de incubação a vascularização da MV dos embriões das aves do grupo OS 4% foi inferior a vascularização das MV dos grupos OP 2% ($p < 0,5$) e DC ($p < 0,01$), não sendo observada diferença significativa entre os demais grupos. Estas variações podem indicar que as diferentes concentrações e tipos de PUFA utilizados nas rações interferiram nos estágios iniciais de formação da rede vascular na membrana extra-embriônica e que, como proposto por Dewailly et al. (2001; 2003) e Harris et al. (2009) o metabolismo dos ácidos graxos n-3 e n-6 geram compostos com efeito anti-angiogênico. Entretanto, em 120 horas de incubação não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Vico et al. (1998) sugeriram que após 100 horas de incubação a complexidade da rede vascular formada oferece um suprimento metabólico suficiente ao embrião. Em nosso experimento este fato se confirmou ao observamos que entre 96 e 120 horas de incubação a taxa de variação da dimensão fractal para todos os grupos experimentais não foi estatisticamente significativa (Tab. 4).

Tabela 4. Taxa de variação (%) da dimensão fractal obtida pelo método de contagem por caixas para os diferentes tratamentos

Tratamento	DC	OP 2%	OP 4%	OS 2%	OS 4%
Período de incubação (h)					
Entre 72 e 96	6,2*	6,1*	5,7*	1,1 ^{NS}	3,5 ^{NS}
Entre 72 e 120	9,3***	7,6**	8,4**	5,8 ^{NS}	6,9***
Entre 96 e 120	3,1 ^{NS}	1,5 ^{NS}	2,6 ^{NS}	4,8 ^{NS}	3,4 ^{NS}

*** para $p < 0,001$; ** para $p < 0,01$; * para $p < 0,05$; ^{NS} Não significativo.

CONCLUSÃO

Existe uma relação entre a fonte de ácido graxo da dieta e o metabolismo dos lipídios, observada por alterações nos perfis lipídicos como os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e HDL. Entretanto, no processo inicial da formação dos vasos, essas alterações do perfil lipídico não interferem na dinâmica do crescimento vascular uma vez que durante o período embrionário esse crescimento ocorre num estágio anterior a adipogênese.

Uma inibição do crescimento vascular ocorreu na MV dos embriões de codornas que receberam maiores concentrações de PUFA n-3 e n-6. Sendo assim, sugere-se que a inibição do crescimento vascular está diretamente relacionada com

a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados disponibilizados ao metabolismo lipídico, não descartando entrante, que estes metabólitos estejam diretamente relacionados ao processo da neovasculogênese, como proposto por Halbe, Cunha (2008).

A membrana vitelina, assim como a membrana corioalantóide, se mostra um modelo experimental adequado para o estudo das alterações dos padrões vasculares, principalmente no que se refere a formação inicial da árvore vascular (vasculogênese).

A análise fractal se mostra um método matemático confiável para a quantificação do crescimento vascular em modelos *in vivo* como membrana vitelina como anteriormente observado por outros autores utilizando a membrana corioalantóide e outros modelos biológicos.

AGRADECIMENTOS

À Netuno Alimentos S/A pela doação do óleo de peixe. À FACEPE pela concessão de Bolsa de Pós-Graduação. Ao LABTEC pelo espaço cedido para alojamento das aves. A EEPAC/ UFRPE pela doação das aves. Ao CENAPESQ/ UFRPE, pelo Laboratório de Química Analítica. Ao professor Dr. Joaquim Evêncio pelo empréstimo das gaiolas utilizadas para alojamento das aves.

REFERÊNCIAS

- ALPARSLAN, G.; ÖZDOGAN, M. The Effects of Diet Containing Fish Oil on Some Blood Parameters and the Performance Values of Broilers and Cost Efficiency. *Int. J. Poultry Sci.*, vol. 5, pp. 415-419, 2006.
- AVAKIAN, A.; KALINA, R.E.; SAGE, E.H. et al. Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Cur. Eye Res.*, vol. 24, n. 4, pp. 274-280, 2002.
- BARTSCH, H.; NAIR, J.; OWEN, R.W. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role and risks modifiers. *Carcinogenesis*, vol. 20, n. 12, p. 2209-18, 1999.
- BASSINGTHWAIGHTE, J.B.; LIEBOVITCH, L.S.; WEST, B.J. *Fractal physiology*. New York: Oxford University Press, 1994. 364 p.
- CALDER, P.C. Effects of fatty acids and dietary lipids on cells of the immune system. *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 55, pp. 127-50, 1996.

- CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 36, n. 4, pp. 433-446, 2003.
- CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIÈ, O. et al. Inducible nitric oxid synthase expression in human colorectal cancer. *Am. J. Pathol.*, vol. 162, n. 3, pp. 793-801, 2003.
- CIANCHI, F.; CORTESINI, C.; FANTAPPIÈ, O. et al. Ciclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxid in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, n. 8, pp. 2694-2704, 2004.
- CHUNG, W.S.; LAI, K.M.; HSU, K.C. Comparative Study on Histological Structures of the Vitelline Membrane of Hen and Duck Egg Observed by Cryo-Scanning Electron Microscopy. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, pp. 1794–99, 2010.
- CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.*, vol. 49, pp. 507-512, 2001.
- DEWAILLY, E.; BLANCHET, C.; LEMIEUX, S. et al. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. *Am. J. Clin. Nut.*, vol. 74, n. 4, pp. 464-473, 2001.
- DEWAILLY, E.; BLANCHET, C.; GINGRAS, S. et al. Fish Consumption and Blood Lipids in Three Ethnic Groups of Québec (Canada). *Lipids*, vol. 38, n. 4, pp. 359-365, 2003.
- DINIZ, Y.S.; CICOGNA, A.C.; PADOVANI, C.R. et al. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition*, vol. 20, n. 2, pp. 230-234, 2004.
- FEDER, J. *Fractals*. New York: Plenum press. 1988. 283p.
- FERREIRA, L.J.B.I. *Estudo sobre a concentração de colesterol total, colesterol HDL e colesterol triacilglicerol em gema de ovos de codornas*. 2002. 53f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- GRIZZI, F.; RUSSO, C.; COLOMBO, P. et al. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complety: the surface fractal dimension. *BMC Cancer*, vol. 5, n. 14, pp. 1-9, 2005.
- HALBE, H.W.; CUNHA, D.C. O excesso do órgão adiposo. *Diagn Tratamento*, vol. 13, n. 4, pp. 153-60, 2008.

- HARRIS, W.; MOZAFFARIAN, D.; RIMM, E. et al. Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association, Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, vol. 119, pp. 902-907, 2009.
- HENDRIX, M.J.C.; SEFTOR, E.A.; HESS, A.R. et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, pp. 411-442, 2003.
- LORTHOIS, S.; CASSOT, F. Fractal analysis of vascular networks: Insights from morphogenesis. *J. Theor. Biol.*, vol. 262, pp. 614–633, 2010.
- MANCARDI, D.; VARETTO, G.; BUCCI, E. et al. Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. *Theor. Biol. Med. Model.*, vol. 5, n. 12, pp. 1-8, 2008.
- MANDELBROT, B.B. *Objetos fractais*. Lisboa: Gradiva. 1991.
- MOLENA-FERNANDES, C.A.; SCHIMIDT, G.; NETO-OLIVEIRA, E.R. et al. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. *Rev. Bras. Pl. Med.*, vol. 12, n. 2, pp. 201-207, 2010.
- MURATA, L.S.; ARIKI, J.; MACHADO, C.R. et al. Effect of Oils Sources on Blood Lipid Parameters of Commercial Laying Hens. *Braz. J. Poultry Sci.*, vol. 5, n. 3, pp. 203-206, 2003.
- NARAYANAM, B.A.; NARAYANAM, N.K.; SIMI, B. et al. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, vol. 63, n. 5, pp. 972-5, 2003.
- NATIONAL RESEARCH CONCIL. *Nutrient Requeriments of Poultry*. 9 ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences, 1994, 44-45p.
- NAVIDSHAD, B; DELDAR, H; POURRAHIMI, G. Correlation between serum lipoproteins and abdominal fat pad in broiler chickens. *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 9, n. 35, pp. 5779-5783, 2010.
- O'SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I.C. Imunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nut.*, vol. 79, n. 6, pp. 1199S-1206S, 2004.
- PARSONS-WINGERTER, P.; LWAI, B.; YANG, M.C. et al. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and

inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvasc. Res.*, vol. 55, n. 3, pp. 201-214, 1998.

PEREIRA, C.A.; BARRETO, S.L.T.; ROSTAGNO, H.S. Desempenho de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de cálcio durante o pico de postura. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

SAFAMEHR, A.; AGHAEI, N.; MEHMANNAVAZ, Y. The influence of different levels of dietary fish oil on the performance, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. *Res. J. Biol. Sci.*, vol. 10, pp. 1202-1207, 2008.

SHENG, G. Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view. *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 54, pp. 1033-1043, 2010.

SIM, J.S.; BRAGG, D.B.; HODGSON, G.C. Effect of dietary animal tallow and vegetable oil on fatty acid composition of egg yolk, adipose tissue and liver of laying hens. *Poult. Sci.*, vol. 52, n. 1, pp. 51-57, 1973.

TOTH, P. High-density lipoprotein and cardiovascular risk. *Circulation*, vol. 109, pp. 1809-1812, 2004.

VICO, P.G.; KYRYACOS, L.; HEYMANS, O. et al. Dynamic Study of the Extraembryonic Vascular Network of the Chick Embryo by Fractal Analysis. *J. Theor. Biol.*, vol. 195, pp. 525-532, 1998.

Análise fractal do crescimento vascular em membrana vitelina de embriões de codorna japonesa suplementadas com ácidos graxos n-3 e n-6²

SILVA, J.E.S.¹, MOURA, A.M.A.², NOGUEIRA, R.A.³

1,3 Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal – UFRPE, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Cidade Universitária, 50670-420 – Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor correspondente: R. A. Nogueira, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: +55-81-3320-6057. E-mail: ran.pe@terra.com.br

² Artigo redigido de acordo com as normas da Revista Journal of Membrane Biology.

Resumo

O objetivo deste estudo foi realizar a análise do crescimento vascular na membrana vitelina (MV) de embriões de codornas japonesas suplementadas com ácidos graxos n-3 e n-6. As aves foram suplementadas com 2 ou 4% de óleo de peixe ou óleo de soja. A quantificação da vascularização na membrana vitelina foi obtida pela dimensão fractal usando os métodos de box-counting e dimensão de informação. DLA foram gerados e seu crescimento comparado com o crescimento vascular. A dimensão fractal calculada pelos métodos de box-counting e dimensão de informação mostraram que a vascularização da MV dos embriões dos grupos que receberam maiores concentrações de óleo de peixe e de soja foi inferior a vascularização das MV dos demais grupos. A dimensão fractal do DLA foi superior aquelas observadas para as dimensões das MV de todos os grupos experimentais. As diferenças entre as dimensões fractais obtidas pelos métodos de box-counting e dimensão de informação foram estatisticamente significativas para todos os grupos avaliados.

Palavras-chave: box-counting, dimensão de informação, DLA, fractal, membrana vitelina, vascularização.

Abstract

The aim of this study was to realize a fractal analysis of vascular growth in embryo vitelline membrane (VM) of Japanese quails supplemented with n-3 and n-6 fatty acid. These birds were supplemented with 2 or 4% fish oil or soybean oil. The quantification of vitelline membrane vascularization was obtained by fractal dimension using both box-counting and information dimension methods. A DLA was generated and its growth compared with the vascular growth. The fractal dimension calculated by both methods showed that the VM vascularization of the groups receiving higher fish and soybean oil concentrations was lower than others groups. The DLA fractal dimension was significantly higher than those observed for the VM fractal dimension for all experimental groups. Differences between the values of fractal dimension obtained by box-counting and information dimension methods were statistically significant for all groups.

Keywords: box-counting, information-dimension, DLA, fractal, vitelline membrane, vascularization.

INTRODUÇÃO

O sistema vascular está envolvido no crescimento e proliferação celular normal e patológica, nos processos de reparação de tecidos e nos distúrbios circulatórios. Este sistema responde a fatores estimulantes, moduladores e inibitórios com regressão, proliferação e remodelação da microvasculatura, alterando a dinâmica do fluxo sanguíneo e, portanto, modificando o aporte de oxigênio e nutrientes aos diversos tecidos do organismo. Entre os processos de remodelagem da vascularização é possível distinguir dois diferentes mecanismos de formação de novos vasos sanguíneos: a vasculogênese e a angiogênese (Conway et al., 2001).

Na vasculogênese, células precursoras (angioblastos e hemangioblastos) derivadas da parede da membrana vitelina coalescem e se diferenciam em células endoteliais, e formam uma rede vascular primitiva. O remodelamento dessa rede ocorre através da angiogênese, que envolve brotamento, intussuscepção e/ou ligação, resultando na formação de microvasos (Hendrix et al., 2003).

A angiogênese ocorre tanto no embrião quanto no indivíduo adulto, sendo um processo importante para o restabelecimento do fluxo sanguíneo nos tecidos após uma injúria, na cicatrização e em fêmeas durante o ciclo reprodutivo. Entretanto, em diversas patologias, como em alguns tipos de câncer e cardiopatias resultam da perda do controle do organismo sobre a angiogênese e ocorrem quando os novos vasos crescem de forma excessiva ou insuficiente (Dias et al., 2002; Schwartz et al., 2008; Melo-Reis et al., 2010). Atrelado a esse fato, patologias crônicas são frequentemente associadas com anormalidades no metabolismo dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), como doença coronariana, hipertensão, diabetes, câncer e desordens auto-imunes, eczema atópico, depressão, esquizofrenia, Alzheimer, esclerose múltipla, etc. (Zamaria, 2004).

Dentre os PUFA, o ácido aracdônico e os eicosanóides derivados dos ácidos linoléico e α -linolênico compõem a cascata de formação de outros mediadores químicos pró ou antiinflamatórios, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (O'Shea et al., 2004) e podem reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (Narayanam et al., 2003), que por sua vez, possui correlação positiva com a expressão da cicloxigenase 2 (COX-2) e com a angiogênese (Cianchi et al., 2003; 2004).

Devido a sua complexidade, alterações no processo de crescimento vascular podem ser quantificadas através da geometria fractal (Gaudio et al., 2005; Grizzi et

al., 2005; Lorthois, Cassoti, 2009). O termo fractal (do radical *fractus*) foi cunhado por Mandelbrot que reuniu, criou e popularizou uma grande coleção de objetos 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, que se caracterizam pela inexistência de medidas de centralidade e dispersão dos objetos e processos fractais (Bassingthwaighte et al., 1994).

Na avaliação do processo de crescimento vascular, a membrana do saco vitelino (MV) tem sido utilizada como modelo *in vivo* devido a sua acessibilidade a observação e experimentação. Essa membrana é formada a partir de secreções emitidas pelo epitélio folicular e oviduto, sendo constituída de uma membrana interna e uma membrana externa (Chung et al., 2010).

A MV é dividida em área vitelina (região da membrana que ainda não contém células do mesoderma) e área vasculosa (local onde ocorre a hematopoese e vasculogênese no saco vitelino, marcada lateralmente pela extensão da invasão do mesoderma extra-embriônico). Com o desenvolvimento embriônico, a área vasculosa abrange toda a gema e a área vitelina desaparece. A eritropoiese inicial do saco vitelino ocorre no mesoderma extra-embriônico, antes da expansão do celoma extra-embriônico e da invasão do alantóide (Sheng, 2010). No embrião há estreitas relações espaço-temporais entre a vasculogênese e a adipogênese, e o surgimento de novos vasos (angiogênese) acoplado a diferenciação dos adipócitos (Nishimura et al, 2007).

Estudos das alterações causadas nos perfis lipídicos do organismo animal e suas implicações no crescimento vascular podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo. Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar, usando a teoria dos fractais, o processo de vascularização da membrana vitelina de embriões de codorna japonesa alimentadas com dietas enriquecidas com óleo de soja ou óleo de peixe, verificando se o método de cálculo empregado para obtenção da dimensão fractal produz alterações significativas na quantificação do crescimento vascular.

METODOLOGIA

Bioensaios

Foram selecionadas 80 codornas japonesas (*Coturnix japonica*) provenientes da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina – Campus Avançado UFRPE, sendo 60 fêmeas e 20 machos, alojadas em gaiolas metálicas (100 x 30 x 20 cm), sobrepostas em cinco andares com quatro gaiolas cada. Cada gaiola foi equipada com comedouro e bebedouro tipo calha. As aves foram distribuídas em delineamento em blocos inteiramente casualizados (DBC), cinco tratamentos, quatro repetições para cada tratamento e quatro aves por unidade experimental, numa relação de 1 macho para 3 fêmeas. O experimento teve duração de 63 dias.

As aves foram alimentadas com ração *ad libitum* (30g / ave/ dia) e água fresca, sendo mantidas sob um programa de luz contínuo de 17 horas/ dia (artificial). A temperatura média da sala foi ajustada para 25°C. Os tratamentos foram constituídos por quatro rações experimentais e uma ração referência, formuladas de acordo com as exigências para codornas em postura descritas no NRC (National Research Council, 1994), com exceção do cálcio, cujo nível foi descrito por Pereira et al. (2004). De acordo com o tratamento ao qual foram submetidos os grupos receberam a seguinte denominação: Dieta Controle (DC), Óleo de Peixe 2% (OP 2%), Óleo de Peixe 4% (OP 4%), Óleo de Soja 2% (OS 2%) e Óleo de Soja 4% (OS 4%). Para formulação das rações utilizou-se o software SuperCrac v.5.4 da TDNet, Viçosa, MG (2002), conforme Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal e nutricional das rações experimentais para codornas em fase de postura.

Tratamento	Controle	OP 2%	OP 4%	OS 2%	OS 4%
Componente					
Milho	52,7509	52,7257	52,7257	52,7257	52,7257
Farelo de soja	35,6252	34,4726	34,4726	34,4726	34,4726
Calcário calcífero	6,4616	6,4635	6,4635	6,4635	6,4635
Óleo de peixe	0,0000	2,0000	4,0000	0,0000	0,0000
Óleo de soja	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	4,0000
Inerte	3,0000	2,1895	0,1895	2,1895	0,1895
Fosfato bicálcico	1,5682	1,5801	1,5801	1,5801	1,5801

Sal comum	0,3302	0,2772	0,2772	0,2772	0,2772
Premix vitamínico e mineral ⁽¹⁾	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000
DL-metionina total	0,1539	0,1688	0,1688	0,1688	0,1688
L-lisina HCl total	0,0000	0,0126	0,0126	0,0126	0,0126
B H T ⁽²⁾	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100	0,0100
Total	100	100	100	100	100
Calculado					
Proteína Bruta (%)					20,000
Energia Metabolizável (Kcal/Kg)					2.8000
Fósforo disponível (%)					0,4000
Cálcio (%)					3,0000
Metionina + Cisteína total (%)					0,8000
Metionina total (%)					0,5103
Lisina total (%)					1,1000

¹ Níveis de garantia por quilo do produto: Vit. A (8000000 UI), Vit. D3 (2000000 UI), Vitamina E (15000mg), Vit. K3 (1960mg), Vit. B2 (4000mg), Vit. B6 (1000mg), Vit. B12 (100000mcg), Niacina (19800mg), Ác. pantotênico (5350mg), Ác. Fólico (200mg), Manganês (32500mg), Zinco (50000mg), Ferro (20000mg), Cobre (4000mg), Iodo (1500mg), Selênio (250mg), Cobalto (200mg), Antioxidante (100000mg).

² Antioxidante.

Após o período de adaptação, se iniciou a coleta dos ovos das aves dos referidos grupos experimentais. A coleta foi feita duas vezes ao dia, sendo a primeira no início da manhã e a segunda no final da tarde. Os ovos de cada parcela foram contabilizados e identificados de acordo com o grupo experimental. A desinfecção da casca do ovo foi realizada com uma solução de peróxido de hidrogênio formado por 0,6 mL de peróxido de hidrogênio a 3% com 100 ml de água destilada. Para a incubação, foram selecionados ovos com formato regular e casca íntegra. Os ovos foram incubados de acordo com Pedroso et al. (2006).

Os ovos foram abertos após 24 horas de incubação. Uma janela (2,0 x 2,0 cm aproximadamente) foi feita com tesoura esterilizada, para remoção de 1 mL de albúmen para melhor visualização da membrana vitelina bem como de sua vascularização. Após a retirada do albúmen, a janela foi selada com parafilme para evitar dessecação do embrião.

Método Computacional

Após 72h de incubação as imagens da rede vascular da membrana vitelina (MV) foram capturadas com câmera digital Sony® 10.1 mp (1920 x 1980 pixels) em intervalos de 24 horas de incubação (72, 96 e 120 horas). Em seguida foi realizada a segmentação e esqueletização da vascularização da MV. A segmentação consiste em extrair a imagem dos vasos sanguíneos da imagem da MV. Nesta segmentação foi usada a dimensão de um pixel para todos os vasos, processo denominado esqueletização, considerado um indicador muito sensível de alterações na distribuição vascular (Parsons-Wingenter et al., 1998; Avakian et al., 2002). A vascularização da membrana vitelina foi segmentada e esqueletizada usando-se uma rotina computacional semi-automática (Fig. 1).

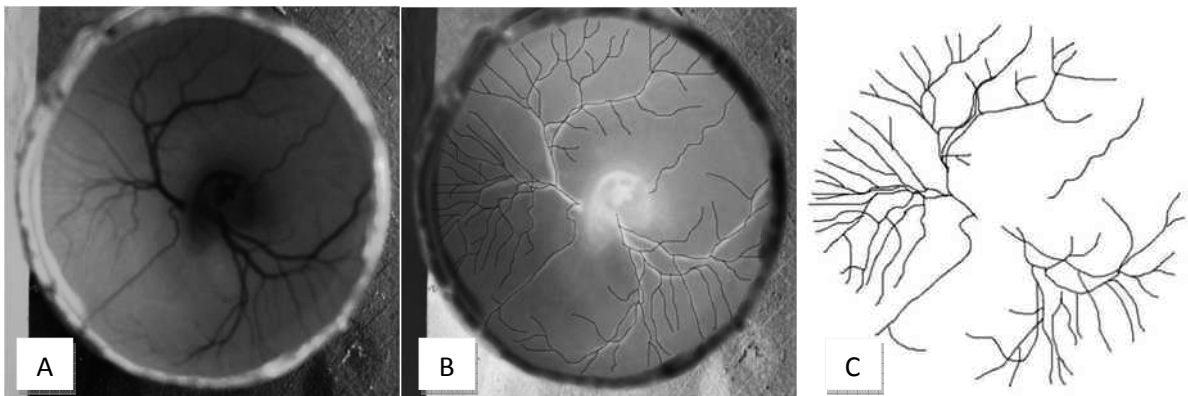


Figura 1. Processo de segmentação e esqueletização da imagem da vascularização da MV de embriões de codorna japonesa. A rede vascular da MV; B obtenção do negativo da imagem, com destaque da vascularização em contraste com o fundo da imagem e segmentação dos vasos da MV; C binarização e esqueletização da imagem, para obtenção de padrão em preto e branco.

Difusão limitada por agregação (DLA)

Objetos fractais podem ser gerados a partir de algoritmos recursivos, pelos quais é possível obter curvas, funções ou formas que apresentam propriedades fractais. A difusão limitada por agregação (DLA) é uma estrutura fractal conhecida que é construída a partir do seguinte procedimento: de um ponto qualquer de um círculo é liberada uma partícula que é adsorvida por uma partícula que se encontra no centro deste círculo. Quando a partícula é adsorvida, uma nova partícula é liberada aleatoriamente de uma posição do círculo. Este processo vai sendo

repetido um grande número de vezes e um DLA vai sendo formado (Witten, Sanders, 1981).

Foram gerados 45 DLA de 2000 pixels utilizando um programa desenvolvido em linguagem C para uma grade de 300 x 300 pixels (Fig. 2). Em seguida, suas dimensões fractais foram calculadas pelo método de box-counting e dimensão de informação, buscando verificar se o valor médio da D dessa estrutura é semelhante aos valores da D da vascularização da MV, visto que o DLA é uma estrutura fractal conhecida e possui dimensão fractal semelhante a da vascularização da retina humana (Araújo et al., 2004; Masters, 2004).



Figura 2. DLA com 2000 pontos gerado em programa de linguagem C para uma grade de 300 x 300 pixels.

Método teórico

Para obtenção do valor médio da dimensão fractal (D) da vascularização das MV de codornas japonesas e dos DLA foram utilizados os métodos de contagem por caixas (box-counting) e dimensão de informação (Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, TruSoft International Inc. 2004).

O método de box-counting (Feder, 1988; Mandelbrot, 1991) 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 log-log de $N(r)$ em função de r (lados das caixas). O ângulo de inclinação desse gráfico é a dimensão de box-counting (D_{bc}), que pode ser definida formalmente, através da equação (1).

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

A dimensão de informação é uma dimensão de cobertura que 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 (Viksec, 1991). Formalmente, a dimensão de informação (D_i) é definida pela equação (2).

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

onde

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

é denominada Entropia de Kolmogorov. N é o número de caixas e $m_i = MI/M$, sendo MI o número de pontos na i -ésima caixa e M o número total de pontos do objeto fractal.

Análise estatística

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição dos dados obtidos. Posteriormente, realizou-se uma ANOVA e um teste post-hoc de Tukey ($\alpha = 95\%$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise fractal da vascularização da membrana vitelina

Em nossos experimentos, a membrana vitelina de embriões de codorna japonesa foi usada para analisar o processo de vascularização dessa membrana em ovos de codornas submetidas a dietas com suplementação de diferentes fontes lipídicas. A vascularização dessa membrana sofreu interferência da quantidade e qualidade da suplementação com PUFA oferecida as aves (Tab. 2).

Tabela 2. Dimensão fractal ($M \pm SD$) obtida pelos métodos de box-counting (D_{bc}) e dimensão de informação (D_i) para os diferentes tratamentos em distintos tempos de incubação e para o DLA.

Período de incubação	72h			96h			120h		
	Tratamento	n	D_{bc}	D_i	n	D_{bc}	D_i	n	D_{bc}
DC	31	1,25±0,06	1,29±0,06	14	1,31±0,06	1,35±0,05	7	1,34±0,04	1,38±0,04
OP 2%	19	1,23±0,06	1,27±0,05	19	1,29±0,05	1,33±0,04	14	1,30±0,06	1,34±0,05
OP 4%	24	1,21±0,04	1,25±0,04	19	1,27±0,04	1,30±0,04	9	1,29±0,03	1,33±0,03
OS 2%	24	1,26±0,06	1,30±0,06	17	1,27±0,06	1,31±0,06	9	1,32±0,04	1,35±0,04
OS 4%	25	1,20±0,04	1,24±0,04	16	1,23±0,05	1,28±0,04	11	1,27±0,04	1,30±0,04
DLA	15	1,43±0,02	1,44±0,01	15	1,43±0,02	1,44±0,01	15	1,43±0,02	1,44±0,01

Em 72 horas de incubação a vascularização da MV dos embriões das aves do grupo OS 4% foi inferior a vascularização das MV dos grupos DC ($p < 0,01$) e OS 2% ($p < 0,001$). A vascularização da MV do grupo OP 4% foi inferior apenas quando comparada ao grupo OS 2% ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Em 96 horas de incubação a vascularização da MV dos embriões das aves do grupo OS 4% foi inferior a vascularização das MV dos grupos OP 2% ($p < 0,05$) e DC ($p < 0,01$), não sendo observada diferença significativa entre os demais grupos.

Estas variações podem indicar que as diferentes concentrações de ômega-3 e ômega-6 utilizados nas rações interferiram nos estágios iniciais de formação da rede vascular na membrana extra-embriônica. Sendo assim, sugere-se que a inibição do crescimento vascular está diretamente relacionada com a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados disponibilizados ao metabolismo lipídico. Estes resultados estão de acordo com Harris et al. (2009) que sugerem que o PUFA omega-6 é capaz de suprimir a produção de moléculas de adesão, quimiocinas, interleucinas e a angiogênese.

Em 120 horas de incubação não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Vico et al. (1998) sugeriram que após 100 horas de incubação a complexidade da rede vascular formada oferece um suprimento metabólico suficiente ao embrião.

Comparação entre os métodos de cálculo da dimensão fractal

A figura 3 mostra diferenças entre os valores das dimensões fractais obtidas

pelos métodos de box-counting e dimensão de informação.

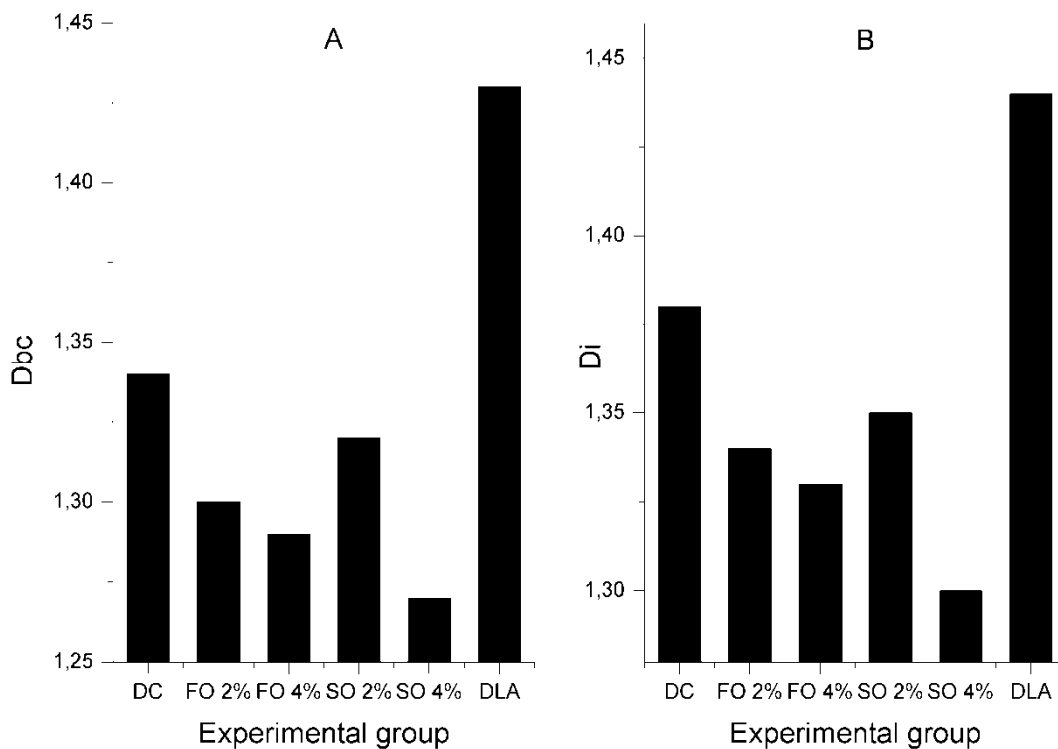


Figura 3. Dimensão fractal obtida pelos métodos de box-counting (D_{bc}) e dimensão de informação (D_i) para o DLA e para a vascularização da membrana vitelina dos grupos experimentais. A Método de box-counting (D_{bc}). B Método de dimensão de informação (D_i). Dieta controle (DC), Óleo de peixe 2% (FO 2%), Óleo de peixe 4% (FO 4%), Óleo de soja 2% (SO 2%) e Óleo de soja 4% (SO 4%) em 120 horas de incubação.

As diferenças entre os valores de dimensão fractal foram estatisticamente significativos para todos os grupos. A dimensão fractal do DLA obtida por ambos os métodos foi maior do que aquele observado para as dimensões fractais da vascularização da MV dos grupos experimentais ($p < 0,001$).

A dimensão fractal do DLA foi superior aquelas observadas para as dimensões fractais da vascularização das MV de todos os grupos experimentais tanto quando para o método de box-counting quanto para dimensão de informação ($p < 0,001$). Ao comparar-se o método empregado para quantificar um determinado processo fractal, observa-se que quando se utiliza o método de dimensão de

informação, os valores obtidos são superiores aqueles observados quando utilizamos a dimensão de box-counting.

Assim como observado para vasculatura retiniana (Mendonça et al., 2007), a dimensão fractal da vascularização da MV e do DLA depende do método de cálculo utilizado, o que nos leva a considerar a importância da escolha do mesmo na quantificação de uma estrutura ou processo fractal.

A geometria fractal mostrou-se útil para quantificar o crescimento vascular promovido pelos PUFA ω -3 e ω -6, como anteriormente verificado para outros promotores e inibidores do crescimento vascular.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, sugerimos que existe uma relação entre os PUFA ω -3 e ω -6 e os mecanismos regulatórios dos processos do crescimento e da remodelação vascular e que a fonte de ácido graxo da dieta interfere no metabolismo dos lipídios que participam da composição do vitelo. Entretanto, no processo inicial da formação dos vasos, essas alterações do perfil lipídico não interferem na dinâmica do crescimento vascular uma vez que durante o período embrionário o crescimento vascular ocorre num estágio anterior a adipogênese.

A membrana vitelina, assim como a membrana corioalantóide, se mostra um modelo experimental adequado para o estudo das alterações dos padrões vasculares, principalmente no que se refere a formação inicial da árvore vascular (vasculogênese).

A análise fractal se mostra um método matemático confiável para a quantificação do crescimento vascular em modelos *in vivo* como membrana vitelina de aves, como anteriormente observado por outros autores utilizando a membrana corioalantóide. O método de cálculo adotado para a análise fractal produz significativas alterações nos valores da dimensão fractal das estruturas avaliadas, sendo assim, é de fundamental importância a escolha do mesmo, levando em consideração o tipo de estrutura avaliado.

AGRADECIMENTOS

À Netuno Alimentos S/A pela doação do óleo de peixe. À PRPPG/ UFRPE e

FACEPE pelo auxílio financeiro e Bolsa de Pós-Graduação. A EEPAC/ UFRPE pela doação das aves.

REFERÊNCIAS

- Avakian A, Kalina RE, Sage EH et al. (2002). Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Cur Eye Res*, 24:274-280.
- Bassingthwaighte JB, Liebovitch LS, West BJ. (1994). *Fractal physiology*, New York: Oxford University Press, 364 p.
- Chung WS, Lai KM, Hsu KC (2010). Comparative Study on Histological Structures of the Vitelline Membrane of Hen and Duck Egg Observed by Cryo-Scanning Electron Microscopy. *J Agric Food Chem*, 58:1794–1799.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, et al. (2003). Inducible nitric oxid synthase expression in human colorectal cancer. *Am J Pathol*. 162(3):793-801.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, et al. (2004). Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxid in colorectal cancer, *Clin Cancer Res*, 10(8):2694-2704.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, 49:507-512.
- Dias PF, Ribeiro-do-Valle RM, Maraschim RP, et al. (2002). Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos, *Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento*, 25:28-34.
- Feder J. (1988). *Fractals*. New York: Plenum press. 283p.
- Gaudio E, Chaberek S, Montella A, et al. (2005). Fractal and fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver, *J Anat.*, 207(2):107-115.
- Grizzi F, Russo C, Colombo P, et al. (2005). Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension, *BMC Cancer*, 5(14):1-9.
- Harris W, Mozaffarian D, Rimm E, et al. (2009). Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular disease. A Science Advisory from the American Heart Association, Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention, *Circulation*, 119:902-907.

- Halbe HW, Cunha DC (2008). O excesso do órgão adiposo, *Diagn Tratamento*, 13(4):153-60.
- Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, et al. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma, *Nat Rev Cancer*, 3:411- 442.
- Kunicki ACB, Oliveira AJ, Mendonça M et al. (2009). Can fractal analysis be applied in precocious diagnosis of the non-proliferative diabetic retinopathy?, *Braz J Med Biol Res*, 42:930 - 934.
- Lorthois S, Cassot F. (2010). Fractal analysis of vascular networks: Insights from morphogenesis. *J Theoretical Biol*, 262:614–633.
- Masters BR. (2004). Fractal analysis of the vascular tree in the human retina, *Annu Rev Biomed Eng*, 6:427–452.
- Mandelbrot BB. (1991). *Objetos fractais*. Lisboa: Gradiva.
- Melo-Reis PR, Andrade LS, Silva CB., et al. (2010). Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex, *Braz J Biol*, 70(1):189-194.
- Mendonça MBM, Garcia CAA, Nogueira RA, et al. (2007). Análise fractal da vasculatura retínica: métodos de segmentação e de cálculo dimensional, *Arq Bras Oftalmol*, 70(3):413-422.
- Narayanam BA, Narayanam, NK, Simi B, et al. (2003). Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells, *Cancer Res*, 63(5):972-975.
- National Research Council (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences. 44-45 p.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*, 56(6):1517-1526.
- O’Shea M, Bassaganya-Riera J, Mohede IC. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid, *Am J Clin Nutri*, 79(6):1199S-1206S.
- Parsons-Wingert P, Lwai B, Yang MC, et al. (1998). A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection, *Microvasc Res*, 55(3):201–214.

- Parsons-Wingerter P, Elliott KE, Farr Andrew G, et al. (2000). Generation analysis reveals that TGF- β 1 inhibits the rate of angiogenesis in vivo by selective decrease in the number of new vessels, *Microvasc Res*, 59(2):221-232.
- Parsons-Wingerter P, Chandrasekharan UM, McKay TL, et al. (2006). A VEGF165-induced phenotypic switch from increased vessel density to increased vessel diameter and increased endothelial NOS activity, *Microvasc Res*, 72:91-100.
- Pedroso AA, Café, MB, Leandro NSM, et al. (2006). Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas. *R Bras Zootec*, 35(6):2344-2349.
- Pereira CA, Barreto SLT, Rostagno, HS. 2004. Desempenho de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de cálcio durante o pico de postura. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 41, 2004, Campo Grande. Anais. Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia.
- Schwartz S, George J, Ben-Shoshan J, et al. (2008). Drug Modification of Angiogenesis in a Rat Cornea Model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48:250–254.
- Sheng G. (2010). Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view, *Int J Dev Biol*, 54:1033–1043.
- Vico PG, Kyriacos L, Heymans O., et al. 1998. Dynamic Study of the Extraembryonic Vascular Network of the Chick Embryo by Fractal Analysis. *J Theor Biol*, 195:525–532.
- Vicsek T. (1991). *Fractal growth phenomenon*. Singapore: World Scientific.
- Witten TA, Sanders LM. (1981). Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon. *Phys Rev Lett*. 47(19):1400–1403.
- Zamaria N. (2004). Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease. *Reprod Nutr Dev*, 44:273-282.

ANEXOS**Fractal analysis of vascular growth in embryo vitelline membrane of Japanese quail supplemented with n-3 and n-6**

SILVA, J. E. S.¹, MOURA, A. M. A.² and NOGUEIRA, R. A.¹

1 Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding author: R.A. Nogueira, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil. Fax: +55-81-3320-6057. E-mail: ran.pe@terra.com.br

Abstract

The aim of the study was to investigate the effect of different methods of calculating fractal dimension on quantification vascular growth in the Japanese quails embryos vitelline membrane (VM) and also compare the fractal dimension of that structure with the DLA dimension. These birds were supplemented with fish oil or soybean oil. The quantification of vitelline membrane vascularization was obtained by fractal dimension using both box-counting and information dimension methods. DLA were generated by a computational program. The fractal dimension showed that the VM vascularization of the groups receiving higher fish and soybean oil concentrations was lower than others groups. The DLA fractal dimension was higher than those observed for the VM fractal dimension for all experimental groups. Differences between the values of fractal dimension obtained by box-counting and information dimension methods were statistically significant for all groups.

Keywords: box-counting, information-dimension, DLA, fractal, vitelline membrane, vascularization.

INTRODUCTION

The vascular system is involved in normal and pathological cell growth and proliferation, processes of tissue repair and circulatory disorders. This system responds to stimulants, modulators and inhibitory factors with regression, proliferation and remodeling of the microvasculature, altering blood flow dynamics and thus changing the supply of oxygen and nutrients to various body tissues. Among the processes of vascular remodeling is possible to characterize two different mechanisms of new blood vessels formation: vasculogenesis and angiogenesis (Conway et al., 2001).

In vasculogenesis, precursor cells (called hemangioblast and angioblastic) from the wall of the vitelline membrane coalesce and differentiate into endothelial cells and form a primitive vascular network. The remodeling of this network occurs via angiogenesis, which involves sprouting, intussusception and / or link, resulting in the formation of microvessels (Hendrix et al., 2003).

Angiogenesis occurs naturally both in embryo and in adult, been a important process during the healing, restore blood flow to tissues after injury and in females during the reproductive cycle. However, several diseases are associated with insufficient or excessive growth of blood vessels, due to loss of angiogenesis control by the body. Among these diseases are cancer and diseases that affect the cardiovascular system (Dias et al., 2002; Schwartz et al., 2008; Melo-Reis et al., 2010). Tied to this fact, chronic diseases are often associated with abnormalities in the metabolism of polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as coronary disease, hypertension, diabetes, cancer and autoimmune disorders, atopic eczema, depression, schizophrenia, Alzheimer's, multiple sclerosis, etc.(Zamaria, 2004).

Among the PUFA, the aradonic acid (AA) and eicosanoids derived from linoleic and α -linolenic acids make up the cascade of formation of other pro- or anti-inflammatory chemical mediators such as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes (O'Shea et al.,

2004) and can reduce the expression of nitric oxide synthase (iNOS) (Narayanam et al., 2003), that has positive correlation with the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and angiogenesis (Cianchi et al., 2003; 2004).

The vascular endothelial cell proliferation, migration and formation of capillaries are stimulated by angiogenic growth factors, which include proteins of VEGF, TGF- β , and eicosanoids that are derived from acids n-6 PUFA (Dewailly et al., 2001; 2003). A possible mechanism of the vascular growth control by omega-3 and omega-6 PUFA may be the modulation of VEGF production by PGE₂. The addition of omega-6 PUFA or higher levels of these fatty acids increases production of VEGF compared to diets rich in omega-3 PUFA (Blondeau et al., 2007).

The link between consumption of omega-6 PUFA and inflammatory process is the fact that arachidonic acid is involved in the initial stages of inflammation. However, the derived from linoleic acid can give rise to anti-inflammatory molecules, such as the cells that form the lining of blood vessels. This derived from omega-6 acts suppressing the production of adhesion molecules, chemokines, interleukins and angiogenesis (Harris et al., 2009). Due to its complexity, changes in the process of vascular growth can be quantified by fractal geometry (Gaudio et al., 2005; Grizzi et al., 2005; Lorthois; Cassoti, 2009). The term fractal (radical *fractus*) was coined by Mandelbrot that gathered, created and popularized a large collection of objects characterized by their properties that are: *i*) self-similarity, which means that parts of an object or process resemble the whole object or process; *ii*) scaling, which means that the measured properties depend on the scale at which they are measured; *iii*) fractal dimension, which provides a quantitative description of self-similarity and scaling, and *iv*) the anomalous statistical properties of the fractals, characterized by the absence of measures of centrality and dispersion of fractal objects and processes (Bassingthwaite et al., 1994).

Self-similar structures have details such as branching, pores or roughness in certain range of length scale, whose form is the same at every scale of observation in this range. Thus, if a part of the structure is enlarged will have the same form of the whole, being quite appropriate to describe and assess the complexity of certain structures (Mandelbrot, 1983).

In the evaluation of vascular growth process, the sac vitelline membrane (VM) of birds is used like *in vivo* model due to its accessibility to observation and experimentation. This membrane is formed from secretions emitted by the oviduct and follicular epithelium, consists of an inner membrane and an outer membrane (Chung et al., 2010).

The area vitellina is the region of the yolk sac that does not yet contain mesoderm cells. The area vasculosa, the place where yolk sac vasculogenesis and hematopoiesis take place, is marked laterally by the extent of extraembryonic mesoderm invasion. With the embryonic development the area vasculosa covers the entire yolk and the area vitellina disappears. Early yolk sac erythropoiesis occurs in the extraembryonic mesoderm before the expansion of the extraembryonic coelom and the invasion of the allantois (Sheng, 2010). In the embryo there are narrow space-time relations between adipogenesis and vasculogenesis, and the emergence of new vessels (angiogenesis) coupled to differentiation of adipocytes (Nishimura et al., 2007).

Studies of alterations in lipid profiles caused the animal organism and its implications on vascular growth may help to understand the mechanisms involved in this process. Thus, this study aimed to analyze, using the fractal theory, the process of vascularization of the vitelline membrane of embryos Japanese quail fed diets enriched with soybean oil or fish oil, making sure that the calculation method used to obtain fractal dimension produces significant changes in the quantification of vascular growth.

METHODOLOGY

Bioassays

We used 80 Japanese quail (*Coturnix japonica*), sexed (60 females and 20 males), 60 days old, from Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina – Campi Avançado UFRPE. They were housed in cages (100 x 30 x 20 cm), overlaid on five floors with four cages each. Each cage was equipped with feeders and watering. The birds were allotted to a randomized complete block design, five treatments, four replications for each treatment and four birds each, in a ratio of one male to three females. The experiment lasted 63 days.

The birds were given posture feed (30 g / bird / day) and water ad libitum, and kept under a continuous lighting program of 17 hours / day (artificial). The average temperature of the room was adjusted to 25° C. The treatments consisted of four experimental diets and one reference diet, formulated in accordance with the requirements for laying quail described in the National Research Council (NRC, 1994), except for calcium (Pereira et al., 2004). The groups received the following description, according to the treatment to which submitted: Control diet (CD), Fish Oil 2% (FO 2%), Fish Oil 4% (FO 4%), Soybean Oil 2% (SO 2%) and Soybean oil 4% (SO 4%). To formulate diets we have used the software SuperCrac v.5.4 TDNet, Viçosa, MG (2002) (Table 1).

Table 1. Proximate and nutritional composition of experimental diets for laying quails

Experimental group	DC	FO 2%	FO 4%	SO 2%	SO 4%
Component					
Corn	52.75	52.73	52.73	52.73	52.73
Soybean meal	35.62	34.47	34.47	34.47	34.47
Limestone	6.46	6.46	6.46	6.46	6.46
Fish oil	0.00	2.00	4.00	0.00	0.00
Soybean oil	0.00	0.00	0.00	2.00	4.00
Inert	3.00	2.19	0.19	2.19	0.19
Dicalcium phosphate	1.57	1.58	1.58	1.58	1.58
Salt	0.33	0.28	0.28	0.28	0.28
Vitamin and mineral premix ⁽¹⁾	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Total DL-methionine	0.15	0.17	0.17	0.17	0.17
Total L-lysine HCl	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
Antioxidant B H T	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Total	100	100	100	100	100

Calculated

Crude protein (%)	20.00
Metabolizable energy (Kcal/Kg)	2800
Available Phosphorus (%)	0.40
Calcium (%)	3.00
Methionine + Cistein total (%)	0.80
Methionine total (%)	0.51
Lysine total (%)	1.10

¹ Assurance levels per kilogram of product: Vit. A (8000000 UI), Vit. D3 (2000000 UI), Vit. E (15000mg), Vit. K3 (1960mg), Vit. B2 (4000mg), Vit. B6 (1000mg), Vit. B12 (100000mcg), Niacin (19800mg), Pantothenic acid (5350mg), Folic acid (200mg), Mn (32500mg), Zn (50000mg), Fe (20000mg), Cu (4000mg), I (1500mg), Se (250mg), Co (200mg), Antioxidant (100000mg).

² Antioxidant.

After the adaptation period, it began the collection of eggs. The collection of eggs was made twice a day, the first being early in the morning and the second in late afternoon. Eggs from each plot were counted and identified according to the experimental group. For incubation, eggs with regularly shaped and shell intact were selected. The disinfection of the eggshell was performed with a solution of hydrogen peroxide formed by 0.6 mL of hydrogen peroxide 3% with 100 ml of distilled water. Eggs were incubated according Pedroso et al. (2006).

The eggs were opened after 24 hours of incubation. A window (approximately 2.0 x 2.0 cm) was made with sterile scissors to remove 1 mL of albumen to better visualize the CAM and its vascularization. After removal of the albumen, the window was sealed with parafilm to avoid embryo desiccation.

Computational Method

After 72h of incubation of the eggs, the images (1920 x 1980 pixels) of the CAM vascular network were captured with a digital camera at intervals of 24 hours (72, 96 and 120 hours of incubation). We then carried out the segmentation and skeletonization of CAM

vascularization. The segmentation is to extract the image of the blood vessels of the CAM image. This segmentation was used to dimension of a pixel for all vessels. This process is called skeletonization, being a very sensitive indicator of changes in the vascular distribution (PARSONS-WINGERTER et al., 1998; AVAKIAN et al., 2002). Vascularization of the vitelline membrane was segmented and skeletonized using a semi-automatic computational routine (Fig. 1).

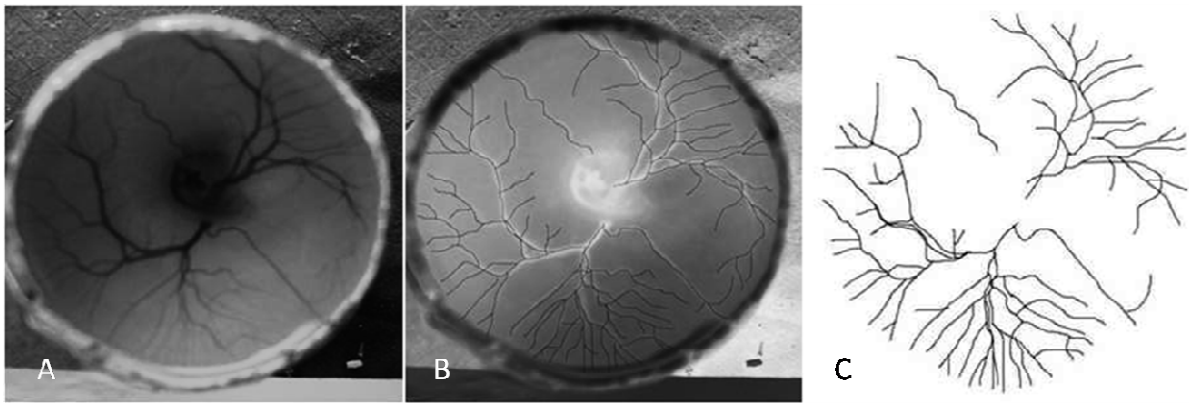


Figure 1. Process of segmentation and skeletonization of embryo Japanese quail vitelline membrane (MV) vascularization. *A* vascular network of MV. *B* negative image of *A*, with prominent vascularity in contrast with the background image and segmentation of the MV vessel. *C* binarization and skeletonization of the image, to obtain standard black and white.

Diffusion-limited aggregation

Fractal objects can be generated from recursive algorithms, through which it is possible to obtain curves, functions or forms that exhibit fractal proprieties. The DLA (diffusion-limited aggregation), a known fractal structure that is built from the following: from any point of a circle a particle is released that is adsorbed by a particle at the center of this circle. When the particle is adsorbed, a new particle is released randomly from a position of the circle. This process will be repeated many times and one DLA is being formed (Witten; Sanders, 1981).

Were generated 45 DLA from 2000 pixels using a program developed in C for a grid of 300 x 300 pixels (Figure 2). After that, their D were calculated by box-counting and information dimension methods, trying to verify if the average value D of this structure is similar to the values of MV vascularization fractal dimension. The DLA is a known a fractal structure and has D similar to the fractal dimension human retinal vasculature (Araújo et al., 2004; Masters, 2004).

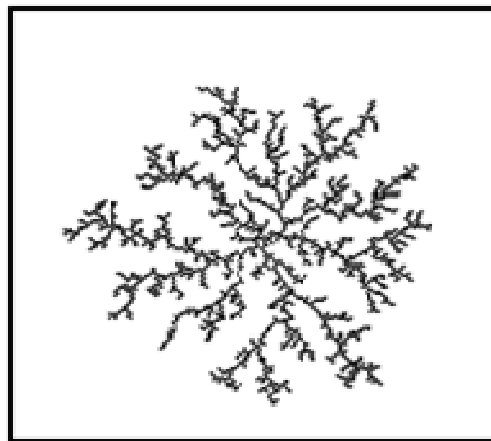


Figure 2. DLA with 2000 points, generated in C language program for a grid of 300 x 300 pixels.

Theoretical method

To obtain the average value of fractal dimension (D) of MV vascularization and DLA were used box-counting and information dimension methods (Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System).

The box-counting method is to cover the fractal object with $N(r)$ boxes containing at least one point (pixel) of the object. Repeat the procedure with boxes of different sizes and draw a log-log graph of $N(r)$ as a function of r (side boxes). The angle of inclination of this graph is the box-counting dimension (D_{bc}) (Feder, 1988; Mandelbrot, 1991), which can be formally defined by equation (1).

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

The information dimension attributes weights to the boxes and those that contain a larger number of points weigh more than boxes with fewer points. The information dimension is calculated from the slope of the graph of the Kolmogorov entropy line and the logarithms of the sides of the boxes used to cover the fractal object (Viksec, 1991). The information dimension is defined by the following equation (2):

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

where

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

is called Kolmogorov entropy. N is the number of boxes and $m_i = MI/M$. where MI is the number of points in the i^{th} box and M is the total number of points of the fractal object.

Statistical analysis

We applied the Kolmogorov-Smirnov test to verify the normal distribution of data ($\alpha = 95\%$). After that, the data was carried out an ANOVA and a post-hoc Tukey test ($\alpha = 95\%$).

Results and Discussion

Fractal analysis of VM vascularization

In our experiments, the Japanese quail embryos vitelline membrane was used to analyze the process of vascularization in fertilized eggs of quails fed diet supplemented with different lipid sources. Vascularization of this membrane suffers interference from the quality and quantity of PUFA supplementation offered to the birds (Table 2).

Table 2. Box-counting (D_{bc}) and information dimension (D_i) methods for determinate the fractal dimensions of vitelline membrane VM vascularization to each treatment and DLA.

Incubation Period	72h			96h			120h		
	n	D_{bc}	D_i	n	D_{bc}	D_i	n	D_{bc}	D_i
DCb	31	1.25±0.06ac	1.29±0.06ac	14	1.31±0.06ac	1.35±0.05ac	7	1.34±0.04ac	1.38±0.04ac
FO 2%	19	1.23±0.06ac	1.27±0.05ac	19	1.29±0.05ac	1.33±0.04ac	14	1.30±0.06ac	1.34±0.05ac
FO 4%	24	1.21±0.04bc	1.25±0.04bc	19	1.27±0.04bc	1.30±0.04bc	9	1.29±0.03bc	1.33±0.03bc
SO 2%	24	1.26±0.06a	1.30±0.06a	17	1.27±0.06a	1.31±0.06a	9	1.32±0.04a	1.35±0.04a
SO 4%	25	1.20±0.04b	1.24±0.04b	16	1.23±0.05b	1.28±0.04b	11	1.27±0.04b	1.30±0.04b
DLA	15	1.43±0.02d	1.44±0.01d	15	1.43±0.02d	1.44±0.01d	15	1.43±0.02d	1.44±0.01d

In 72 hours of incubation the VM vascularization of the embryos of birds of the SO 4% group was lower than the VM vascularization of the DC ($p < 0,01$) and SO 2% ($p < 0,001$) groups. The VM vascularization of the FO 4% group was lower only compared to SO 2% group ($p < 0,05$). The other groups showed no significant difference between them. In 96 hours of incubation the VM vascularization of the embryos of birds of the SO 4% group was lower than the VM vascularization of the FO 2% ($p < 0,05$) and DC ($p < 0,01$) groups.

These variations may indicate that different concentrations of omega-3 and omega-6 used in the diets interfered in the early stages of vascular network formation in extra-embryonic membrane. Therefore, it is suggested that inhibition of vascular growth is directly related to the amount of polyunsaturated fatty acids available to lipid metabolism, like was purposed by Dewailly et al. (2001, 2003) and Harris et al. (2009) the metabolism of fatty acids n-3 and n-6 can generate compound with anti-angiogenic effects. In 120 hours of incubation no significant difference between groups was observed. Vico et al. (1998) suggested that after 100 hours of incubation the complexity of the vascular network formed in the membrane provides a sufficient metabolic supply to the embryo.

Comparison between methods of calculating the fractal dimension of vascularization of the MCA

The box-counting dimension is widely used for calculating the fractal dimension of various structures. While this method disregards the number of pixels in each box, the information dimension method, which considers the "burden" (amount of pixels) of each box, was also performed. The differences between the values of fractal dimensions obtained both box-counting and information dimension methods (Fig. 4).

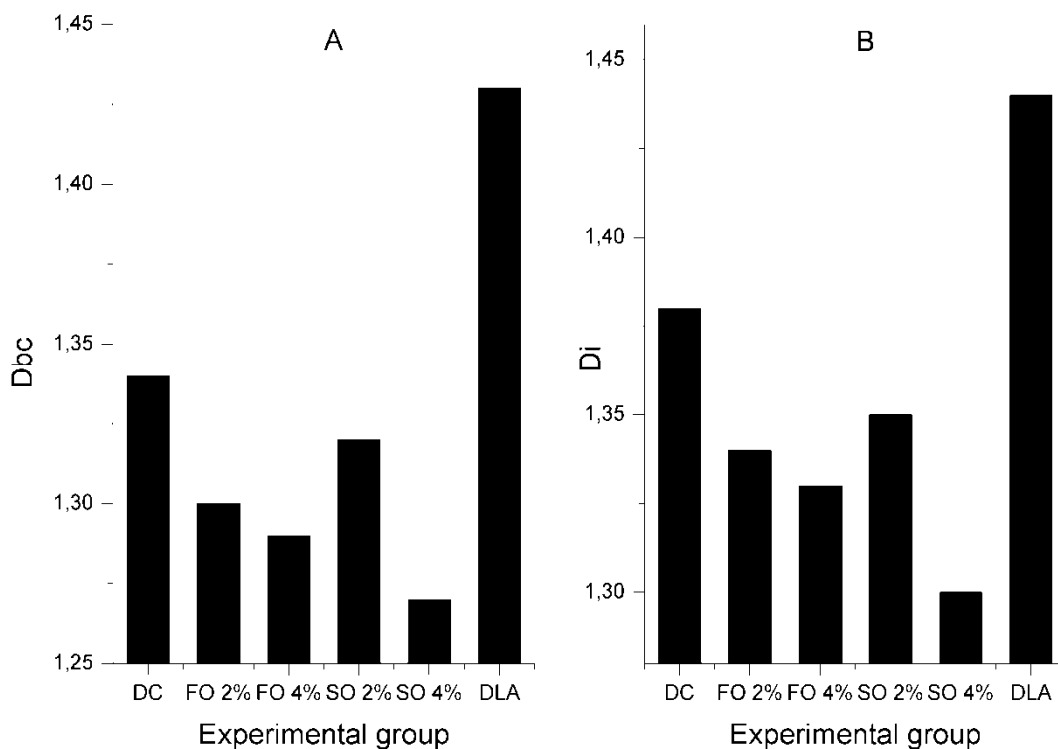


Figure 3. Fractal dimension obtained by both box-counting and information dimension methods for the DLA and the vitelline membrane vascularization to experimental groups. *A* Box-counting method (D_{bc}). *B* Information dimension method (D_i). Diet control (DC), Fish Oil 2% (FO 2%), Fish Oil 4% (FO 4%), Soybean Oil 2% (SO 2%) and Soybean Oil 4% (SO 4%) in 120 hours of incubation.

The differences between the values of fractal dimensions were statistically significant for all groups (Tab. 2). The fractal dimension of DLA obtained by both methods was higher than those observed for the fractal dimensions of the VM vascularization of experimental groups ($p < 0,001$). Comparing the method used to quantify a particular fractal process, it is observed that when the information dimension method is used the values of D are higher than the box-counting dimension.

As observed for retinal vasculature (Mendonça et al., 2007), the fractal dimension of VM vascularization and DLA depends on the method of calculation, which leads us to consider the importance of choosing the method in the quantification of a structure or fractal process.

Fractal geometry has proved useful to quantify vascular growth promoted by omega-3 and omega-6 PUFA, as previously observed for other promoters and inhibitors of vascular growth.

CONCLUSION

Based on results found in this study, we suggest that exists a relationship between omega-3 / omega-6 PUFA and regulatory mechanisms of the growth and vascular remodeling processes. The source of fatty acid in the diet interferes with the lipids metabolism that participate in the yolk composition.

However, in the initial process of vessel formation, these changes in lipid profile does not interfere in the vascular growth dynamics since the period of embryonic vascular growth occurs at an earlier stage adipogenesis. Like the chorioallantoic membrane, the vitelline membrane shows an adequate experimental model for the study of changes in vascular pattern, especially as regards the initial formation of the vascular tree (vasculogenesis).

The fractal analysis shows be a reliable mathematical method to quantify vascular growth in vivo models as vitelline membrane of birds, as previously observed by other authors using the chorioallantoic membrane. The calculation method adopted for the fractal analysis produces significantly changed on the fractal dimension values of the structures evaluated, so it is very important to choose the method taking into consideration the type of structure evaluated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thanks Netuno Alimentos S/A for donating the fish oil. We acknowledge PRPPG/UFRPE and FACEPE for the financial support and Postgraduate fellowship and the EEPAC / UFRPE the donation of the birds.

REFERENCES

- Araújo LS, Nogueira, RA, Stosic C, et al. (2004). Análise Fractal da vascularização da retina do cão, In: Anais do IV Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE, Recife, Imprensa Universitária (CD-ROM).
- Avakian A, Kalina RE, Sage EH et al. (2002). Fractal analysis of region-based vascular change in the normal and non-proliferative diabetic retina. *Cur Eye Res*, 24:274-280.
- Bassingthwaighte JB, Liebovitch LS, West BJ. (1994). *Fractal physiology*, New York: Oxford University Press, 364 p.
- Blondeau N, Pétrault O, Manta S, et al. (2007). Polyunsaturated Fatty Acids Are Cerebral Vasodilators via the TREK-1 Potassium Channel, *Circ Res*, 101:176–184.
- Chung WS, Lai KM, Hsu KC (2010). Comparative Study on Histological Structures of the Vitelline Membrane of Hen and Duck Egg Observed by Cryo-Scanning Electron Microscopy. *J Agric Food Chem*, 58:794–1799.

- Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, et al. (2003). Inducible nitric oxid synthase expression in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 162(3):793-801.
- Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, et al. (2004). Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxid in colorectal cancer, *Clin Cancer Res*, 10(8):2694-2704.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, 49:507-512.
- Dewailly E; Blanchet C; Lemieux S, et al. (2001). N-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik, *Am J Clin Nutr*, 74(4):464-473.
- Dewailly E, Blanchet C, Gingras S., et al. (2003). Fish Consumption and Blood Lipids in Three Ethnic Groups of Québec (Canada), *Lipids*, 38(4):359-365.
- Dias PF, Ribeiro-do-Valle RM, Maraschim RP, et al. (2002). Novos moduladores da formação de vasos sanguíneos, *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 25:28-34.
- Feder J. (1988). *Fractals*. New York: Plenum press. 283p.
- Gaudio E, Chaberek S, Montella A, et al. (2005). Fractal and fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver, *J Anat.*, 207(2):107-115.
- Grizzi F, Russo C, Colombo P, et al. (2005). Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension, *BMC Cancer*, 5(14):1-9.
- Harris W, Mozaffarian D, Rimm E, et al. (2009). Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular disease. A Science Advisory from the American Heart Association, Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention, *Circulation*, 119:902-907.
- Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, et al. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma, *Nat Rev Cancer*, 3:411- 442.

- Lorthois S, Cassot F. (2010). Fractal analysis of vascular networks: Insights from morphogenesis. *J Theoretical Biol*, 262:614–633.
- Masters BR. (2004). Fractal analysis of the vascular tree in the human retina, *Annu Rev Biomed Eng*, 6:427–452.
- Mandelbrot BB. 1983. *The fractal geometry of nature*. New York. W.H. Freeman and Company. 468p.
- Mandelbrot BB. (1991). *Objetos fractais*. Lisboa: Gradiva.
- Melo-Reis PR, Andrade LS, Silva CB., et al. (2010). Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex, *Braz J Biol*, 70(1):189-194.
- Mendonça MBM, Garcia CAA, Nogueira RA, et al. (2007). Análise fractal da vasculatura retínica: métodos de segmentação e de cálculo dimensional, *Arq Bras Oftalmol*, 70(3):413-422.
- Narayanam BA, Narayanam, NK, Simi B, et al. (2003). Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells, *Cancer Res*, 63(5):972-975.
- National Research Council (1994). *Nutrient Requirements of Poultry*. 9ed. Washington, D.C., National Academy of Sciences. 44-45 p.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, et al. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*, 56(6):1517-1526.
- O'Shea M, Bassaganya-Riera J, Mohede IC. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid, *Am J Clin Nutri*, 79(6):1199S-1206S.
- Parsons-Wingenter P, Lwai B, Yang MC, et al. (1998). A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection, *Microvasc Res*, 55(3):201–214.

- Parsons-Wingerter P, Elliott KE, Farr Andrew G, et al. (2000). Generation analysis reveals that TGF- β 1 inhibits the rate of angiogenesis in vivo by selective decrease in the number of new vessels, *Microvasc Res*, 59(2):221-232.
- Parsons-Wingerter P, Chandrasekharan UM, McKay TL, et al. (2006). A VEGF165-induced phenotypic switch from increased vessel density to increased vessel diameter and increased endothelial NOS activity, *Microvasc Res*, 72:91-100.
- Pedroso AA, Café, MB, Leandro NSM, et al. (2006). Desenvolvimento embrionário e eclodibilidade de ovos de codornas armazenados por diferentes períodos e incubados em umidades e temperaturas distintas, *R Bras Zootec*, 35(6):2344-2349.
- Pereira CA, Barreto SLT, Rostagno, HS. (2004). Desempenho de codornas japonesas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de cálcio durante o pico de postura. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2004, Campo Grande. Anais. Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia.
- Schwartz S, George J, Ben-Shoshan J, et al. (2008). Drug Modification of Angiogenesis in a Rat Cornea Model, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48:250–254.
- Sheng G. (2010). Primitive and definitive erythropoiesis in the yolk sac: a bird's eye view, *Int J Dev Biol*, 54:1033–1043.
- Vico PG, Kyriacos L, Heymans O., et al. (1998). Dynamic Study of the Extraembryonic Vascular Network of the Chick Embryo by Fractal Analysis. *J Theor Biol*, 195:525–532.
- Vicsek T. (1991). Fractal growth phenomem. Singapore: World Scientific.
- Witten TA, Sanders LM. (1981). Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon, *Phys Rev Lett*. 47(19):1400–1403.
- Zamaria N. (2004). Alteration of polyunsaturated fatty acid status and metabolism in health and disease, *Reprod Nutr Dev*, 44:273-282.