

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

EDBERGUE VENTURA LOLA COSTA

Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas ao campo eletromagnético de 60 Hz.

Recife-PE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

EDBERGUE VENTURA LOLA COSTA

Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas ao campo eletromagnético de 60 Hz .

Dissertação apresentado 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

Co-orientador: Dr. George Chaves Jimenez

Recife-PE

2010

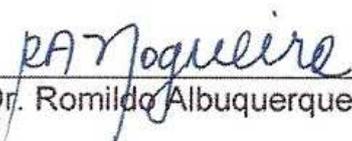
EDBERGUE VENTURA LOLA COSTA

Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a campo eletromagnético de 60 Hz .

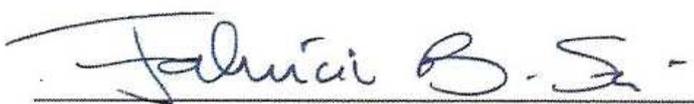
Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal

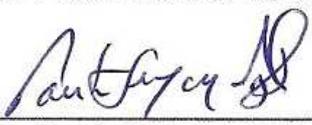
Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 30 de junho de 2010.

Banca examinadora:

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

  
Prof. Dr. Catão Temístocles de Freitas Barbosa- UFRPE

  
Prof. Dr. Prof. Fabricio Bezerra de Sá – UFRPE

  
Prof. Dr. Paulo Fernando Dias – UFSC

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pelos ensejos e lições adquiridas no meu caminhar. Por ter concedido qualidades que me fazem apto a suplantar os obstáculos e por ter também permitido a presença de pessoas ótimas em minha vida.

Agradeço aos meus pais Silvio e Helena, por tentarem me esculpir em uma pessoa íntegra além de dedicarem boa parte de suas vidas. Pelo o amor eterno, paciência e ensinamento imortal.

Aos meus irmãos Cibhergue e Timbhergue, pela companhia fraterna, estímulo e guarnição em momentos difíceis.

A todos meus familiares principalmente a minha tia Inácia e ao meu tio Carlos. Aos amigos que me apoiaram nesta jornada principalmente a Berco, Maria do Carmo, Carlos Eduardo, Jaidete e Adriano.

Ao professores Dr. Romildo A. Nogueira e Dr. George C. Jimenez, pela paciência, por serem cautelosos comigo além de me mostrarem caminhos maravilhosos no percorrer da minha pós-graduação.

Aos professores do curso de pós-graduação de Biociência Animal e a Edna Cherias pela atenção e ajuda.

Aos amigos do LABTEC pelo apoio, prof. Catão, profa. Marliete, Jeine, prof. Walter, Daniele, Renato, Daniella, Thaís, Leandro, Isvânia e Thiago.

## RESUMO

A formação da rede vascular é regida, principalmente, por dois processos, a vasculogênese e angiogênese. Na vasculogênese, os angioblastos que são os precursores das células endoteliais, surgem na camada germinativa (mesoderma) do saco vitelínico (fora do corpo do embrião). Estes angioblastos organizam-se para formar ilhotas sanguíneas, diferenciando-se nos vasos sanguíneos primordiais onde os tubos endoteliais exibem tamanhos relativamente uniformes. Posteriormente, as células endoteliais e as células musculares lisas irão crescer em resposta a fatores e sinais específicos, assim os vasos sanguíneos de diâmetros menores são gerados a partir dos vasos preexistentes, permitindo a estruturação de uma rede vascular complexa e mais estável, com vasos de diferentes diâmetros. Esse processo é denominado de angiogênese. A membrana corioalantóide (MCA) de codorna como de galinha é um bom modelo experimental animal para o estudo da formação dos vasos, por ser uma estrutura extra-embriônica bastante vascularizada. Estudos recentes têm mostrado que os campos eletromagnéticos (CEMs) de 50/60 Hertz, normalmente gerados pelas redes elétricas, são capazes de produzir diversos efeitos adversos em humanos e animais, isto inclui alterações no sistema de vasos e capilares sanguíneos. Neste trabalho foi analisado, com base na teoria dos fractais, o processo de formação da rede vascular sanguínea da membrana corioalantóide dos embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) exposta ao campo eletromagnético (CEM) de frequência extremamente baixa (60 Hz) em diferentes tempos sobre a rede vascular. Os resultados deste estudo mostram, com base nos cálculos dessas dimensões fractais, que dependendo do tempo de exposição ao CEM pode ocorrer um efeito inibitório ou não haver nenhuma alteração sobre o processo de vasculogênese e angiogênese da rede vascular extra-embriônica de embriões de codorna japonesa.

Palavras-chave: membrana corioalantóide, rede vascular, vasculogênese, angiogênese, fractal, campo eletromagnético.

## **ABSTRACT**

The formation of vascular network is governed mainly by two processes, vasculogenesis and angiogenesis. In vasculogenesis, the angioblastic which are the precursors of endothelial cells arising in germ layer (mesoderm) of the yolk sac (outside the embryo body). These angioblastic organize themselves to form blood islands, differing in blood vessels where the primordial endothelial tubes exhibit relatively uniform sizes. Subsequently, endothelial cells and smooth muscular cells will grow in response to factors and specific signals, so the blood vessels of smaller diameters are generated from the preexisting vessels, allowing the structuring of a complex vascular network and more stable, with vases of different diameters. This process is called angiogenesis. The chorioallantoic membrane (CAM) of quail and chicken is a good experimental animal model for studying the formation of blood vessels, as a structure extra-embryonic that is enough vascularized. Recent studies have shown that electromagnetic fields (EMFs) from 50/60 Hertz, typically generated by power lines, are able to produce adverse effects in humans and animals, that includes changes in the system of vessels and blood capillaries. This work was analyzed, based on fractal theory, the process of formation of the blood vascular network of chorioallantoic membrane of Japanese quail embryos (*Coturnix japonica*) exposed to electromagnetic field (EMF) of extremely low frequency (60 Hz) at different time on the blood vascular system. The results of this study show, based on calculations of these fractal dimensions, depending on what time of exposure to EMF may be an inhibitory effect or there is no change on the process of vasculogenesis and angiogenesis of extra-embryonic vascular network of Japanese quail embryos.

Keywords: chorioallantoic membrane, vascular network, vasculogenesis, angiogenesis, fractal, electromagnetic field.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ang – angiopoietina

CEM – campo eletromagnético

CEM RF - Campos eletromagnéticos de radio-freqüência

D<sub>bc</sub> – dimensão de contagem por caixas

D<sub>inf</sub> – dimensão de informação

EGF – fator de crescimento epidérmico

EGFR – receptor para o fator de crescimento epidérmico

Erk – quinase regulada por sinal extracelular

FGF – fatores de crescimento fibroblástico

G-CSF – fator estimulador de colônia de granulócito

HB-EGF – fator de crescimento epidérmico ligado a heparina

HGF – fator de crescimento de hepatócito

HIF – fator induzido por hipoxia

ICAM – molécula de adesão intercelular

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina

Inf – interferon

IL – interleucina

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MCA – membrana corioalantóide

MCP – proteína quimiotática de monócito

MEC – matriz extracelular

MEK – (quinase extracelular mitógeno ativada)

MIP – proteína inflamatória de macrófago

PDGF – fator de crescimento derivado de plaqueta

PDGFR – receptor para o fator de crescimento derivado de plaqueta

PEDF – fator derivado do epitélio pigmentado

PGE – prostaglandina

PHD – domínio de prolil-hidroxilase

PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase

PKA – proteína quinase A

PLCy1 – fosfolipase Cy1

PLGF – fator de crescimento placentário

PRL – prolactina

SDF – fator derivado de células do estroma

TGF – fator de crescimento de transformação

TNF – fator de necrose tumoral

TPA - 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato

VCAM – molécula de adesão de célula vascular

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR – receptor de fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Membrana corioalantóide do embrião de codorna.....	9
1.2 Formação dos vasos sanguíneos .....	11
1.2.1 Vasculogênese e angiogênese.....	11
1.2.2 Alguns estimuladores da formação dos vasos sanguíneos .....	15
1.2.3 Alguns inibidores da formação dos vasos sanguíneos .....	23
1.2.4 Moléculas responsáveis pela adesão .....	24
1.2.5 Apoptose das células vasculares.....	26
1.3 Geometria fractal .....	27
1.3.1 Conceito.....	27
1.3.2 Exemplos de fractais e fractais na natureza .....	29
1.3.3 Aplicações da geometria fractal na rede vascular .....	32
1.4 Campo eletromagnético.....	34
1.4.1 Influência do campo eletromagnético na biologia: efeitos prejudiciais e benéficos. ....	34
1.4.2 Ação de campo eletromagnético em vasos sanguíneos.....	38
2. OBJETIVOS .....	40
2.1 Objetivo geral .....	40
2.2 Objetivos específicos .....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
3.1 Incubadora.....	41
3.2 Incubação, preparação das amostras.....	41
3.3 Exposições ao campo eletromagnético (CEM) .....	42
3.4 Tratamento de imagem.....	43
3.5 Análise fractal .....	44
3.6 Análise estatística .....	45
4.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	46
CAPÍTULO II .....	62
Resumo.....	63
Introdução .....	64
Materiais e métodos.....	66
Resultados .....	69
Discussão .....	70
Conclusão .....	74
Referência Bibliografia .....	74
ANEXOS .....	79

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Membrana corioalantóide do embrião de codorna

O ovo é uma estrutura complexa química e fisicamente, que reúne em seu interior substâncias essenciais ao completo desenvolvimento do embrião (REIZIS *et al.*, 2005). Esta estrutura de alto valor biológico tem origem no aparelho reprodutor feminino das aves, ovário e oviduto esquerdos. No ovário surgem os folículos, que posteriormente originarão os ovócitos. Estes são captados pelo infundíbulo e depois passarão para o magno onde haverá a formação da clara, logo após estarão no istmo (local onde há formação da casca). Por fim seguirá para o útero, onde se dará a formação do restante do albume (clara) e finalização da casca. Na cloaca, haverá o revestimento de muco sobre a casca, cuja função é antimicrobiana. Os componentes estruturais do ovo são: casca (cutícula, casca, membrana externa da casca, câmara de ar, membrana interna da casca), clara, que também é conhecido por albume (ligamentos de albume, calazas, camada calazífera, clara fina interna, clara de média espessura, clara fina externa) e o óvulo o qual compreende a gema (blastodisco “não fertilizado” ou blastoderma “fertilizado”, núcleo de Pandar, látebra, membrana vitelina, vitelo) (GILBERT, 1988).

Após fecundado, no momento da postura, o ovo passará pelo processo de clivagem e formação dos territórios presumíveis do blastoderme (ectoderme de revestimento, ectoderme neural, notocorda, mesoderme, endoderme, mesoderme extra-embriônico). Desta forma, no proceder da formação do embrião, será necessária a incubação para que ocorra a gastrulação, com formação da linha primitiva, neurulação e modelação do embrião; assim como o surgimento dos anexos embriônicos, do qual faz parte a membrana corioalantóide (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001).

A membrana corioalantóide (MCA) de embriões de codorna, como de galinha, é uma estrutura extra-embriônica que se forma com a fusão do epitélio ectodermal (cório) e o epitélio endodermal (alantóide). Na verdade, há uma junção do mesoderma esplâncnico da alantóide com o mesoderma somático do cório, tendo a camada epitelial externa do cório, que é derivada do trofoblasto, se opondo à alantóide (DIMITROPOULOU *et al.*, 1998; BORGES *et al.*, 2003; LENG *et al.*, 2004). A MCA é responsável pelas trocas gasosas entre os poros da casca e a sua rede de capilares subjacentes; tem importante papel na mobilização do cálcio que se encontra na casca, função regulatória no transporte de água e eletrólitos da cavidade alantóica e na homeostase ácido-básica do embrião (GABRIELLI; ACCILI, 2010).

A membrana corioalantóica (Figura 1) é constituída das três camadas germinativas. As células epiteliais coriônicas externas, que estão arranjadas de uma a três camadas, estão conectadas por um maior número de desmossomos, apresentando assim interdigitações freqüentes. O mesênquima intermediário consiste de uma substância intercelular fibrosa amorfa com células mesenquimais dispersas nele, esta camada contém vasos sanguíneos, no caso veias e artérias alantóicas. Por baixo do mesênquima, o alinhamento da parede alantóica é representada por 2 a 4 camadas de células epiteliais que estão conectadas por junções ocludentes e desmossomos (ADAM, *et al.*, 2002). A alantóide do embrião de codorna deve surgir em torno de 3,5 dias de incubação, tempo estimado para a espécie *Gallus domesticus*. Esta estrutura se origina como uma evaginação da parede ventral do intestino posterior endodermal. Em galinha, a vesícula alantóica amplia muito rapidamente do quarto ao décimo dia de incubação. Neste processo a camada mesodermal da alantóide funde com a camada mesodermal da cório para formar a MCA. A dupla camada do mesoderma é formada à medida que uma rica rede vascular se desenvolve e se conecta com a circulação embrionária por veias e artérias alantóicas. A artéria umbilical após emergir da parede abdominal embrionária, ramifica em duas artérias alantóicas primárias e a MCA é drenada por uma veia corioalantóica (CIMPEAN *et al.*, 2008).

Córnea e retina de coelho, camundongo, hamster, rato, peixe zebra e a membrana corioalantóide de galinha e codorna têm sido empregados em ensaios para análise dos mecanismos da angiogênese normal e patológica. A MCA passa a

ser um ótimo modelo experimental na pesquisa de vascularização de tumores implantados, bem como sobre atuação de substâncias promotoras e inibidoras da angiogênese (DERYUGINA; QUIGLEY, 2008). A MCA é um modelo experimental animal com maior vantagem quando comparado aos modelos mamíferos, pois ela é mais acessível à observação e experimentação, além de não possuir influências hormonais e metabólicas externas (maternal) (LARGER *et al.* 2004).

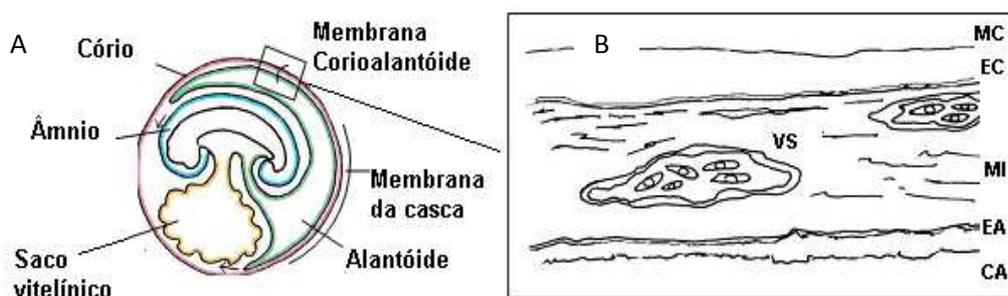


Figura 1: A. Mostra como algumas estruturas estão organizadas no ovo, o quadrado pequeno representa o esquema B. B. Três camadas da membrana corioalantóide são indicadas de forma esquemática junto com a membrana da casca e cavidade alantóica: membrana da casca (MC), epitélio coriônico (EC), camada mesodermal intermediária (MI) que contém os vasos sanguíneos, epitélio alantóico (EA), cavidade alantóica (CA) e vasos sanguíneos (VS). Ilustração de Gabrielli and Accili (2010).

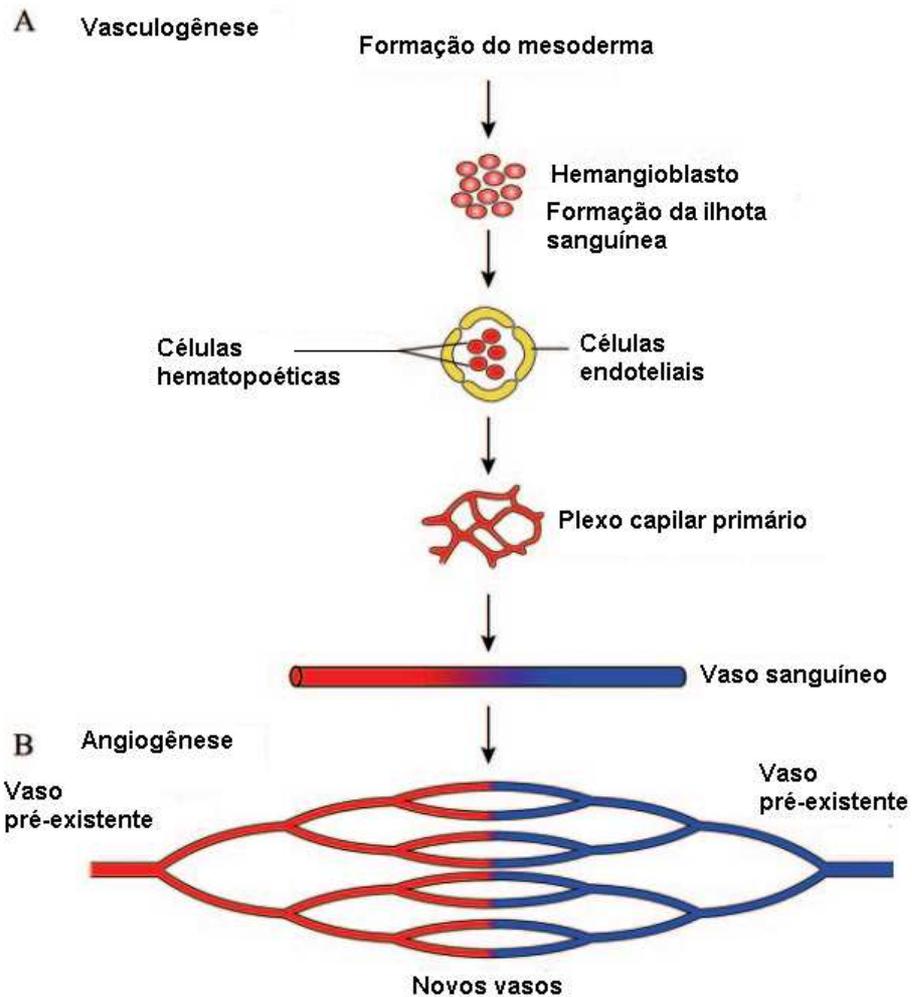
## 1.2 Formação dos vasos sanguíneos

### 1.2.1 Vasculogênese e angiogênese.

No saco vitelínico das aves, estrutura extra-embrionária envolvida na função nutricional do embrião e transferência de imunoglobulinas (TESAR *et al.*, 2008), há a formação dos primeiros vasos sanguíneos (vasculogênese) assim como das células sanguíneas (hematopoese) que se dá a partir do surgimento de ilhotas sanguíneas na fase embrionária (SENEGAGLIA *et al.*, 2009). Nos capilares, o fluxo sanguíneo será regulado em função da necessidade de nutrientes nos tecidos, além de estar envolvido no processo de transmigração de leucócitos durante a infecção e no

processo da coagulação sanguínea. Embora relativamente pouco se saiba sobre a biologia celular endotelial, progressos não obstante estão sendo realizados no sentido de se compreender a formação vascular (BISCHOFF, 1995).

Durante a formação da rede vascular, ilhotas sanguíneas são formadas a partir do agrupamento de células mesodérmicas. As células encontradas no interior do conjunto de células mesodérmicas tornam-se células hematopoiéticas enquanto a população de células periféricas diferencia-se em células endoteliais que irão formar as primeiras estruturas vasculares. Esses dois processos concomitantes marcam o início da hematopoese e vasculogênese (Figura 2). A associação das células endoteliais prematuras com as células do sangue nas ilhotas sanguíneas tem levantado a hipótese de que os dois tipos de células são provenientes de precursores celulares denominados de hemangioblastos (FLAMME *et al.*, 1995; FLAMME *et al.*, 1997). No entanto, as células hematopoiéticas do saco vitelínico contribuem para uma população transiente de células do sangue. Aos mecanismos de determinação e diferenciação de células hemangioblastos, assim como ao conjunto destas células organizadas no plexo capilar primitivo, designa-se de vasculogênese (FLAMME *et al.*, 1997). Depois da formação do plexo capilar primitivo, uma subsequente remodelagem desta rede vascular dará ascensão a uma microvasculatura, havendo o brotamento e a proliferação dos capilares dos vasos pré-existentes, processo denominado de angiogênese (Figura 2), acompanhando assim o crescimento e a forma do embrião. Então, a vasculogênese pode ser compreendida como o processo de formação de vasos sanguíneos na fase embrionária, quando células do mesênquima, chamadas de angioblastos, provenientes da parede do saco vitelino, que se diferenciam em ilhotas sanguíneas se fusionam formando plexos capilares primitivos. Com o desenvolvimento do sistema vascular, ocorre a angiogênese, que se caracteriza pela ramificação e remodelagem da rede capilar primária, onde os vasos de maior calibre dão origem a um sistema mais ramificado, com vasos de menor calibre, formando uma estrutura cada vez mais complexa (BUSCHMANN; SCHAPPER, 1999). Vasculogênese e angiogênese estão relacionadas, competindo a estes dois processos promover o surgimento e estabilização da rede vascular durante a fase embrionária.



**Figura 2- Ilustração sumarizada da vasculogênese e angiogênese, retirada de Lamalice *et al.*, 2007.**

Na galinha, por volta do quarto dia, todos os vasos da MCA têm capilares não diferenciados, suas paredes consistem de uma monocamada de células endoteliais sem uma lâmina basal. Durante o oitavo dia, a MCA mostra pequenos capilares de parede fina com um diâmetro do lúmen de 10 – 15  $\mu\text{m}$  abaixo do epitélio coriônico e outros vasos com diâmetro 10-115  $\mu\text{m}$  em camada mesodermal, cujas paredes têm uma camada de células mesenquimais ao redor do endotélio e são completamente envolvidas por uma lâmina basal junto com as células endoteliais. Nos dias 10-12, os capilares se assemelham aqueles que se encontram no oitavo dia e estão próximos à superfície do epitélio coriônico. Os vasos mesodermais são agora vênulas e arteríolas distintas. Além disso, para o endotélio, as paredes das arteríolas

contêm uma ou duas camadas de células mesenquimais e aumenta a quantidade de tecido conectivo ao redor dele. Vênulas estão envolvidas por um investimento incompleto de células mesenquimais e o tecido conectivo é acumulado dentro de sua parede. Presume-se que as células mesenquimais estejam diferenciando em células musculares lisas e as paredes das arteríolas da MCA também desenvolve uma adventícia distinta contendo células como fibroblasto. As arteríolas e vênulas são acompanhadas por um par de vasos linfáticos interconectados (CIMPEAN *et al.*, 2008).

A construção dos vasos é resultado da interação das células endoteliais com as células mesodérmicas, no caso, as células musculares lisas e os pericitos (células murais). Esta interação é favorecida e articulada pela atuação dos fatores de crescimento, como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), dos seus respectivos receptores além de outras moléculas (AMBLER *et al.*, 2003; FUJIMOTO *et al.*, 2004).

A formação dos novos vasos envolve várias etapas: degradação proteolítica da matriz extracelular (MEC), migração quimiotática, adesão, proliferação e diferenciação das células endoteliais; finalmente, a formação e maturação de uma nova estrutura tubular para o fluxo sanguíneo (RISAU, 1997; DING *et al.*, 2006). Os principais mecanismos de indução da neovascularização podem ser simplificados em três grandes categorias: fatores mecânicos, químicos e moleculares. Com respeito aos fatores mecânicos, podem-se citar os processos hemodinâmicos no organismo, como por exemplo, o aumento do fluxo sanguíneo decorrente do exercício pode estimular o processo de surgimento de novos vasos, assim como a tensão de cisalhamento (pressão sanguínea mecânica a que os vasos devem resistir). Quanto à influência química, podem ser citados os mecanismos de hipoxia e gradiente de tensão de oxigênio. A hipoxia excita os macrófagos a liberarem fatores incluindo o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e FGF-1 e FGF-2 (fator de crescimento fibroblástico 1 e 2); a hipoxia também está envolvida na auto regulação do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). No que diz respeito à influência molecular, a liberação de citocinas pelas células inflamatórias (macrófagos, monócitos e plaquetas), é capaz de estimular as expressões do FGF e do VEGF (TABIBIAZAR; ROCKSON, 2001). Um dos mecanismos de estimulação do VEGF seria em situação de hipoxia, em resposta o HIF-1 (fator induzido por hipoxia

– 1) aciona centenas de genes das células submetidas à baixa concentração de oxigênio, sendo um desses genes o que expressa proteína VEGF (QUTUB; POPEL, 2009). O HIF-1 $\alpha$ , não somente regula a transcrição do gene para VEGF-A, mas também para eritropoietina. As células endoteliais estão sujeitas a hipoxia em processos como desenvolvimento embrionário, isquemia cardíaca e crescimento tumoral. O aumento da atividade metabólica na rápida expansão tissular ou por redução do fluxo sanguíneo no tecido isquêmico, leva ao acúmulo dos produtos do gene induzido por hipoxia (notavelmente, o VEGF-A) e conseqüentemente haverá o aumento da proliferação de células endoteliais. Uma vez havendo a angiogênese haverá elevação do aporte sanguíneo e assim o aumento da tensão de oxigênio local que leva a ativação de PHDs (domínios de prolil-hidroxilase) levando à supressão da atividade das células endoteliais (TAKEDA; FONG, 2007).

A angiogênese é um processo não apenas inerente ao estágio embrionário, sendo também de significativo valor em outras condições fisiológicas e mesmo nas patologias. Com relação às condições fisiológicas, o processo de neovascularização ocorre durante o desenvolvimento do indivíduo, nos órgãos reprodutivos femininos (periodicamente), crescimento do cabelo, cicatrização e inflamação. Concernente às patologias, a angiogênese ocorre nas condições inflamatórias sistêmicas (endometriose, psoríase e artrite reumatóide), doenças oculares (retinopatia diabética proliferativa, retinopatia de prematuridade, degeneração macular relacionado à idade), aterosclerose, isquemia miocárdica, crescimento tumoral e metástase. A angiogênese patológica é resultado da quebra do balanço homeostático, que se baseia no equilíbrio entre os mediadores endógenos excitatórios e inibitórios da angiogênese (DIAS *et al.*, 2002; SCHWARTZ *et al.*, 2008; MELO-REIS *et al.*, 2010).

### **1.2.2 Alguns estimuladores da formação dos vasos sanguíneos**

Vários peptídeos têm sido reconhecidos como participantes da angiogênese, estimulando, inibindo ou modulando a formação de novos vasos sanguíneos. Tem-se atribuído também importância na vasculogênese para alguns destes peptídeos. Fator de crescimento fibroblástico ácido e básico (aFGF e bFGF);

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento placentário (PLGF); fator de crescimento de transformação  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ); fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); fator de crescimento epidérmico (EGF); fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1); fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ); fator de crescimento de hepatócito (HGF); fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF); interleucinas; efrinas (efrina - B2); angiopoietinas (Ang-1 e Ang-2), angiogenina e alguns lipídios como as prostaglandinas (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987; YANCOPOULOS *et al.*, 1998; TABIBIAZAR; ROCKSON, 2001).

O FGF (fator de crescimento de fibroblasto) estimula tanto a proliferação de células endoteliais *in vitro* como previne a apoptose delas; promove a migração dessas células e o aumento das proteínas que participam na dissolução da matriz extracelular. O FGF também regula a adesão das células endoteliais modulando a expressão de receptores de integrinas além de poder aumentar a expressão do VEGF e outros peptídeos angiogênicos. Mesmo ausentes de peptídeos sinalizadores, o FGF-1 e FGF-2 são ativos no ambiente pericelular e se ligam com alta afinidade aos receptores tirosina – quinase específicos (SAHNI *et al.*, 1999). Durante o desenvolvimento dos vasos da MCA de embrião de galinha, o FGF-2 está envolvido na maturação dos vasos sanguíneos, ainda existe a hipótese de que ele pode interferir além da proliferação e migração, também na redistribuição e comportamento invasivo das células endoteliais (CONCONI *et al.*, 2004). Ensaio realizados por Sahni e colaboradores (2006) com vasos de placenta, MCA de embrião de galinha e Matrigel mostraram que o FGF-2 em presença de fibrina/fibrinogênio promovia maior crescimento de novos vasos, indicando que a habilidade do FGF-2 de ligar à fibrina é essencial para formação das estruturas vasculares na matriz de fibrina. De acordo com Walmsley *et al.*(2008), a sinalização do FGF controla o tempo de expressão dos *Scl*, *Lmo2* e *Runx1* nos hemangioblastos de embriões de *Xenopus*. Estes fatores de transcrição são essenciais para o desenvolvimento de células tronco hematopoiéticas (LANDRY *et al.*, 2008).

O VEGF foi isolado pela primeira vez em 1983 como um importante indutor da permeabilidade vascular; em 1989 foi identificado como agente mitótico em células endoteliais vasculares. Este fator pró-angiogênico é liberado por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e células do epitélio pigmentado da retina (DAMICO,

2007). A família VEGF assim como os seus receptores é importante para estimulação do surgimento dos primeiros vasos como a formação de novos vasos sanguíneos. Ausência do receptor VEGFR-2, designado também de Flk-1 em camundongos e KDR em humanos, resulta em problemas nas linhagens angioblásticas e hematopoiéticas. A indução de VEGFR-2 pode iniciar a diferenciação angioblástica enquanto que os níveis de VEGF parecem ser importantes para manter esta diferenciação, além da sua quantidade e atividade serem necessárias para sobrevivência dos angioblastos (RISAU, 1997). O VEGFR-3 (Flt-4) tem sido encontrado em células endoteliais linfáticas nos estágios avançados do desenvolvimento de camundongo e em linfangioma humano (WILTING *et al.*, 1997).

Em especial, o VEGF-A está envolvido na regulação do processo de ativação, proliferação, migração das células endoteliais e formação tubular. O receptor Tirosina-quinase VEGFR-2 (Flk-1/KDR) é o maior receptor responsável pelos efeitos bioquímicos do VEGF-A sobre as células e é indispensável no desenvolvimento vascular normal. A ativação do VEGFR-2 leva o recrutamento e ativação de múltiplas moléculas de sinalização, entre esses estão duas MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno): p42/44, Erk1/2 (quinase regulada por sinal extracelular) envolvidas na regulação de proliferação endotelial e o p38, um dos moduladores críticos da remodelagem do citoesqueleto de actina requeridos para migração celular (CHRZANOWSKA-WODNICKA *et al.*, 2008). De fato, a ativação do VEGFR-2 efetua um papel importante na mediação do crescimento da angiogênese, provocando uma resposta pleiotrópica como crescimento, sobrevivência, diferenciação, migração de células endoteliais e tubulogênese. A autofosforilação da tirosina Y1173 do receptor VEGFR-2 é uma região para ativação da transmissão dos sinais angiogênicos do VEGFR-2, envolvido no recrutamento de proteínas de sinalização múltiplas incluindo a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol 3 – quinase (PI3-K), fosfolipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1), proteína adaptadora Shc relacionada e Sck, além da transmissão de uma variedade de sinais biológicos que controlam as funções das células endoteliais e da angiogênese. Outro domínio tirosina quinase Y1057 do VEGFR-2, está envolvido na proliferação de células mediadas por VEGFR-2 (MEYER, *et al.*, 2008). Ratos que expressam isoformas individuais de VEGF-A apresentaram perturbações na morfogênese vascular devido às isoformas possuírem afinidades distintas pela

matriz extracelular. Os embriões de ratos que expressam VEGF 120 têm os vasos de diâmetros mais largos que ramificam menos freqüentemente que o normal, enquanto que os embriões que expressam a isoforma VEGF 188 têm os vasos de diâmetros menores que ramificam mais que o normal (JAMES *et al.*, 2009)

A família VEGF é composta por: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E além do PLGF. Na placenta, o fator de crescimento placentário estimula o crescimento de células musculares vasculares, recrutamento de macrófagos nas lesões ateroscleróticas, regula a produção de TNF- $\alpha$  e da proteína quimiotática de monócito-1, estimula a angiogênese patológica e atua sobre o receptor Flt-1 promovendo uma amplificação da resposta do VEGF durante algumas desordens patológicas (CARMELIET *et al.*, 2001; HEESCHEN *et al.*, 2004). O PLGF também é sintetizado por algumas células tumorais, como exemplo, coriocarcinomas humano (CAO *et al.*, 1996). Além disso, o PLGF-2 é importante na promoção da angiogênese e crescimento tumoral, uma vez que induz a expressão de genes antiapoptóticos nas células endoteliais de tumores (ADINI *et al.*, 2002).

TGF- $\alpha$  é um polipeptídeo de 50 aminoácidos que pertence à família do fator de crescimento epidérmico (EGF). É um fator de crescimento parácrino e autócrino que apresenta uma massa molecular heterogênea pesando de 5 a 20 kDa. Ele expressa seus efeitos quando ligado ao receptor tirosina-quinase do fator de crescimento epidérmico (EGFR, também conhecido como c-erbB1). Um desses efeitos é focado sobre a proliferação e migração de células de origem epidermal (CHENG *et al.*, 2008). Assim como o EGF, o TGF- $\alpha$  estimula a proliferação de células endoteliais de microvasos, porém com mais magnitude *in vivo* (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987).

Já o TGF- $\beta$  (família composta por 5 isoformas) é uma proteína que regula o crescimento, diferenciação, adesão e apoptose de alguns sistemas biológicos. O TGF- $\beta$  inicia seus sinais através dos receptores do tipo I e II (T $\beta$ RI, T $\beta$ RII) que são receptores de atividade quinase serina-treonina. TGF- $\beta$  se liga ao T $\beta$ RII, então T $\beta$ RI é recrutado ao complexo heteromérico, seguido pela fosforilação de proteínas Smad 2 ou Smad 3 que se ligam a Smad 4 e juntos se movem para o núcleo celular onde regulam a transcrição de genes alvos pela interação com outros fatores transcripcionais (YAMANE *et al.*, 2003; STRZALKA-MROZIC *et al.*, 2010). Desta forma, o TGF- $\beta$  regula a angiogênese atuando em genes alvos de outros fatores

angiogênicos, como o VEGF, pelas proteínas Smads via TGF- $\beta$ . Também este fator angiogênico promove a maturação e deposição da membrana basal além do aumento da interação entre as células endoteliais e as células murais (Ma *et al.*, 2007). Estudo realizado com carcinoma hepatocelular, revelou que as células endoteliais deste tumor apresentam uma glicoproteína de membrana chamada de endogлина ou CD105 (co-receptor do TGF- $\beta$  e modulador de sua sinalização), sendo o CD105 e o TGF- $\beta$  importantes na regulação da angiogênese deste carcinoma (BENETTI *et al.*, 2008).

PDGF normalmente está relacionado à manutenção dos vasos sanguíneos (SUN *et al.*, 2005). O fator de crescimento derivado de plaquetas C, quando ligado ao seu receptor (PDGFR) se torna importante para o desenvolvimento de tecidos conectivos e para cicatrização. Este fator está envolvido no estímulo da angiogênese de embriões de galinha e córnea de camundongos, também na revascularização de tecidos isquêmicos (CRAWFORD *et al.*, 2009).

EGF possui vários efeitos biológicos, incluindo efeito mitogênico, estimulando a proliferação de vários tipos de células, dentre elas estão células endoteliais de microvasos humanas e células endoteliais linfáticas (MÖLLER *et al.*, 2001). Seu receptor EGFR é expresso em muitos tipos de células com exceção de células hematopoiéticas. A homodimerização de moléculas de EGFR como a heterodimerização com outra família EGFR incluindo o HER-2/neu induz a ativação ligante-específica de um número de cascatas de transdução de sinal intracelular tais como a fosfolipase C $\gamma$ , fosfatidilinositol-3-quinase, proteínas G, Ras, proteína ativadora de Ras GTPase, proteína 2 ligante receptor de fator de crescimento, a família quinases Src, STAT e Akt. A ativação de EGFR exerce um papel chave na adesão, locomoção, sobrevivência, invasão celular e angiogênese (HIRATA, *et al.* 2002). A família do EGF inclui o HB-EGF (fator de crescimento epidérmico ligado a heparina) que se liga ao EGFR-1 e EGFR-4, ele é um potente mitógeno e fator quimiotático para fibroblastos e células musculares lisas (ONGUSAHA *et al.*, 2004).

IGF-I é um fator angiogênico que está envolvido na modulação da formação de vasos no trato nervoso no indivíduo adulto e está correlacionado com a neovascularização da retina devido à diabete (HELLSTRÖM *et al.*, 2002; LOPEZ-LOPEZ *et al.*, 2004). Pesquisa realizada com uso de plasmídeo verificou que o IGF-I mediado por plasmídeo estimula a expressão de receptores Flk-1 e Flt-1. Também

pode promover a angiogênese nos membros de diabéticos, tanto atuando como fator de sobrevivência para os vasos pelas vias antiapoptótica e antioxidante, como pela ativação da via Akt. O IGF-I protege as células endoteliais da apoptose induzida pelo alto nível de glicose (RABINOVSKY; DRAGHIA-AKLI, 2004).

A TNF- $\alpha$  ativa as respostas inflamatórias e assim tanto pode influenciar a angiogênese como afetar a proliferação de células endoteliais e assim induzir a apoptose dessas células. O efeito inibitório da TNF- $\alpha$  depende em parte de uma baixa regulação dos genes regulatórios do ciclo celular, incluindo o da ciclina A (KISHORE *et al.*, 2005). O TNF- $\alpha$  é uma das citocinas envolvidas na angiogênese associada ao macrófago, entretanto essa superexpressão nas células endoteliais acaba por ser inibitório e citotóxico para essas células; ao contrário do TNF- $\alpha$  exógeno que promove a neovascularização em vários modelos *in vivo* (LEE *et al.*, 2006).

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

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

Várias interleucinas medeiam ou possuem ação angiogênica direta. Uma delas é Interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), que é uma citocina pro-inflamatória capaz de gerar angiogênese em ensaios *in vivo*, entretanto não possui capacidade de gerar a angiogênese em ensaios *in vitro*, sendo a causa mais provável que IL-1 $\alpha$  precise das

atividades mediadoras de células acessórias que estão ausentes nos ensaios *in vitro* (SALVEN *et al.*, 2002). Já a interleucina 6, que está envolvida em vários processos fisiológicos (imunidade, hematopoese e inflamação), é capaz de promover a angiogênese de células progenitoras endoteliais (migração e proliferação dessas células) no ensaio *in vitro* (FAN *et al.*, 2008). A interleucina-8 (IL-8, CXCL-8) exerce efeitos angiogênicos sobre células endoteliais interagindo com seus receptores CXCR1 e CXCR2, tanto *in vitro* como *in vivo*, além de ter efeitos quimiotáticos em células endoteliais de microvasos da derme mais pronunciado do que as células endoteliais de macrovasos (HEIDERMANN *et al.*, 2003). A interleucina 10 atua sinergicamente com a hipoxia induzindo atividade pro-angiogênica dos macrófagos (DACE *et al.*, 2008). A interleucina 18 é uma citocina pró-inflamatória que induz a secreção de fatores angiogênicos em fibroblastos do tecido sinovial na artrite reumatóide, sendo estes fatores o SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (fator derivado de células do estroma 1 $\alpha$ ), MCP-1/ CCL2 (proteína quimiotática de monócito 1) e VEGF (AMIN *et al.*, 2007).

Tanto as efrinas como seus receptores Eph estão envolvidos na morfogênese embrionária, no desenvolvimento do sistema nervoso e vascular. Algumas destas moléculas participam também na vascularização tumoral (efrina-A1, EphA, efrina-B2 e EphB). A família das efrinas correspondem a 9 integrantes, enquanto que os receptores tirosina quinase transmembranas das efrinas compreendem a 16 receptores que estão divididos em dois grupos: EphA e EphB. As efrinas-A se ligam ao grupo de receptores EphA, estas efrinas estão ligadas à própria membrana celular por um acoplamento glicosil-fosfatidilinositol. Enquanto que as efrinas-B se ligam ao grupo EphB, estas efrinas normalmente estão ancoradas à membrana por seu domínio transmembrana. Os receptores possuem um domínio extracelular com um grupo N terminal e uma porção citoplasmática com domínio tirosina quinase. A interação entre as efrinas e seus receptores requer contato célula-célula, pois ambos ligantes e receptores estão ligados à membrana citoplasmática. A ligação ao receptor EphB4 amplia a habilidade da efrina-B2 de elaborar a transdução dos sinais através de seu domínio citoplasmático, esta sinalização da efrina-B2 em células endoteliais é importante para o desenvolvimento vascular do embrião porém sua expressão está restrita às células endoteliais apenas de estruturas vasculares arteriais (células musculares lisas vasculares), enquanto seu receptor EphB4 é

expresso em células endoteliais venosas. Ausência do gene para efrina-B2 causa falha na interconexão dos vasos do plexo arterial do saco vitelínico extra-embriônico com os vasos do plexo venoso; falha semelhante ocorre para a ausência do gene para EphB4 e também a deleção para EphB2 e EphB3 simultaneamente (HUYNH-DO *et al.*, 2002; NOREN *et al.*, 2004; BRANTLEY-SIEDERS *et al.*, 2006; DAVIES *et al.*, 2009).

NA angiogênese, a Ang-1(angiopoietina-1) está envolvida na estabilização e maturação da rede vascular, efetuando o recrutamento de células periendothelias (pericitos e células musculares lisas); o contato da Ang-1 com o Tie-2 está envolvido na interação das células endoteliais e células periendothelias de apoio. (PENG *et al.*, 2003; MACHEIN *et al.*, 2004; TAIT; JONES, 2004). O receptor Tie-2 é importante no processo angiogênico e na remodelagem vascular enquanto o outro receptor para angiopoietinas Tie-1 é direcionado à manutenção da integridade vascular (NAKAYAMA *et al.*, 2005).

Angiogenina é uma ribonuclease angiogênica de 14 kDa inicialmente isolado de cultivo de células de adenocarcinoma de cólon humano. Sua expressão está correlacionada em vários tipos de câncer, incluindo colorretal, pancreático, fígado, rim, ovariano, linfoma, melanoma, osteosarcoma. Angiogenina contribui para angiogênese de carcinoma gástrico e câncer de próstata além de promover o crescimento desses dois tipos de células tumorais (CHEN *et al.*, 2006; YOSHIOKA *et al.*, 2006). Angiogenina ativa as células musculares lisas e endoteliais dos vasos quando ligada às proteínas de membrana e que resulta na sua translocação nuclear acarretando uma ampla variedade de respostas celulares incluindo migração, invasão, proliferação das células e formação de estruturas tubulares (ZHANG *et al.*, 2008).

Alguns lipídios também possuem efeito angiogênico, como as prostaglandinas PGE-1 e PGE-2. Estudos com prostaglandinas têm revelado um papel importante destes na angiogênese patológica como na terapia angiogênica; em cicloxigenase-2 pode estimular fatores pro-angiogênicos tais como o VEGF, que provocará a angiogênese associada ao tumor (WANG; DUBOIS, 2004). De acordo com o trabalho de Moreschi Jr. *et al.* (2007), a PGE-1 tem capacidade de promover o aumento de capilares em músculo esquelético de ratos submetido à isquemia.

### 1.2.3 Alguns inibidores da formação dos vasos sanguíneos

As angiopoietinas Ang-1 e Ang-2 são moléculas reguladoras da remodelagem e estabilização vascular. A Ang 3 (expressa em camundongo) e sua contraparte humana Ang 4 não possuem funções bem esclarecidas, apesar da Ang 3 competir com a Ang-1 pelo receptor Tie-2, conferindo à Ang 3 uma função antagônica da ativação da Ang-1 (MATSUMOTO *et al.*, 2002). Entretanto, tem sido mostrado que a Ang-3 inibe a angiogênese e promove a apoptose das células de carcinoma pulmonar de Lewis. Este fator anti-angiogênico inibe a proliferação e sobrevivência das células endoteliais, bloqueando a ativação das quinases Erk1/2 e Akt induzida por Ang-1 (por se ligar ao Tie 2) e pelo VEGF (XU *et al.*, 2004). A Ang-2 bloqueia a ativação do receptor Tie-2 pela Ang-1, impedindo a estabilização promovida pela Ang-1, o que possibilita a ação angiogênica do VEGF ou regressão dos vasos devido a ausência do VEGF (MACHEIN *et al.*, 2004). A Ang-4 é capaz de inibir a migração de células endoteliais *in vitro* e a angiogênese induzida por câncer de pulmão de pequenas células *in vivo*, contribuindo na regulação da remodelagem e maturação vascular (OLSEN *et al.*, 2006).

Angiostatina é um fragmento proteolítico do plasminogênio com propriedade antiangiogênica (ALBINI *et al.*, 2009). Atua sobre as células endoteliais ativas inibindo a atividade ATPase destas células, através da ativação das rotas apoptóticas extrínsecas e intrínsecas e pela interação com ligantes de superfície tais como  $\alpha_v\beta_3$  (BECKER; D'AMATO, 2007).

Endostatina é um produto da clivagem proteolítica do C-terminal da cadeia- $\alpha$  de colágeno XVIII, uma multiplexina da matriz extracelular codificada no cromossomo humano 21q22.3 (WIGMORE, 2005). É um fator anti-angiogênico com capacidade de alterar a vascularização de tumores, inibindo a proliferação e a migração de células endoteliais. *In vitro*, ele é capaz de induzir a apoptose dessas células (MUCCI *et al.*, 2009).

Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) é uma citocina antiangiogênica, cujo efeito sobre a vascularização tem sido atribuído a inibição da produção do bFGF pelas células tumorais ou uma baixa regulação da expressão dos genes da interleucina-8 e do VEGF (PERSANO *et al.*, 2009).

Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) faz parte da família interferon que são glicoproteínas com habilidades de influenciar a proliferação e diferenciação celular bem como o sistema imune. Estudos comentam que tanto IFN- $\beta$  como o IFN- $\alpha$  podem especificamente efetuar uma baixa expressão tanto na produção da proteína bFGF como na expressão de seu mRNA (HONG *et al.*, 2000; NOGUCHI *et al.*, 2003). O IFN- $\beta$  tem capacidade para atenuar a proliferação de células musculares lisas *in vitro* e impedir a arteriogênese em camundongos (SCHIRMER *et al.*, 2008).

A prolactina (PRL) é uma família de hormônios protéicos que possui habilidade de regular a angiogênese. Fragmentos de PRL de 14 e 16 kDa interagem com os receptores de células endoteliais, inibindo a proliferação, migração de células endoteliais e formação tubular. Um fragmento amino-terminal da PRL inibe o desenvolvimento da microvasculatura da membrana corioalantóide (DUEÑAS *et al.*, 1999).

Vasostatina é o fragmento NH<sub>2</sub>-terminal da calreticulina humana que seletivamente inibe a proliferação de células endoteliais e angiogênese em resposta aos fatores de crescimento, além de suprimir o crescimento tumoral (YAO *et al.*, 2000; LANGE-ASSCHENFELDT, *et al.*, 2001).

O PEDF (fator derivado do epitélio pigmentado) é uma proteína de 50 kDa com propriedade anti-angiogênica, isolada primeiramente das células epiteliais pigmentadas da retina fetal humana e posteriormente encontrada em outros tecidos como nas células epiteliais ciliares não pigmentadas, cérebro e medula espinhal (PANG *et al.*, 2007). Estudos recentes têm apontado o PEDF como inibidor da sinalização VEGFR-1 e VEGFR-2 (ABLONCZY *et al.*, 2009).

#### **1.2.4 Moléculas responsáveis pela adesão**

A adesão é um processo intrínseco na formação dos vasos sanguíneos. Algumas moléculas de adesão podem participar no processo de formação dos vasos. As selectinas são moléculas que participam do processo de adesão durante o processo inflamatório (SCHON, 2005). Esta família é composta de L-selectina, E-selectina e P-selectina, sendo as duas últimas expressas na superfície do endotélio

quando estimulada por citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , interleucina-1 e 10) (NASTRI *et al.*, 2008). A e-selectina é uma molécula que promove a adesão de leucócitos no endotélio vascular durante uma situação inflamatória tal como a artrite reumatóide. Sua forma clivada (e-selectina solúvel) induz a angiogênese em córnea de rato e estimula a quimiotaxia e formação de microvasos de células endoteliais da derme humana (OH *et al.*, 2007), ainda exerce uma função importante no recrutamento de células progenitoras endoteliais para facilitar a neovascularização de tecidos isquêmicos *in vitro* e *in vivo* (NISHIWAKI *et al.*, 2007). A glicoproteína p-selectina é responsável pela amarração e rolamento de leucócitos ao longo do endotélio, uma etapa imprescindível para o extravasamento dos leucócitos. Além de poder estar envolvida na modulação da angiogênese induzida por isquemia (EGAMI *et al.*, 2006).

A molécula de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) e a molécula de adesão de célula vascular do tipo 1 (VCAM-1) são induzidos nas células endoteliais depois da estimulação com citocinas inflamatórias (interferon- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$ , ou lipopolissacarídeos). A VCAM-1 pode estimular a angiogênese uma vez interagindo com a integrina  $\alpha 4\beta 1$ , porém não promove a proliferação de células endoteliais (ELICEIRI; CHERESH, 1998). A ICAM-1 é uma proteína produzida pela célula endotelial importante na indução e retenção de células pró-inflamatórias, além de mediar a interação de várias células com a matriz extracelular (TEXEIRA *et al.*, 2007).

Durante a formação dos vasos, a interação célula com célula e célula com matriz extracelular passam ser fundamentais. Os vasos recém formados são estabilizados pela síntese de uma nova membrana basal e de células murais (pericitos e células musculares lisas), esta etapa envolve tanto alterações na adesão endotelial quanto de pericitos (SILVA *et al.*, 2008). A adesão de células endoteliais à MEC é mediada por integrinas, que são glicoproteínas transmembranas heterodiméricas compostas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  que promovem a ligação e migração pela matriz extracelular (AVRAAMIDES *et al.*, 2008). A ligação da integrina induz a vários eventos de sinalização intracelular, como a fosforilação tirosina das proteínas quinases de adesão focal e outras proteínas associadas ao contato focal, elevação do pH e dos níveis de cálcio intracelular, síntese de lipídios inositol, síntese de ciclina e expressão de genes. As múltiplas integrinas são expressas sobre as

células endoteliais mediando à adesão para uma variedade de proteínas da MEC incluindo fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno tipo I e IV, fibrinogênio. A angiogênese envolve interações múltiplas entre a MEC e as células vasculares. A remodelagem da matriz extracelular ao redor dos vasos facilita várias etapas durante a angiogênese, incluindo a degradação da matriz e a deposição nos componentes da MEC (ELICEIRI; CHERESH, 1998).

### **1.2.5 Apoptose das células vasculares**

O desenvolvimento da rede vascular é regulado tanto pela proliferação quanto pela apoptose das células endoteliais e musculares lisas, certamente a apoptose contribui para a regressão dos vasos em desenvolvimento. A força hemodinâmica, os fatores de crescimento e a matriz extracelular dirigem as rotas de sobrevivência das células vasculares, além de ter a participação do óxido nítrico como importante regulador da morte de células vasculares. Quando o sistema vascular chega ao desenvolvimento completo, ele passa pelo um processo de remodelagem. Após os vasos primitivos se formarem e reorganizarem, a circulação se acomoda as exigências do desenvolvimento e adaptação dos órgãos para vida após o nascimento. O crescimento dos tecidos é uma característica do desenvolvimento vascular, no entanto, alguns vasos embrionários e pós-embrionários regridem ou são deletados (FISHER *et al.*, 2000).

O VEGF e o bFGF, são fatores de sobrevivência para as células endoteliais que ativam duas vias de sinalização distintas que levam a angiogênese. O bFGF é capaz de ativar a fosforilação de serinas 338 e 339 da proteína quinase A -1 (PKA-1) ativada pela via p21 (inibidor de quinase dependente de ciclina) da Raf-1(quinase específica para aminoácidos serina e treonina) , isso resultará na translocação mitocondrial da Raf-1 e proteção de células endoteliais da rota intrínseca da apoptose. Já o VEGF ativa a via quinase Src da Raf-1, levando a fosforilação das serinas 340, 341 e proteção da MEK-1 dependente da apoptose mediada extrinsecamente (ALAVI *et al.*, 2003).

O endotélio é um local crítico para o controle da apoptose durante os processos tais como, inflamação, remodelagem vascular e angiogênese. Embora a supressão da apoptose das células endoteliais é requerida para manutenção da integridade dos vasos sanguíneos e para angiogênese, a ativação da apoptose tem sido sugerida para contribuir na destruição dos tecidos patológicos durante a injúria vascular, inflamação e aterosclerose (WILLIAMS *et al.*, 2006). As células endoteliais apoptóticas liberam mediadores que inibem a apoptose e aumenta a proliferação das células musculares lisas dos vasos. A liberação de mediadores anti-apoptóticos pelas células endoteliais apoptóticas ocorre por meio da ativação das caspases, resultando na fosforilação da ERK 1/2, aumento da expressão da Bcl-xl e inibição da expressão da p53 (proteína supressora tumoral) nas células musculares vasculares (RAYMOND *et al.*, 2004).

### **1.3 Geometria fractal**

#### **1.3.1 Conceito**

No decorrer do desenvolvimento das Ciências, as formas irregulares dos objetos da natureza têm sido descritas pela associação de diferentes formas regulares da geometria euclidiana tais como: círculo, esfera, parábola, elipse, curva, reta, etc. No entanto, seriam estas formas as mais apropriadas para representar as inúmeras formas da natureza, inclusive àquelas mais irregulares e multifacetadas? Como medir o comprimento da Costa Brasileira? Esta pergunta de aparente simplicidade traz consigo a complexidade inerente as medidas de estruturas fractais.

A costa de um país é bastante acidentada, caso fosse contornada uma linha poligonal entre dois determinados pontos onde se inicia e finaliza a costa, o comprimento exato da costa dependeria da escala usada na sua medida. Para realização dessa medida pode-se usar um compasso de uma determinada abertura  $l$ , iniciando cada passo no ponto em que finalizou o anterior. O valor de  $l$  multiplicado pelo número de passos  $n$  resultará num comprimento aproximado  $L(n) = nl$ . Caso se

repita o método com abertura cada vez menor, é observado que  $L(n)$  tende a aumentar sem limite definido. Na verdade, o método descrito para mensurar o comprimento da costa é uma tentativa de regularizar um objeto que é demasiadamente irregular. Quanto menor o valor de  $l$ , mais detalhes são observados e com isso mais irregularidades aparecerão. Então, pode-se deduzir que o comprimento da costa vai depender da escala utilizada para medi-la (MANDELBROT, 1991).

Ao se avaliar uma península em um mapa com escala cartográfica de 1/100.000, em seguida, observando em escala de 1/10.000, é notória a presença de detalhes não observados na escala anterior que é 1/100.000, ou seja, poderiam ser verificadas inúmeras subpenínsulas no decorrer do contorno. Quando examinada na escala de 1/1000, surgem subpenínsulas menores do que na escala de 1/10.000. Assim, cada vez que for aumentada a escala, a imagem do mapa será obviamente mais detalhada e traços semelhantes a imagens anteriores poderão vir a ser observadas (menores subpenínsulas). A descrição estatística de parte de uma costa gerada com o aumento da escala é auto-similar a toda costa (MANDELBROT, 1991).

Um estudo da costa oeste da Grã-Bretanha foi realizado pelo físico Lewis Fry Richardson (1881-1953), que constatou que as fronteiras e litorais tinham propriedades surpreendentes. Utilizando um divisor (instrumento parecido com um compasso) para demarcar as distâncias, ele observou que as irregularidades sempre apareciam quando a escala era alterada. Como também era notado que pequenas baías e penínsulas eram determinadas quando se reduzia a abertura do divisor, de modo que o comprimento total da linha costeira apresentou um valor maior que o comprimento no qual utilizou uma abertura maior do divisor. Essas duas propriedades, auto-similaridade e dependência de escala (scaling) são características de estruturas espaciais ou processos no tempo que são fractais (BASSINGTHWAIGHTE *et al.*, 1994).

O termo fractal foi criado por Benoît Mandelbrot na década de 70, cuja acepção etimológica procede do radical *fractus* proveniente do verbo *frangere*, que significa “produzir pedaços irregulares”, “quebrar”. Ele introduziu esta palavra para designar estruturas que são caracterizadas pela forma extremamente irregular ou

fragmentada e que repete estaticamente a mesma estrutura em diferentes escalas (SILVA *et al.*, 2003; CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2004).

Esses objetos são caracterizados por algumas propriedades: 1) auto-similaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo são semelhantes ao objeto ou processo todo; 2) dependência de escala (scaling), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual foi medida; 3) dimensão fractal, a qual provê uma descrição quantitativa da 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 *et al.*, 1994).

Assim para um fractal, quando mais dados são inseridos no cálculo da média esta continuará a aumentar ou diminuir, pois na auto-similaridade significa que existe um grande número de pedaços pequenos que se assemelham a pedaços maiores. Portanto, ao se determinar a média dos pedaços, ou ela se reduz com a inserção de um número mais freqüente de pequenos pedaços, ou ela aumenta com a inclusão de um pequeno número de grandes pedaços. Enquanto que para os objetos não fractais, quanto mais dados são incluídos, a média dos dados alcança um valor limite estável. Já a variância, para os objetos fractais, aumentará à medida que mais dados forem analisados, pois existe um número maior de flutuações auto-similares (LIEBOVITCH, 1998).

É importante observar que a dimensão fractal pode apresentar, ao contrário da dimensão euclidiana, valores fracionários variando entre: a dimensão do ponto e da reta  $0 < D < 1$ ; entre dimensão da reta e do plano  $1 < D < 2$  e entre a dimensão do plano e do espaço  $2 < D < 3$ . Este valor é uma medida proporcional do espaço realmente ocupado por um sistema desordenado ou estrutura irregular (SILVA *et al.*, 2003).

### **1.3.2 Exemplos de fractais e fractais na natureza**

A auto-similaridade da forma geométrica é especificada por meio de um algoritmo que instrui como construir o objeto fractal. A curva de Koch é um exemplo padrão usado para ilustrar que a curva pode ter uma dimensão  $D > 1$ . Iniciando a

partir de uma reta, dividi-se esta em 3 segmentos de igual medida. O terço médio da reta é substituído por dois segmentos de  $1/3$  da reta resultando em 4 segmentos de  $1/3$  da reta. Assim, sucessivamente, cada segmento vai substituindo seu terço médio por dois segmentos de mesma medida (Figura 3).

A dimensão fractal, definida como dimensão de auto-similaridade, descreve quantos novos pedaços geometricamente similares ao objeto são observados quando a resolução é aumentada. Assim, se reduzirmos a escala por um fator  $F$ , encontramos que existem  $N$  pedaços similares ao original, então a dimensão de auto-similaridade é dada por:  $N = F^d$ , onde  $d$  é a dimensão de auto-similaridade. Aplicando-se logaritmo neperiano:  $d = \ln N / \ln F$ . Quando esse conceito é aplicado ao perímetro da curva de Koch pode ser observado que uma redução do fator de escala de 3 ( $F = 3$ ), 4 novos pedaços são encontrados ( $N=4$ ). Desta forma, a dimensão fractal de auto-similaridade,  $d = \ln 4 / \ln 3 = 1,2628$  é um número fracionário (FEDER, 1988).

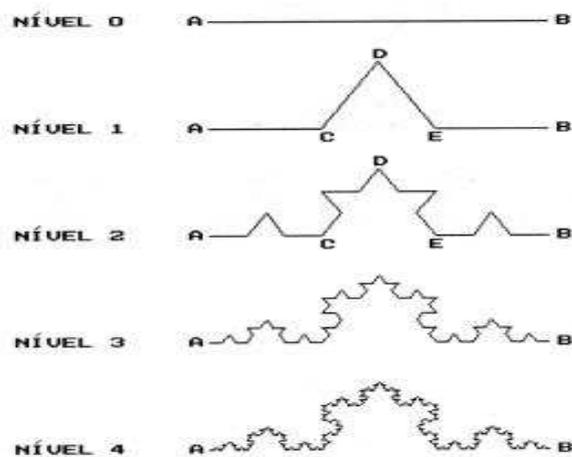


Figura 3. Construção da curva de Koch

Outro exemplo clássico de objetos fractais é o conjunto de Cantor. No qual o procedimento usando se baseia nas seguintes etapas: um segmento de reta é dividido em três segmentos iguais, no qual é retirado o seguimento intermediário. Os dois segmentos restantes são divididos em três segmentos novamente e seus segmentos intermediários são novamente removidos (Figura 4). Este processo segue *ad infinitum*. O conjunto de Cantor é o conjunto de pontos restantes após infinitas operações terem sido realizadas. A dimensão fractal do conjunto de cantor é

calculado de acordo com a interação: dividindo a reta em  $F=3$  pedaços, são gerados  $N=2$  pedaços, logo  $d=\ln 2/\ln 3 = 0,63$  (MANDELBROT, 1983).

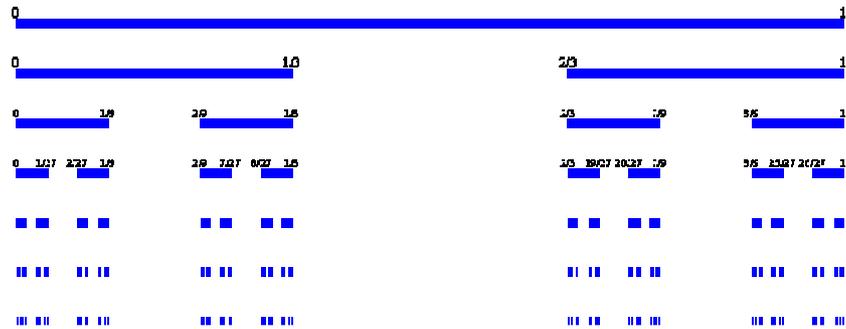
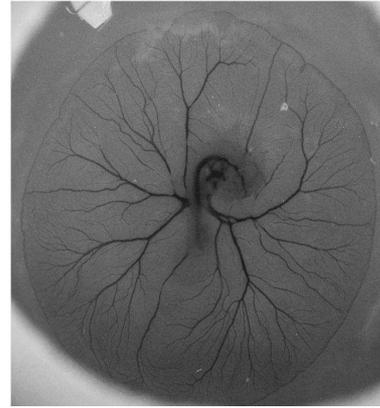


Figura 4. Formação do Conjunto de Cantor

Na natureza, podem ser encontradas estruturas com hierarquias de repetição dos padrões geradores, entretanto esse número de hierarquias é limitado. Por exemplo, o brócolis (Figura 5) possui em torno de 3 hierarquias de repetição (COSTA; BIANCHI, 2002). Outros exemplos de fractais naturais: a rede vascular sanguínea da retina, ramificação de árvores, árvore brônquica do pulmão, estados conformacionais das proteínas, meandros de rios, linhas costeiras, contornos topográficos de montanhas, distribuição da galáxia no universo, nuvens (projeção do perímetro), aglomerados de metal em catodo, brócolis (Figura 5), rede vascular extra-embriônica do embrião de pinto (Figura 6), entre outros (NUSSENZVEIG, 1999).



**Figura 5. Brócolis**



**Figura 6. Rede vascular da membrana corioalantóide do embrião de galinha. Imagem de Vico *et al.*, 1998.**

### **1.3.3 Aplicações da geometria fractal na rede vascular**

A geometria fractal tem aplicações nas mais diversas áreas da ciência: tecnologia de fabricação de antenas; medida da densidade dos minerais, evolução dos terrenos e descontinuidade das rochas; análise da rugosidade de corais; detecção automática de falhas de produtos têxteis; no solo; na chuva; na economia; na ecologia (ASSIS *et al.*, 2008).

A análise fractal tem se mostrado uma técnica objetiva para detectar modificações em diversos sistemas biológicos (SCHULZE *et al.*, 2008). Colônias de fungos, por exemplo, podem ser quantificadas através dos métodos de cálculo da dimensão fractal. Golinski *et al.* (2008) utilizaram o método de dimensão de box-counting (contagem por caixas) para avaliar o impacto da infecção por micovírus no crescimento de colônias de fungos filamentosos, observando as diferenças das dimensões fractais entre o grupo não infectado e o grupo de fungos infectados pelo hipovírus.

Uma aplicação interessante da teoria dos fractais seria de promover diagnósticos ou prever patologias graves. Os métodos de box-counting e de espectro de energia de Fourier foram capazes de oferecerem uma descrição mais

eficiente da anatomia e patologia da rede sinusoidal hepática comparada a geometria clássica, apresentando assim um valor potencial para diagnóstico futuro de doenças do fígado (GAUDIO *et al.*, 2005).

A vascularização de tumores tem uma aparência caótica em comparação à vascularização normal. Sendo a angiogênese um evento importante na evolução dos tumores e potencial alvo para o tratamento, surge assim a necessidade de compreender o comportamento da arquitetura vascular anormal dos tumores, colocando a geometria fractal como uma análise promissora na mensuração de estruturas vasculares (BAISH; JAIN, 2000), como também, hábil a realizar uma descrição quantitativa da migração de células cancerígenas (SULLIVAN *et al.*, 2010). O sistema vascular sanguíneo é uma rede complexa de estruturas tubulares ramificadas e de tamanhos diferentes que estão irregularmente distribuídas nos diversos tecidos que constituem os órgãos. Podendo ser considerado um objeto fractal devido a sua auto-similaridade, irregularidade, dimensão fracionária e dependência de uma escala de observação (GRIZZI *et al.*, 2005). A dimensão fractal pode representar um parâmetro rápido e confiável para avaliação da angiogênese, servindo assim para o diagnóstico vascular, permitindo o monitoramento da eficácia no tratamento anti-angiogênico tumoral, além do uso de terapias anti-proliferativas nas síndromes auto-imunes, retinopatias e para análise do desenvolvimento tumoral (MANCARDI *et al.*, 2008). No entanto, Avakian *et al.* (2002) mesmo apresentando a análise fractal como possível ferramenta para pesquisas na retina humana, lançam a incerteza como método de quantificação para alterações vasculares no monitoramento clínico de doenças da retina. Discrepâncias na estimação da dimensão fractal podem ser justificadas com base em procedimento experimentais não cautelosos (MASTERS, 2004). Além disso, os distintos métodos de segmentação e de estimação da dimensão fractal geram dimensões fractais diferentes para um mesmo objeto (MENDONÇA *et al.*, 2007). Assim como, o número de pontos pixels utilizados no cálculo da inclinação da reta do gráfico log-log vai depender da resolução da imagem da estrutura analisada (KUNICKI *et al.*, 2008).

No estudo com membrana corioalantóide (MCA) de embriões de galinha, Vico *et al.* (1998) demonstraram que a dimensão fractal da rede vascular da MCA possui valores crescentes à medida que o embrião se desenvolve. A partir das 100 horas em diante, a dimensão fractal ficou constante  $D=1,7$  correspondendo a um

cessamento da remodelagem vascular. PARSONS-WINGERTER *et al.* (1998) calcularam a dimensão fractal da rede vascular da MCA de embriões de codorna obtendo um valor de 1,49 para o nono dia de vida do embrião. Estes autores avaliaram através da dimensão fractal que houve aumento da rede vascular das MCAs tratadas com o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e quando tratadas com angiostatina resultou em uma dimensão fractal de baixo valor para rede vascular, confirmando o efeito inibidor da angiostatina sobre a vascularização.

## **1.4 Campo eletromagnético**

### **1.4.1 Influência do campo eletromagnético na biologia: efeitos prejudiciais e benéficos.**

O aumento do número de aparelhos elétricos e eletrônicos nos mais variados locais (residências, hospitais, escolas, empresas, laboratórios) faz com que a pessoas convivam com a poluição eletromagnética com variáveis níveis de potência e frequência. Tem sido sugerido que campos eletromagnéticos (CEMs) de 50 a 60 Hz são capazes de produzirem diversos efeitos adversos em humanos e animais, por exemplo: câncer; doenças neurodegenerativas; distúrbios na reprodução; efeitos psiquiátricos e psicológicos; alterações citogenéticas, alterações no sistema cardiovascular, nervoso, neuroendócrino e imunológico; distúrbios do crescimento e desenvolvimento; variação dos perfis hematológicos e bioquímicos (ANSELMO *et al.*, 2005).

O CEM é a combinação do campo elétrico e magnético, que se interceptam em um ângulo de 90° sobre suas posições vetoriais. Ele é gerado ao redor de um condutor quando uma corrente o atravessa (ERDOGAN, 2007). A tabela 1 classifica os campos eletromagnéticos quanto a frequência.

Tabela 1. Classificação do campo eletromagnético com relação a frequência

Tipo de CEM	Frequência	Comprimento de onda no ar	Exemplo
Extremamente baixa	0 – 300 Hz	> 1000 Km	Muitos processos biológicos
Baixa, média e alta	30 KHz – 30 MHz	10 Km – 10 m	Rádio e controles remoto
Muito e ultra alta	30 – 300 MHz	10 – 1m	Rádios e TV
Super alta	300 MHz – 30 GHz	1m – 10 cm	Comunicação via satélite
Extremamente alta	30 – 300 GHz	10 – 1 cm	Radar
Infra – vermelho	300 GHz – 300 THz	1 cm – 100 µm	Radar
Luz visível	429 – 750 THz	700 – 400 nm	Luz

**Informações baseadas em Funk *et al.*, 2009**

Os CEMs não exercem efeitos apenas sobre os seres vivos. Biosubstratos (soro fisiológico, soro fisiológico glicosado e água para injeção) utilizados nas UTI de hospitais podem apresentar alterações nos parâmetros físico-químico como pH e absorção, devido a estarem próximos de aparelhos que geram CEMs como, eletroencefalograma, eletrocardiograma, bomba de infusão e cabos de força (Dewes; Mendes, 2006)

A ação de CEMs de 900 MHz (valor de emissão do telefone celular) afeta o fluxo sanguíneo cerebral e a atividade neuronal em humanos (HUBER *et al.*, 2002; WOLF *et al.*, 2006; AALTO *et al.*, 2006). Campos eletromagnéticos de radiofrequência (CEMRF) emitidos por telefone celular têm efeitos sobre a fisiologia do cérebro. Mudanças em perfis eletroencefalográficos são observadas quando indivíduos são expostos a radiação durante o sono. Simulações da distribuição da taxa de absorção específica no cérebro apóiam à hipótese de que a região subcortical esteja envolvida nos efeitos observados no eletroencefalograma durante o sono (HUBER *et al.*, 2003). Além disso, há uma relação dose resposta entre a intensidade de CEM e seus efeitos sobre a fisiologia cerebral (REGEL *et al.*, 2007).

Existem evidências que apóiam os efeitos de CEM de baixa frequência em células do sistema imune, assim como a participação dos mecanismos de

transdução do sinal dependente de cálcio na mediação dos efeitos CEMs fracos nestas células (WALLECZEK, 1992). Exposição ao CEM de 81 mGauss a curto-prazo parece ter influência na ativação da imunidade adquirida e inata, que pode ser evidenciado pelo aumento sérico de TNF- $\alpha$  e do teor de glutathiona cerebral. Enquanto, que a mesma intensidade ao longo prazo acarreta alterações comportamentais como agressividade, hiperatividade e modificações na função visual de ratos (EL-SWEFY *et al.*, 2008). Campo magnético estático de 6 mT induz alterações na membrana plasmática de linfócitos fazendo com que fiquem similares aos linfócitos apoptóticos, conseqüentemente sendo removido do organismo por fagocitose hepática. Também atua sobre a maturação de macrófagos, interferindo na diferenciação TPA – induzida (*12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato*) de monócito/macrófago. Além de afetar a concentração intracelular do cálcio, que é importante na transdução de sinais no processo de diferenciação TPA – induzida e alteração do citoesqueleto durante a fagocitose (DINI, 2010).

Modelos biofísicos têm sido elaborados para tentar explicar a ação CEM nas células. Um dos mecanismos seria a vibração que o CEM pode realizar nos íons intra e extracelulares promovendo um desequilíbrio no balanço eletroquímico da membrana (JIMÉNEZ-GARCÍA, 2010). Apesar de existir outras prováveis formas de atuação do CEM sobre a célula como na bicamada lipídica ou na interação proteína e DNA (WANG *et al.*, 2009). Em geral, efeitos não-ionizantes do CEM causam alteração na estrutura e função celular além dos componentes subcelulares (membranas, enzimas, sistema de transporte, entre outros), enquanto que os efeitos ionizantes induzido pelo CEM na matéria viva está relacionado ao dano ou destruição do tecido ou da célula (SYLVESTER *et al.*, 2005)

O CEM pode influenciar no crescimento celular e modular a produção das quimiocinas IL-8, MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócito), MIP-1 $\alpha$  (proteína -1 inflamatória de macrófago) assim como o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. A redução dos níveis do fator NF- $\kappa$ B apóia a hipótese que a exposição ao CEM possa favorecer a cicatrização através do aumento do crescimento de queratinócitos e redução da produção de moléculas pro – inflamatórias (VIANALE *et al.*, 2008).

A expressão de genes apoptóticos *bcl-2*, *bax*, *p53* e *hsp70* podem ser modulados pela exposição ao CEM. CEM aumenta tanto *bax* quanto *p53* e reduz

*bcl-2* e *hsp70*, tendo potencial repercussão na clínica, como uma alternativa de eliminar células indesejáveis no organismo (TENUZZO *et al.*, 2009).

Apesar de alguns trabalhos relatarem que CEM pode gerar efeito carcinogênico, os resultados ainda são inconsistentes em termos de dados epidemiológicos e trazem incerteza nos achados gerados de experimentos laboratoriais (HEATH, 1996). Estudos epidemiológicos consideraram uma fraca relação entre CEM de baixa frequência e a leucemia linfoblástica aguda em crianças (PELISSARI *et al.*, 2009). Schüz *et al.* (2006) têm observado que baixos níveis de exposição ao CEMRF não são capazes de gerar tumores cerebrais. Estudos apresentam que efeitos não térmicos de CEM de radiofrequência não possuem efeitos diretos no DNA (mutagenicidade e genotoxicidade) e pouca evidência de efeitos indiretos, como alteração gênica, proliferação celular e apoptose (TAKEBAYASHI *et al.*, 2008).

Experimentos com CEMs fracos em modelos biológicos produzem informações que permitem a compreensão de sua influência nos processos biológicos, gerando resultados que mostram não apenas seus efeitos prejudiciais, porém também aqueles de cunho terapêutico (FREY, 1993).

Investigações clínicas fornecem vários benefícios da terapia com campo magnético (HENRY *et al.*, 2008). O CEM pulsado já vem sendo utilizado ou sugerido como tratamento de algumas desordens fisiológicas: não união óssea, pseudoartrose congênita, osteotomias, osteoporose, artroplastia do quadril, doença de Legg Calvé Perthes, artrite reumatóide, osteoartrite, fusão espinhal, tendinite da coifa do rotador, fusão lombar, úlceras venosas da perna, lesão no nervo, dor pélvica, esclerose múltipla, desordens auditivas (zumbido), desordens psiquiátricas (através da estimulação magnética transcranial), câncer (associado ou não a droga tumorais), isquemia cerebral, estimulação cardíaca (SHUPAK, 2003).

CEMs pulsados podem acelerar a reparação óssea de fraturas em animais, relacionando-se à atividade osteoblástica em osteotomia de metacarpo de cavalos, maior taxa de aposição mineral e melhores propriedades mecânicas em tíbias de cães. Em ratos e coelhos, CEMs pulsados causam a redução da perda de volume ósseo, aumento da velocidade de reparo e aumento da resistência mecânica óssea. Estudos relataram que os CEMs pulsados estimulam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos através do aumento da síntese de óxido nítrico. Em cultura de

células ósseas, foi observado que os sinais elétricos do CEMs pulsados promovem a proliferação destas células, sugerindo que esta proliferação seja devido ao aumento da concentração citoplasmática de cálcio que ocorre por duas possíveis rotas: abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes ou pela mobilização de cálcio contido em compartimentos intracelulares para o citoplasma (LIRANI; LAZARETTI – CASTRO, 2005).

CEMS pulsados são capazes de acelerar a cicatrização de lesões em camundongos normais e diabéticos, através do aumento da expressão da angiogênese mediada por FGF-2. Sendo assim sugerido na prevenção da formação de úlceras, necrose e amputação em pacientes com diabete (CALLAGHAN *et al.*, 2008). Esta habilidade de estimular o aumento de alguns fatores angiogênicos junto à propriedade de proporcionar a dilatação dos vasos sanguíneos, o elege como terapia na redução da frequência de osteonecrose (ISHIDA *et al.*, 2008).

No tratamento de tumores, foi provado que CEM é capaz de inibir significativamente alguns modelos experimentais de neoplasias (FUNK, 2009). Foi observado que o campo eletromagnético de 15 mT, com 120 pulsos por segundo, tem menos efeito de supressão sobre o crescimento de tumores de mama humano enxertados em camundongos quando comparado a uma irradiação gama de 200 cGy. No entanto, além de não possuir efeitos colaterais nocivos, o CEM obteve sucesso no retardamento da vascularização tumoral (CAMERON *et al.*, 2005). Além disso, Barbault *et al.* (2009) têm sugerido que o CEM não atua isoladamente sobre o tumor, podendo ampliar seus efeitos sobre a interação hospedeiro e tumor, como por exemplo, modulando a atividade imunológica.

#### **1.4.2 Ação de campo eletromagnético em vasos sanguíneos**

Vários estudos têm mostrado a ação de CEM sobre os vasos sanguíneos. CEM de 0.04 T pode inibir a angiogênese em membrana corioalantóide de embrião de galinha, aparentando uma redução significativa no número e no comprimento dos vasos sanguíneos (BALANEZHAD, *et al.*, 2010). Enquanto que o CEM pulsado é

capaz de induzir vasodilatação arteriolar em músculo cremaster de ratos (GAN; GLAZER, 2006), angiogênese e vasodilatação na região gluteofemoral de coelhos (ISHIDA *et al.*, 2008).

O campo magnético de 50 Hz não tem apresentado evidências de atuação nas células endoteliais de veias umbilicais humanas *in vitro* ou em modelo de reestenose em camundongos *in vivo*. Esta forma de radiação não ionizante não tem uma resposta transcricional, sendo incapaz de modificar expressão gênica e assim não oferecendo riscos para células endoteliais (HENDERSON, *et al.*, 2006).

Li *et al.* (2007) estudaram a atuação de campos magnéticos estáticos de 0.1 mT, 1 mT e 10 mT sobre proliferação, apoptose e expressão de VCAM-1 e ICAM-1 de células endoteliais. Foi observado que os campos magnéticos de 1 e 10 mT impediram o crescimento de células endoteliais, enquanto que o campo magnético de 0.1 mT não influenciou na proliferação dessas células. O campo magnético de 10 mT induziu a apoptose e necrose das células endoteliais e promoveu o aumento da expressão de VCAM-1 e ICAM-1. Enquanto nada foi observado para os campos magnéticos de 0.1 e 1 mT. Conclui-se que o campo magnético vai interagir com as células endoteliais de acordo com a intensidade (10 mT), promovendo efeito citotóxico, apoptótico, necrótico, além de ampliar a expressão de VCAM-1 e ICAM-1, que desencadeiam inflamação relacionada ao endotélio.

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

## **2. OBJETIVOS**

Os campos eletromagnéticos de extrema baixa frequência são capazes de produzir diversos efeitos alterando a estrutura e função dos sistemas que compõem os seres vivos, dentre esses sistemas estão os vasos sanguíneos. Por isso, este trabalho propõe a estudar os efeitos do campo eletromagnético de frequência de 60 Hz (normalmente gerado por redes elétricas) e com intensidade de 1 mT sobre a rede vascular de um modelo experimental animal, no caso a vascularização extra-embriônica de embriões de codorna utilizando a geometria fractal como ferramenta de análise.

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar, utilizando a geometria fractal, a ação do CEM de baixa frequência (60 Hz), sobre a rede vascular da MCA dos embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*).

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Parametrizar a vascularização da MCA de embriões de codorna através da teoria dos fractais, utilizando dois métodos de análise da dimensão fractal, tais como dimensão de contagem por caixas e dimensão de informação;
2. utilizar a geometria fractal para investigar se o CEM de 60 Hz promove alterações quantitativas na vascularização da MCA de embriões de codorna.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Incubadora**

Foi utilizada uma incubadora construída nas dependências do Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) do DMFA da UFRPE, que permite o desenvolvimento dos embriões em condições ideais de temperatura e umidade (37,5°C e 60% respectivamente), sendo a temperatura controlada através de uma resistência monitorada por um termostato e a umidade pelo gotejamento de água através de uma torneira controlada eletricamente. A temperatura foi mensurada através de um termômetro acoplado a própria incubadora, enquanto que a umidade relativa do ar foi através de um termo-higrômetro da Minipa modelo MT-241.

A incubadora também é constituída por um pequeno exaustor capaz de impulsionar um jato de ar quente úmido, gerado a partir da resistência e do recipiente de água, em direção aos leitos projetados para acomodarem os ovos fertilizados. O equipamento foi montado em estrutura de madeira revestida em fórmica e recoberto por chapa de acrílico de 2mm. Este aparelho foi elaborado para promover a fácil captura de imagens, assim como a instalação de uma bobina de Helmholtz geradora de CEM.

#### **3.2 Incubação, preparação das amostras.**

Foram utilizados 120 ovos fertilizados de codorna japonesa (*Coturnix japonica*) provindos da Estação Experimental de Pequenos Animais de Carpina da UFRPE. Sendo 20 ovos utilizados para o grupo controle e 100 para formar os grupos expostos ao CEM.

Os ovos foram distribuídos nos dois ductos da incubadora e mantidos em condições padrão de temperatura (37,5°C) e umidade relativa do ar (em torno de 60%) imprescindíveis para uma adequada incubação (MAZZONELLI; LED, 1960; MARQUES, 1994). Os ovos foram mantidos na incubadora durante 120 horas.

Apenas o grupo teste (exposto ao CEM) foi colocado em um único ducto no qual foi instalada a bobina de CEM.

No segundo dia de incubação, foram realizados cortes nas cascas dos ovos incubados de modo a se ter acesso à membrana corioalantóide. Os ovos tiveram uma área da casca seccionada, formando uma janela abaulada (retângulo com os lados abaulados), com medidas aproximadas 2,0 cm de comprimento por 1,5 cm de largura. Este procedimento foi executado através de uma tesoura estéril, após os ovos serem limpos com clorexidina 2%.

Com uma seringa foi removido em torno de 2,5 ml do albúmen, depois a janela foi coberta com filme PVC (cloreto de polivinila), selando da possível contaminação de microorganismos e evitando o ressecamento do embrião (KIRCHNER *et al.*, 1996; VICO *et al.*, 1998). Desta forma, foi possível visualizar a MCA de todos os ovos. As imagens da rede vascular da membrana foram capturadas em intervalos de 24 horas. As fotografias foram realizadas através da câmara digital Sony DSC-W130 8.1 megapixels e transferidas para o computador para posteriormente serem trabalhadas procurando obter assim suas dimensões fractais.

### **3.3 Exposições ao campo eletromagnético (CEM)**

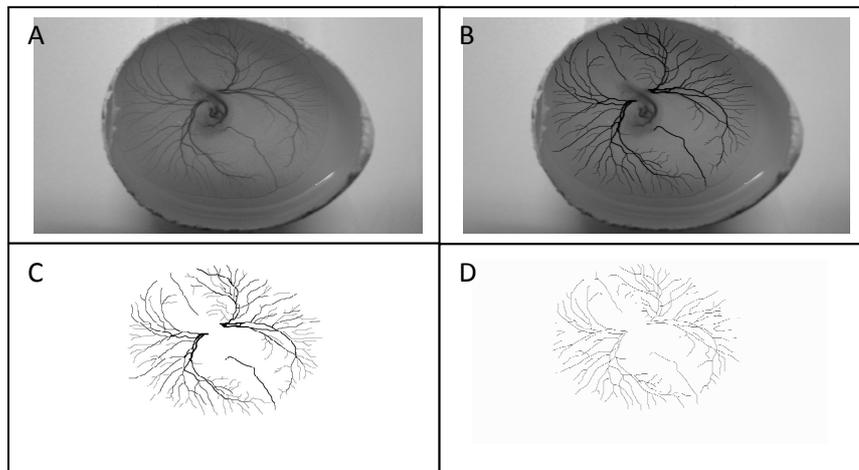
Foram utilizados 100 ovos fertilizados (20 ovos por grupo) seguindo a metodologia citada no tópico anterior para serem submetidos a um CEM de 1 mT com frequência de 60 Hz durante 3 vezes num período de um dia (24 horas) de incubação, exceto o grupo exposto durante 24 horas. Os ovos foram acomodados em um único ducto, como já mencionado, onde se encontra uma bobina de Helmholtz (PHYWE/ GERMANY), ligadas em paralelo a uma fonte geradora de ondas senoidais (STUFENTRAFO POWER SUPPLY 14 V/AC). No primeiro grupo os ovos ficaram expostos durante 1 hora e depois de 7 horas retornavam a serem submetidos ao mesmo CEM. O segundo grupo foi submetido por 2 horas obedecendo a um intervalo de 6 horas entre as exposições. O terceiro grupo foi exposto por 3 horas ao CEM a cada 5 horas, o quarto grupo foi exposto por 4 horas, voltando a ser submetido depois de 4 horas, enquanto que o quinto grupo foi

exposto por 24 horas. Depois de 24 horas de exposição, as imagens da vascularização da MCA foram apanhadas e processadas.

### **3.4 Tratamento de imagem**

As imagens digitalizadas foram segmentadas visando a análise da geometria fractal da rede vascular que se forma ao longo do tempo de observação. A segmentação consiste em separar os vasos sanguíneos do plano de fundo no qual os vasos estão contidos. Após este procedimento as imagens segmentadas são binarizadas (preto e branco).

O procedimento de segmentação consistiu em abrir a imagem digitalizada pelo programa Paint da Microsoft e cobrir os vasos da MCA por meio da função pincel (Figura 7 B). Após segmentação dos vasos foi realizado uma inversão de cores através do menu imagem do software e em seguida foi ativada a função atributos para conversão em uma imagem binária, em que o fundo de imagem estaria em preto e os vasos em branco. A Figura 7 C representa o processo de segmentação, porém de forma invertida como descrito anteriormente, vasos em preto e fundo de imagem em branco. Este procedimento se faz necessário devido o programa Benoit<sup>TM</sup> 1.3 Fractal Analysis System, usado para o cálculo da dimensão fractal da imagem segmentada dos vasos, operar com a imagem nesse formato monocromático. Por razões práticas, foi realizada uma forma de segmentação designada de esqueletização que confere uma dimensão única para toda rede vascular desconsiderando os calibres dos vasos (figura 7 D).



**Figura 7. Etapas da segmentação: A. rede vascular da MCA, B. processo intermediário de segmentação da MCA, C. binarização com completa segmentação, D. esqueletização.**

### 3.5 Análise fractal

O Benoit™ versão 1.3 Fractal Analysis System é o software capaz de realizar o cálculo da dimensão fractal através de alguns métodos dentre eles dimensão de contagem por caixa (box-counting) e dimensão de informação.

A dimensão de contagem por caixas é um método largamente usado para o cálculo da dimensão fractal devido o seu formalismo matemático ser bastante simples e também ser de fácil estimativa empírica (FALCONER, 1990).

A dimensão de contagem por caixas ( $D_{bc}$ ) é obtida cobrindo-se o objeto fractal com  $N(r)$  caixas que contenham pelo menos um ponto do objeto fractal. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de  $N(r)$  em função de  $r$  (lados das caixas). A inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de contagem por caixas, que pode ser definida, formalmente através da seguinte expressão:

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

A dimensão de informação ( $D_{inf}$ ) é um método capaz de caracterizar estrutura de fractais não homogêneos em sua invariância de escala, neste caso o objeto é coberto por caixas e leva-se em conta a probabilidade relativa de ocupação das caixas elementares usados para cobrir o objeto fractal, ou seja, a dimensão vai depender da frequência com que cada caixa é visitada. Sendo definida pela seguinte expressão:

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

Onde  $S(r) = -\lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log(m_i)$  é denominada de entropia de Kolmogorov.  $N$  é o número de caixas e  $m_i = M_i/M$ , sendo  $M_i$  o número de pontos na  $i$ -ésima caixa e  $M$  é o número total de pontos do objeto fractal (KUNICKI *et al.*, 2009).

### 3.6 Análise estatística

Após a obtenção dos valores da dimensão fractal de cada rede vascular da MCA, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para decidir se os dados seguem uma distribuição normal. Como os dados (os valores das dimensões fractais) não seguiram uma distribuição normal usou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as dimensões fractais dos diferentes grupos experimentais.

#### 4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AALTO, S.; HAARALA, C.; BRÜCK A.; SIPILÄ, H.; HÄMÄLÄINEN H.; O RINNE, J. Mobile phone affects cerebral blood flow in humans. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.26, p.885–890, 2006.

ABLONCZY, Z.; PRAKASAM, A.; FANT, J.; FAUQ, A.; CROSSON, C.; SAMBAMURTI, K. Pigment epithelium-derived factor maintains retinal pigment epithelium function by inhibiting vascular endothelial growth factor-r2 signaling through  $\gamma$ -secretase. **The Journal of Biological Chemistry**. v.284, n.44, p.30177–30186, 2009.

ADAM, R.; MUSSA, S.; LINDEMANN D.; OELSCHLAEGER, T.A.; DEADMAN, M.; FERGUSON, D.J.P.; MOXON, R.; SCHROTEN, H. The avian chorioallantoic membrane in ovo – a useful model for bacterial invasion assay. **International Journal Medical Microbiology**. v.292, p.267-275, 2002.

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

ALAVI, A.; HOOD, J.D.; FRAUSTO, R.; STUPACK, D.G.; CHERESH, D. A. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. **Science**. v.301, p.94-96, 2003.

ALBINI, A.; BRIGATI, C.; VENTURA, A.; LORUSSO, G.; PINTER, M.; MORINI, M.; MANCINO, A.; SICA, A.; NOONAN, D.M. Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: The innate immune system as a key target. **Journal of Translational Medicine**. v.7, n.5, p.1-18, 2009.

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

AMIN, M.A.; MANSFIELD, P.J.; PAKOZDI, A.; CAMPBELL, P.L.; AHMED, S.; MARTINEZ, R.J.; KOCH, A.E. Interleukin-18 induces angiogenic factors in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblasts via distinct signaling pathways. **Arthritis & Rheumatism**. v.56, n.6, p.1787–1797, 2007.

ANSELMO, C.W.S.F.; BION, F.M.; CATANHO, M.T.J.A.; MEDEIROS, M.C. Possíveis efeitos adversos dos CEM (50/60 Hz) em humanos e em animais. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.10, p.71-82, 2005.

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

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

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

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

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

BARBAULT, A.; COSTA, F.P.; BOTTGER, B.; MUNDEN, R.F.; BOMHOLT, F.; KUSTER, N.; PASCHE, B. Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: Discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach. **Journal of experimental & clinical cancer research**. v.28, n.51, p.1-10, 2009.

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

BECKER, C.M.; D'AMATO, R.J. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis. **Microvascular Research**. v.74, p.121–130, 2007.

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

BENETTI, A.; BERENZI, A.; GAMBAROTTI, M.; GARrafa, E.; GELATI, M.; DESSY, E.; PORTOLANI, N.; PIARDI, T.; GIULINI, S. M.; CARUSO, A.; INVERNICI, G.; PARATI, E. A.; NICOSIA, R.; ALESSANDRI, G. Transforming Growth Factor-B1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium. **Cancer Research**. v.68, n.20, p.8626-8634, 2008.

BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. **Trends in cell biology**. v.5, n.2, p.69-74, 1995.

BORGES J.; TEGTMEIER, F.T.; PADRON, N.T.; MUELLER, M.C.; LANG, E.M.; STARK, G.B. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. **Tissue engineering**. v.9, n.3, p. 441-450, 2003.

BRANTLEY-SIEDERS, D.M.; FANG, W.B.; HWANG, Y.; HICKS, D.; CHEN, J. Ephrin-a1 facilitates mammary tumor metastasis through an angiogenesis-dependent

mechanism mediated by Epha receptor and vascular endothelial growth factor in mice. **Cancer Research**. v.66, n.21, p.10315 – 10324, 2006.

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

CALLAGHAN, M. J.; CHANG, E. I.; SEISER, N.; AARABI, S.; GHALI, S. ; KINNUCAN, E.R.; SIMON, B.J.; GURTNER, G. C. Pulsed electromagnetic fields accelerate normal and diabetic wound healing by increasing endogenous FGF-2 release. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.121, n.1, p.130-141, 2008.

CAMERON, I.L.; SUN, L.-Z.; SHORT, N.; HARDMAN, W.E.; WILLIAMS, C.D. Therapeutic electromagnetic field (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. **Cancer Cell International**. v.5, n.23, p.1-13, 2005.

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

CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A.; VINCENTI, V.; COMPERNOLLE, V.; DE MOL, M.; WU, Y.; BONO, F.; DEVY, L.; BECK, H.; SCHOLZ, D.; ACKER, T.; DIPALMA, T.; DEWERCHIN, M.; NOEL, A.; STALMANS, I.; BARRA, A.; BLACHER, S.; VANDENDRIESSCHE, T.; PONTEN, A.; ERIKSSON, U.; PLATE, K.H.; FOIDART, J.; SCHAPER, W.; CHARNOCK-JONES, D.S.; HICKLIN, D.J.; HERBERT, H.; COLLEN, D.; PERSICO, M.G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Medicine**. v.7, n.5, p.575-583, 2001.

CHEN, Y.; ZHANG, S.; CHEN, Y.-P.; LIN, J.-Y. Increased expression of angiogenin in gastric carcinoma in correlation with tumor angiogenesis and proliferation. **World Journal of Gastroenterology**. v.12, n.32, p.5135-5139, 2006.

CHENG, C.-F.; FAN, J.; FEDESCO, M.; GUAN, S.; LI, Y.; BANDYOPADHYAY, B.; BRIGHT, A. M.; YERUSHALMI, D.; LIANG, M.; CHEN, M.; HAN, Y.-P.; WOODLEY, D. T.; LI, W. Transforming growth factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ )-stimulated secretion of hsp90 $\alpha$ : using the receptor Irp-1/cd91 to promote human skin cell migration against a tgfb-rich environment during wound healing. **Molecular and Cellular Biology**. v.28, n.10, p. 3344–3358. 2008.

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

CIMPEAN, A.M.; RIBATTI D.; RAICA M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. **Angiogenesis**. v.11, p.311–319, 2008.

CONCONI, M.T.; NICOB, B.; GUIDOLIN, D.; BAIGUERA, S.; SPINAZZI, R.; REBUFFAT, P.; MALENDOWICZ, L.K.; VACCA, A.; CARRARO, G.; PARNIGOTTO, P.P.; NUSSDORFER, G.G.; RIBATTI, D. Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo. **Peptides**. v.25, n.12, p.2179–2185, 2004.

COSTA, L.F.; BIANCHI, A.G.C. A outra dimensão da dimensão fractal. **Ciência Hoje**. v.31, n.183, p.40-47, 2002.

CRAWFORD, Y.; KASMAN, I.; YU, L.; ZHONG, C.; WU, X.; MODRUSAN, Z.; KAMINKER, J.; FERRARA, N. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. **Cancer Cell**. v.15,p.21–34, 2009.

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

DACE, D.S.; KHAN, A.A.; KELLY, J.; APTE, R.S. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development. **Plos One**. v.3, n.10, p.1-10, 2008.

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

DAVIES, M.H.; ZAMORA, D.O.; SMITH, J.R.; Powers, M.R. Soluble ephrin-B2 mediates apoptosis in retinal neovascularization and in endothelial cells. **Microvascular Research**. v.77, p.382–386, 2009.

DERYUGINA, E.I.; QUIGLEY, J.P. Chapter two: Chick embryo chorioallantoic membrane models to quantify angiogenesis induced by inflammatory and tumor cells or purified effector molecules. **Methods in Enzymology**. v.444, p.21–41, 2008.

DEWES, V.M.; MENDEZ, N.R.M. Estudo experimental dos efeitos dos campos eletromagnéticos de baixa frequência nos biosubstratos. **UNrevista**. v.1, n.3, p.1-10, 2006.

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

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

DINI, L. Static Magnetic Field Interferes with the Physiological Removal of Circulating Apoptotic Lymphocytes. **PIERS Online**. v.6, n.3, p.252-256, 2010.

DINMITROPOULOU, C.; MALKUSCH, W.; FAIT, K. E.; MARAGOUDAKIS, M.E.; KONERDING M. A. The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. **Angiogenesis**. v.2, p.255 – 263, 1998.

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

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

ELICEIRI, B.P.; CHERESH. D.A. The role of  $\alpha_v$  Integrins during Angiogenesis. **Molecular Medicine**. v.4, p.741-750, 1998.

EL-SWEFY, S.; SOLIMAN, H.; HUESSEIN, M. Calcium channel blockade alleviates brain injury induced by long term exposure to an electromagnetic field. **Journal of Applied Biomedicine**. v.6, p. 153-163, 2008.

ERDOGAN, Y. Electromagnetic pollution in the computer labs: the effects on the learning environment. **Essays in Education**. v. 22, p. 78-86, 2007.

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

FAN, Y.; YE, J.; SHEN, F.; ZHU, Y.; YEGHIAZARIANS, Y.; ZHU, W.; CHEN, Y.; LAWTON, M. T.; YOUNG, W. L.; YANG, G.-Y. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. v.28, n.1, p.90–98, 2008.

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

FISHER, S.A.; LANGILLE, B.L.; SRIVASTAVA, D. Apoptosis during cardiovascular development. **Circulation Research**. v.87, p.856-864, 2000.

FLAMME, I.; BREIER, G.; RISAU, W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. **Developmental Biology**. v.169, p. 699-712, 1995.

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

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

FREY, A. H. Electromagnetic field interactions with biological systems. **The FASEB journal**. v.7, p. 272-281, 1993.

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

FUNK, R.H.W.; MONSEES, T.; OZKUCUR, N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**. v.43, p.177–264, 2009.

GABRIELLI, M.G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2010, p.1-12, 2010.

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

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

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

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

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

HEATH, C.W. Electromagnetic field exposure and cancer: a review of epidemiologic evidence. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. v. 46, n. 1, p. 29-44, 1996.

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

HEIDEMANN, J.; OGAWA, H.; DWINELL, M.B.; RAFIEE, P.; MAASER, C.; GOCKEL, H.R.; OTTERSON, M.F.; OTA, D.M.; LÜGERING, N.; DOMSCHKE, W.; BINION, D.G. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 10, p. 8508–8515, 2003.

HELLSTRÖM, A.; CARLSSON, B.; NIKLASSON, A.; SEGNESTAM, K.; BOGUSZEWSKI, M.; LACERDA, L.; SAVAGE, M.; SVENSSON, E.; SMITH, L.; WEINBERGER, D.; WIKLAND, K. A.; LARON, Z. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.87, n.7, p.3413–3416, 2002.

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

HENRY, S.L.; CONCANNON, M.J.; YEE, G.J. The effect of magnetic fields on wound healing experimental study and review of the literature. **ePlasty: Open access Journal of Plastic Surgery**. v. 8, p. 393-399, 2008.

HIRATA, A.; OGAWA, S.; KOMETANI, T.; KUWANO, T.; NAITO, S.; KUWANO, M.; ONO, M. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase<sup>1</sup>. **Cancer Research**. v.62, p.2554–2560, 2002.

HONG, Y.-K.; CHUNG, D.-S.; JOE, Y.-A.; YANG, Y.-J.; KIM, K.-M.; PARK, Y.-S.; YUNG, W.K.A.; KANG, J.-K. Efficient inhibition of in vivo human malignant glioma growth and angiogenesis by interferon- $\beta$  treatment at early stage of tumor development. **Clinical Cancer Research**. v. 6, p.3354–3360, 2000.

HUBER, R.; TREYER, V.; BORBÉLY, A.A.; SCHUDERER, J.; GOTTSSELIG, J.M.; LANDOLT, H.-P.; WERTH, E.; BERTHOLD, T.; KUSTER, N.; BUCK, A.; ACHERMANN, P. Electromagnetic fields, such as those from mobile phones, alter regional cerebral blood flow and sleep and waking EEG. **Journal Sleep Research**. v. 11, p.289 – 295, 2002.

HUBER, R.; SCHUDERER, J.; GRAF, T.; JUTZ, K.; BORBELY, A.A.; KUSTER, N.; ACHERMANN, P. Radio frequency electromagnetic field exposure in humans: estimation of SAR distribution in the brain effects on sleep and heart rate. **Bioelectromagnetics**. v.24, p.262-276, 2003.

HUYNH-DO, U.; VINDIS, C.; LIU, H.; CERRETTI, D.P.; MCGREW, J.T.; ENRIQUEZ, M.; CHEN, J.; DANIEL, T.O. Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. **Journal of Cell Science**. v.115, n.15, p.3073-3081, 2002.

GABRIELLI, M.G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2010, p.1-12, 2010.

GARCIA, S.M.L.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia** – 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416p.

GILBERT, A.B. Aves domésticas. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. cap 21, p.488-514.

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

JAMES, J.M.; GEWOLB, C.; BAUTCH, V.L. Neurovascular development uses VEGF-A signaling to regulate blood vessel ingression into the neural tube. **Development**. v. 136, p.833-841, 2009.

JIMÉNEZ-GARCÍA, M.N.; ARELLANES-ROBLEDO, J.; APARICIO-BAUTISTA, D.I.; RODRÍGUEZ-SEGURA, M.Á.; VILLA-TREVIÑO, S.; GODINA-NAVA, J.J. Anti-proliferative effect of extremely low frequency electromagnetic field on preneoplastic lesions formation in the rat liver. **BMC Cancer**. v.10, n.159, p.1-12, 2010.

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

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

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

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

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

LANDRY, J.R.; KINSTON, S.; KNEZEVIC, K.; DE BRUIJN, M.F.; WILSON, N.; NOTTINGHAM, W.T.; PEITZ, M.; EDENHOFER, F.; PIMANDA, J.E.; OTTERSACH, K.; GÖTTGENS, B. Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. **Blood**. v.111, n.6, p.3005-3014, 2008.

LANGE-ASSCHENFELDT, B.; VELASCO, P.; STREIT, M.; HAWIGHORST, T.; PIKE, S.E.; TOSATO, G.; DETMAR, M. The angiogenesis inhibitor vasostatin does not impair wound healing at tumor-inhibiting doses. **Journal of Investigative Dermatology**. v.117, n.5, p.1036-1041, 2001.

LARGER, E.; MARRE, M.; CORVOL, P.; GASC, J-M. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. **Diabetes**. v. 53, p.752-761, 2004.

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

LENG, T.; MILLER, J.M.; BILBAO, K.V.; PALANKER,D.V.; HUIE, P.; BLUMENKRANZ, M.S. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. **The Journal of Retinal and Vitreous Diseases**. v.24, n.3, p.427-434, 2004.

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

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

LIRANI, A.P.R.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**. v.49, n.6, p.891-896, 2005.

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

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

MACHEIN, M. R.; KNEDLA, A.; KNOTH, R.; WAGNER, S.; NEUSCHL, E.; PLATE, K.H. Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model. **American Journal of Pathology**. v.165, n. 5, p.1557-1570, 2004.

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

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

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

MARQUES, D. **Fundamentos básicos de incubação industrial**. 2. ed. São Paulo: Casp S/A Indústria e Comércio, 1994. 143p.

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

MATSUMOTO, H.; MA, W.-G.; DAIKOKU, T.; ZHAO, X.; PARIA, B. C.; DAS, S.K.; TRZASKOS, J.M.; DEY, S.K. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 32, p. 29260–29267, 2002.

MAZZONELLI, J.M.; LED, J.E. **Técnica y construcción de incubadoras**. Buenos Aires: Editorial Hobby, C. e I., 1960. 139 p.

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

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

MEYER, R.D.; SACKS, D.B.; RAHIMI, N. IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. **Public Library of Science One**. v. 3, n.12, p.1-11, 2008.

MÖLLER, B.; RASMUSSEN, C.; LINDBLOM, B.; OLOVSSON, M. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**. v.7, n.1, p. 65 – 72, 2001.

MORESCHI JR., D.; FAGUNDES, D.J.; AMADO, L. E. B.; HERNANDES, L.; MORESCHI, H. K. Efeitos da prostaglandina E1 (PGE1) na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos: estudo histológico. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.6, n.4, p.316-324, 2007.

MUCCI, L. A.; STARK, J. R.; FIGG, W. D.; SCHUMACHER, F.; LI, H.; ABE, M.; HENNESSY, K.; STAMPFER, M. J.; GAZIANO, J. M.; MA, J.; KANTOFF, P.W. Polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, and prostate cancer risk and survival: A prospective study. **International Journal Cancer**. v.125, p.1143–1146, 2009.

NAKAYAMA, T.; HATACHI, G.; WEN, C.-Y.; YOSHIZAKI, A.; YAMAZUMI, K.; NIINO, D.; SEKINE, I. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. **World Journal of Gastroenterology**. v.11, n.7, p.964-969, 2005.

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

NISHIWAKI, Y.; YOSHIDA, M.; IWAGURO, H.; MASUDA, H.; NITTA, N.; ASAHARA, T.; ISOBE, M. Endothelial e-selectin potentiates neovascularization via endothelial

progenitor cell-dependent and-independent mechanisms. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.27, p.512-518, 2007.

NOGUCHI, R.; YOSHIJI, H.; KURIYAMA, S.; YOSHII, J.; IKENAKA, Y.; YANASE, K.; NAMISAKI, T.; KITADE, M.; YAMAZAKI, M.; MITORO, A.; TSUJINOUE, H.; IMAZU, H.; MASAKI, T.; FUKUI, H. Combination of interferon- $\beta$  and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma. **Development and Angiogenesis**. v. 9, p.6038–6045, 2003.

NOREN, N.K.; LU, M.; FREEMAN, A. L.; KOOLPE, M.; PASQUALE, E.B. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101, n. 15, p.5583–5588, 2004.

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

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

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

OLSEN, M.W.B.; LEY, C.D.; JUNKER, N.; HANSENY, A.J.; LUND, E.L.; KRISTJANSEN, P.E.G. Angiopoietin-4 inhibits angiogenesis and reduces interstitial fluid pressure. **Neoplasia**. v. 8, n. 5, p. 364 – 372, 2006.

ONGUSAHA, P. P.; KWAK, J.C.; ZWIBLE, A.J.; MACIP, S.; HIGASHIYAMA, S.; TANIGUCHI, N.; FANG, L.; LEE, S.W. HB-EGF is a potent inducer of tumor growth and angiogenesis. **Cancer Research**. v.64, p.5283–5290, 2004.

PANG, I.-H.; ZENG, H.; FLEENOR, D. L.; CLARK, A. F. Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. **BMC Neuroscience**. v.8, p.1-11, 2007.

PARSONS-WINGERTER, P.; Lwai, B.; Yang, M.C.; Elliott, K.E.; Milaninia, A.; Redlitz, A.; Clark, J.I.; Sage, E.H.. A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: Stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. **Microvascular Research**. v. 55, p.201-214, 1998.

PELLISSARI, D.M.; BARBIERI, F.E.; WÜNSCH FILHO, V. Magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children: a systematic review of case-control studies. **Caderno de Saúde Pública**. v.25, n.3, p.441-5452, 2009.

PENG, L.; SUN, J.; WANG, W.; JIAN, Z.; OU, J. Biological effect of ectopic expression of angiopoietin-1 and -2 in hepatocellular carcinoma cell line. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**. v.2, n.1 , p.94-97, 2003.

PERSANO, L.; MOSERLE, L.; ESPOSITO, G.; BRONTE, V.; BARBIERI, V.; IAFRATE, M.; GARDIMAN, M.P.; LARGHERO, P.; PFEFFER, U.; NASCHBERGER, E.; STÜRZL, M.; INDRACCOLO, S.; AMADORI, A. Interferon- $\alpha$  counteracts the angiogenic switch and reduces tumor cell proliferation in a spontaneous model of prostatic cancer. **Carcinogenesis**. v.30, n.5, p.851–860, 2009.

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

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

RAYMOND, M.-A.; DÉSORMEAUX, A.; LAPLANTE, P.; VIGNEAULT, N.; FILEP J. G.; LANDRY, K.; PSHEZHETSKY, A. V.; HÉBERT, M.-J. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. **The FASEB Journal**. v. 18, p. 705-707, 2004.

REGEL, S.J.; TINGUELY, G.; SCHUDERER, J.; ADAM, M.; KUSTER, N.; LANDOLT, H.-P. ACHERMANN, P. Pulsed radio-frequency electromagnetic fields: dose dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive performance. **Journal of Sleep Research**. v.16, p. 253–258, 2007.

REIZIS, A.; HAMMEL I.; AR A. Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in the chick embryo chorioallantoic membrane. **The Journal of Experimental Biology**. v.208, p.2483-2488, 2005.

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

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

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

SAHNI, A.; KHORANA, A.A.; BAGGS, R.B.; PENG, H.; FRANCIS, C.W. FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. **Blood**. v.107, n.1, p.126-131, 2006.

SALVEN, P.; HATTORI, K.; HEISSIG, B.; RAFII, S. Interleukin-1 promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion<sup>1</sup>. **The FASEB Journal**. v.16, p.1471-1473, 2002.

SCHIRMER, S.H.; FLEDDERUS, J.O.; BOT, P.T.G.; MOERLAND, P.D.; HOEFER, I.E.; BAAN JR, J.; HENRIQUES, J.P.S.; SCHAAF, R.J.; VIS, M.M.; HORREVOETS, A.J.G.; PIEK, J.J.; ROYEN, N. Interferon- signaling is enhanced in patients with insufficient coronary collateral artery development and inhibits arteriogenesis in mice. **Circular Research**. v.102, p.1286-1294, 2008.

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

SCHULZE, M.M.; HUTCHINGS, N.; SIMPSON, T.L. The use of fractal analysis and photometry to estimate the accuracy of bulbar redness grading scales. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v.49, n.4. p.1398–1406, 2008.

SCHÜZ, J.; BÖHLER, E.; SCHLEHOFER, B.; BERG, G.; SCHLAEFER, K.; HETTINGER, I.; KUNNA-GRASS, K.; WAHRENDORFC, J.; BLETTNER, M. Radiofrequency electromagnetic fields emitted from base stations of dect cordless phones and the risk of glioma and meningioma (Interphone Study Group, Germany). **Radiation Research**. v.166, p.116–119, 2006.

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

SENEGAGLIA A.C.; REBELATTO, C.L.K.; SUSS, P.H.; BROFMAN, P.R.S. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.31, p.9-14, 2009.

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

SHUPAK, N. Therapeutic uses of pulsed magnetic-field exposure: a review. **The Radio Science Bulletin**. n.307, p.9-32, 2003.

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

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

STRZALKA-MROZIK, B.; STANIK-WALENTEK, A.; KAPRAL, M.; KOWALCZYK, M.; ADAMSKA, J.; GOLA, J.; MAZUREK, U. Differential expression of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in bullous keratopathy corneas. **Molecular Vision**. v.16, p.161-166, 2010.

SULLIVAN, R.; HOLDEN, T.; TREMBERGER JR, G.; CHEUNG, E.; BRANCH, C.; BURRERO, J.; SURPRIS, G.; QUINTANA, S.; RAMEAU, A.; GADURA, N.; YAO, H.; SUBRAMANIAM, R.; SCHNEIDER, P.; ROTENBERG, S. A.; MARCHESE, P.; FLAMHLOLZ, A.; LIEBERMAN, D.; CHEUNG, T. Fractal dimension of breast cancer cell migration in a wound healing assay. **International Journal of Biological And Life Sciences**. v.6, n.3, p.170-175, 2010.

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

SYLVESTER, P.W.; SHAH, S.J.; HAYNIE, D.T.; BRISKI, K.P. Effects of ultra-wideband electromagnetic pulses on pre-neoplastic mammary epithelial cell proliferation. **Cell Proliferation**. v.38, p.153–163, 2005.

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

TAIT C.R; JONES. P.F. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. **Journal of Pathology**. v.204, p.1–10, 2004.

TAKEBAYASHI, T.; VARSIER, N.; KIKUCHI, Y.; WAKE, K.; TAKI, M.; WATANABE, S.; AKIBA S.; YAMAGUCHI, N. Mobile phone use, exposure to radiofrequency electromagnetic field, and brain tumour: a case–control study. **British Journal of Cancer**. v.98, n.3, p.652 – 659, 2008.

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

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

TENUZZO, B.; VERGALLO, C.; DINI, L. Effect of 6mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and in vitro aged human lymphocytes. **Tissue and Cell**. v.41, p.169–179, 2009.

TESAR, D.B.; CHEUNG, E.J.; BJORKMAN, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**. v.19, p.1587-1593, 2008.

VIANALE, G.; REALE, M.; AMERIO, P.; STEFANACHI, M.; DI LUZIO S.; MURARO, R. Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production. **British Journal of Dermatology**. v.158, p.1189–1196, 2008.

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

WALLECZEK, J. Electromagnetic fields effects on cells of the immune system: the role of the calcium signaling<sup>1</sup>. **The Faseb Journal**. v.6, p.3177-3185, 1992.

WALMSLEY, M.; CLEAVER, D.; PATIENT, R. Fibroblast growth factor controls the timing of Scl, Lmo2, and Runx1 expression during embryonic blood development. **Blood**. v.111, n. 3, p.1157-1166, 2008.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, n. 2, p.415–416, 2004.

WANG, Z.; SARJE, A.; CHE, P.-L.; YAREMA, K.J. Moderate strength (0.23–0.28 T) static magnetic fields (SMF) modulate signaling and differentiation in human embryonic cells. **BMC Genomics**. v.10, n.356, p.1-23, 2009.

WIGMORE, S.J. Endostatin in the pancreas. **British Journal of Cancer**. v.92, p.5–6, 2005.

WILLIAMS, T.A.; VERHOVEZ, A.; MILAN, A.; VEGLIO, F.; MULATERO, P. Protective effect of spironolactone on endothelial cell apoptosis. **Endocrinology**. v.147, n.5, p.2496–2505, 2006.

WILTING, J.; EICHMANN, A.; CHRIST, B. Expression of the avian VEGF receptor homologues Quek1 and Quek2 in blood-vascular and lymphatic endothelial and non-endothelial cells during quail embryonic development. **Cell Tissue Research**. v.288, p.207-223, 1997.

WOLF, M.; HAENSSE, D.; MORREN, G.; Froehlich, J. Do GSM 900MHz signals affect cerebral blood circulation? A near-infrared spectrophotometry study. **Optics Express**. v. 14, n. 13, p.6128 – 6141, 2006.

XU, Y.; LIU, Y.-J.; YU, Q. Angiopoietin-3 inhibits pulmonary metastasis by inhibiting tumor angiogenesis. **Cancer Research**. v.64, p.6119–6126, 2004.

YAMANE, K.; IHN, H.; ASANO, Y.; JINNIN, M.; TAMAKI, K. Antagonistic effects of TNF- $\alpha$  on TGF- $\beta$  signaling through down-regulation of TGF- $\beta$  receptor type II in human dermal fibroblasts<sup>1</sup>. **Journal of Immunology**. v.171, p.3855-3862, 2003.

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

YAO, L.; PIKE, S.E.; SETSUDA, J.; PAREKH, J.; GUPTA, G.; RAFFELD, M.; JAFFE, E.S.; TOSATO, G. Effective targeting of tumor vasculature by the angiogenesis inhibitors vasostatin and interleukin-12. **Blood**. v.96, p.1900-1905, 2000.

YOSHIOKA, N.; WANG, L.; KISHIMOTO, K.; TSUJI, T.; HU, G.-F. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.103, n.39, p.14519–14524, 2006.

ZHANG, H.; GAO, X.; WENG, C.; XU, Z. Interaction between angiogenin and fibulin 1: evidence and implication. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. v.40, n.5, p.375-380, 2008.

## CAPÍTULO II

Artigo submetido à revista Bioelectromagnetics

**Análise fractal da vascularização extraembrionária de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a um campo eletromagnético de baixa frequência.**

**Edbhergue Ventura Lola Costa<sup>1</sup>, George Chaves Jimenez<sup>2</sup>, Catão Temístocles de Freitas Barbosa<sup>3</sup> and Romildo Albuquerque Nogueira<sup>4</sup>**

<sup>1, 2, 3, 4</sup> Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC),  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Título corrido: Campo eletromagnético em vascularização.

Grande patrocinador: Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;  
Facepe – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

**Autor correspondente** R.A. Nogueira: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco,  
Brazil, Email: ran.pe@terra.

## Resumo

Campos eletromagnéticos (CEM's) podem alterar o comportamento dinâmico da vascularização sanguínea e pode ter um efeito estimulante ou inibitório sobre o desenvolvimento dos vasos sanguíneos. A geometria fractal tem sido usada em vários estudos como uma ferramenta possível de descrever o desenvolvimento da rede vascular arterial. Neste trabalho a dimensão fractal foi calculada pelo método de contagem por caixa ( $D_{bc}$ ) e dimensão de informação ( $D_{inf}$ ) para avaliar o desenvolvimento dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóide (MCA) de embriões de codorna após a exposição a CEM's, com densidade de fluxo magnético de 1 MT e frequência de 60 Hz. Os resultados mostraram que a exposição ao campo eletromagnético (CEM), em intervalos entre 48 e 72 horas de incubação inibiu o crescimento da rede vascular da MCA de codorna se aplicado no intervalo de seis horas por dia (três sessões de duas horas) e 9 horas por dia (três sessões de 3 horas diárias). No entanto, o CEM aplicado em intervalos menores de 6 e maiores de 9 horas não afetou a vasculogênese e angiogênese da rede vascular da MCA de codornas, assim como a exposição aos CEM entre 72 e 96 horas de incubação.

Palavras-chave: vasculogênese, angiogênese, membrana corioalantóide, dimensão fractal, campo eletromagnético.

## Introdução

O estudo da distribuição do fluxo sanguíneo através da microvasculatura é de extrema importância na compreensão dos mecanismos envolvidos na regeneração de tecidos, no controle da dor, em distúrbios circulatórios locais e muitos outros processos em condições normais ou patológicas dos organismos e tem sido mostrado que CEM's podem alterar esses processos [Bassett, 1993; Shupak, 2003; McKay et al., 2007]. Balanezhad et al. [2010] mostraram que um CEM de 40 mT e 50 Hz pode inibir a angiogênese em MCA de embrião de galinha, parametrizado pelos autores através da redução significativa no número e no comprimento dos vasos sanguíneos. Por outro lado, CEM's pulsados são capazes de induzir angiogênese e vasodilatação na região gluteofemoral de coelhos [Ishida et al., 2008]. Li et al. [2007] observaram que os campos magnéticos estáticos de 1 e 10 mT impediram o crescimento de células endoteliais, enquanto que o campo magnético de 0.1 mT não influenciou na proliferação dessas células. O campo magnético de 10 mT induziu a apoptose e necrose das células endoteliais e promoveu o aumento da expressão de VCAM-1 (molécula de adesão de célula vascular) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular).

Tanto a intensidade e frequência como tempo de exposição são fatores que estão envolvidos nos diferentes efeitos do CEM nos vasos sanguíneos [Balanezhad et al., 2010]. Esses efeitos no processo de formação dos vasos sanguíneos podem ser estimulatórios (proangiogênicos) sobre alguns modelos biológicos de estudos da angiogênese ou inibitórios (antiangiogênicos) sobre outros. Firmando, assim, uma discrepância nas verdadeiras ações do CEM sobre o sistema vascular. Portanto, os efeitos de CEM sobre a microvasculatura não está perfeitamente elucidado nos trabalhos atuais e os poucos dados existentes carregam contradições sobre suas ações. No entanto, é um fato bem estabelecido que os CEM's podem modificar estruturas biológicas e moléculas envolvidas nos processos de sinalização,

podendo, desta forma, causar alterações funcionais em diversos tipos de células incluindo as células endoteliais [Frey, 1993; Ruggiero et al., 2004].

O sistema vascular sanguíneo é uma rede complexa de estruturas tubulares ramificadas e de tamanhos diferentes que estão irregularmente distribuídas nos diversos tecidos que constituem os órgãos. Podendo ser considerado um objeto fractal devido a sua auto-similaridade, irregularidade, dimensão fracionária e dependência de uma escala de observação [Grizzi et al., 2005]. A dimensão fractal pode representar um parâmetro rápido de ser obtido e confiável para avaliação da angiogênese, servindo assim para o diagnóstico vascular e outros diagnósticos que dependam da rede vascular, como o monitoramento da eficácia no tratamento anti-angiogênico tumoral, terapias anti-proliferativas nas síndromes auto-imunes, retinopatias e para análise do desenvolvimento tumoral [Mancardi et al., 2008].

No estudo com MCA de embriões de galinha, Vico et al. [1998] demonstraram que a dimensão fractal da rede vascular da MCA a partir das 100 horas de crescimento atinge um valor em torno de  $D=1.7$ , correspondendo a uma estabilização da arquitetura vascular. Parsons-Wingertter et al. [1998] calcularam a dimensão fractal da rede vascular da MCA de embriões de codorna obtendo um valor de 1.49 para o nono dia de vida do embrião. Estes autores avaliaram através da dimensão fractal que houve aumento da rede vascular das membranas corioalantóides (MCA's) tratadas com o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e quando tratadas com angiostatina resultou em uma dimensão fractal de baixo valor para rede vascular, confirmando o efeito inibidor da angiostatina sobre a vascularização.

No presente trabalho pretende-se avaliar, utilizando a dimensão fractal, a ação do campo eletromagnético de 1 mT e 60 Hz, sobre a rede vascular da membrana corioalantóide de embriões de codorna japonesa (*Coturnix japonica*).

## **Materiais e métodos**

### *Incubação e preparação das amostras*

Foram fornecidos no total, em tempos distintos, 120 ovos de codorna (*Coturnix japonica*) pela Estação Experimental de Pequenos Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no município de Carpina. Os ovos foram incubados a temperatura de 37,5°C e umidade relativa de 60%, em incubadora desenvolvida no Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC) da UFRPE. A incubadora é adaptada para facilitar a aplicação de CEM através de uma bobina de Helmholtz (Phywe/ Germany). Os ovos foram abertos no segundo dia através de janelas de aproximadamente 3 cm<sup>2</sup> e cobertos com filme PVC (cloreto de polivinila) após a remoção em média de 2,5 ml de albúmen. Os ovos foram expostos ao CEM quando completaram 48 horas de incubação. O período de estudo correspondeu a 72 e 96 horas de incubação.

### *Formação dos grupos e exposições ao CEM*

Foram formados 6 grupos contendo cada um 20 ovos, totalizando 120 ovos. O procedimento de exposição dos ovos ao CEM foi realizado conforme a tabela 1 e as observações foram realizadas em 72 e 96 horas de incubação.

## **Tabela 1**

### *Captura de imagens e segmentação*

As redes vasculares da MCA foram fotografadas com uma câmara digital Sony Cyber-shot DSC W-130 (8.1 megapixels). As imagens foram realizadas enquadrando-se a janela de acesso à MCA, tomando-se como referência o eixo menor do ovo, que variou de 2,39 a 2,62 cm de acordo com os tamanhos dos ovos. As imagens digitalizadas (1920x1080 pixels) foram segmentadas, a segmentação consiste em separar os vasos sanguíneos do restante das imagens. Esta segmentação foi realizada manualmente por meio do programa Microsoft® Paint, de forma esqueletizada, onde os vasos foram traçados com a largura de 1 pixel independente do seu calibre. Em seguida as imagens foram binarizadas (fundo de imagem em preto e vasos em branco) por meio do programa Microsoft® Paint. Este procedimento foi realizado visando-se o uso do programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System que foi utilizado para calcular as dimensões fractais das imagens dos vasos sanguíneos e que opera com a imagem no formato monocromático.

### *Análise fractal*

O Benoit™ versão 1.3 Fractal Analysis System é um software capaz de realizar o cálculo da dimensão fractal através de alguns métodos dentre eles a dimensão de contagem por caixa também conhecida como dimensão de box-counting ( $D_{bc}$ ) e a dimensão de informação ( $D_{inf}$ ).

A  $D_{bc}$  é obtida cobrindo-se o objeto fractal com  $N(r)$  caixas que contenham pelo menos um ponto do objeto fractal. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de  $N(r)$  em função dos lados das caixas  $r$  [Kunicki

et al., 2009]. A inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de contagem por caixas, que pode ser definida, formalmente através da seguinte expressão:

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

A  $D_{inf}$  é um método capaz de caracterizar estrutura de fractais não homogêneos em sua invariância de escala, neste caso o objeto também é coberto por caixas, porém leva-se em conta a probabilidade relativa de ocupação das caixas elementares usadas para cobrir o objeto fractal, ou seja, a dimensão vai depender da frequência com que cada caixa é visitada. Sendo definida pela seguinte expressão:

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

Onde  $S(r) = - \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log(m_i)$  é denominada de entropia de Kolmogorov.  $N$  é o número de caixas,  $m_i = M_i/M$ , sendo  $M_i$  o número de pontos na  $i$ -ésima caixa e  $M$  é o número total de pontos do objeto fractal [Kunick et al., 2009].

O cálculo do  $D_{bc}$  por meio do programa Benoit<sup>TM</sup> 1.3 Fractal Analysis System foi realizado com 22 conjuntos de caixas de diferentes tamanhos, o comprimento do lado da maior caixa foi 270 pixels e o coeficiente de redução dos tamanhos da caixa foi 1,3. Para os cálculos dos  $D_{inf}$  foram utilizados 9 conjuntos de caixas de tamanhos diferentes, o comprimento do lado da maior caixa foi de 270 pixels e o coeficiente de redução do tamanho da caixa foi de 2,0.

### *Análise estatística*

Após o cálculo para obter a dimensão fractal de cada rede vascular da MCA, as diferenças entre os grupos experimentais foram avaliadas através do teste de Kruskal -Wallis, com o teste de pos-hoc de Dunn, pois as amostras não seguiram uma distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro – Wilk assim foi adotado um teste não-paramétrico mais adequado para comparar os 6 grupos de amostras independentes.

### **Resultados**

A Figura 1 mostra a rede vascular da MCA do embrião de codorna de 72 horas de incubação e sua correspondente imagem esqueletizada para o grupo controle e o grupo exposto ao CEM por seis horas. Pela inspeção visual é impossível distinguir as diferentes imagens das MCA's. A segmentação das imagens também não permitiu que possíveis diferenças pudessem ser visualmente observadas. Portanto, é necessário o uso de uma ferramenta mais fina que possa realmente quantificar pequenas diferenças, tanto no desenvolvimento da árvore vascular em suas diferentes fases de crescimento como as possíveis modificações no seu desenvolvimento em decorrência de efeitos de CEM's.

### **Figura 1**

Na tabela 2, pode-se observar que os grupos apresentaram amostras de diferentes tamanhos, isto ocorreu tanto devido à morte dos embriões no decorrer da incubação quanto à presença de ovos não fertilizados. Estes grupos foram comparados de acordo com as seguintes

categorias, os valores de  $D_{bc}$  para 72 horas,  $D_{bc}$  para 96 horas,  $D_{inf}$  para 72 horas e  $D_{inf}$  para 96 horas. Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e pos-hoc de Dunn, mostraram que os grupos 1, 4 e 5 em 72 horas de incubação não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle para os dois tipos de dimensões utilizadas ( $D_{bc}$  e  $D_{inf}$ ). Ao contrário os valores de  $D_{bc}$  dos grupos 2 e 3 e os valores de  $D_{inf}$  do grupo 2, apresentaram diferenças significativas pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ). Os valores de  $D_{inf}$  do grupo 3 não diferiu significativamente do controle. Após 96 horas de incubação, nenhum dos grupos apresentou diferença estatística na dimensão fractal em relação ao controle, tanto para o método de  $D_{bc}$  ( $p = 0,095$ ) como para o método de  $D_{inf}$  ( $p = 0,067$ ).

## **Tabela 2**

## **Discussão**

A análise fractal tem se mostrado uma técnica objetiva para detectar modificações em diversos sistemas biológicos [Schulze et al., 2008]. Vários estudos têm utilizado a geometria fractal como um instrumento adequado capaz de descrever a evolução da vascularização sanguínea em vários modelos animais. Um desses modelos é a MCA do embrião de galinha e de codorna que permite o estudo do desenvolvimento da rede vascular numa estrutura basicamente bi-dimensional e que pode facilitar a compreensão dos processos de sinalização e as interações celulares que estão envolvidas na vasculogênese e angiogênese [Risau,1997]. O método de  $D_{bc}$  tem sido utilizado por Kirchner et al. [1996] para quantificar o comportamento da angiogênese a partir de imagens de MCA's normais e com enxertos tumorais. Esta forma de análise morfométrica foi utilizada na avaliação dos efeitos de moléculas indutoras ou

inibidoras da angiogênese, relatados nos trabalhos de Parsons-Wingerter et al. [1998, 2000] e Výmboh et al. [2010]. O método de  $D_{bc}$  também tem sido usado para mensurar outras estruturas ou mesmo microorganismos, como o trabalho realizado por Golinski et al. [2008] no qual utilizaram o método fractal para avaliação do crescimento de colônias de fungos infectadas por micovírus. O método de  $D_{inf}$  é outra forma de se obter a dimensão fractal, é um método que faz inferência com base na probabilidade de ocupação das caixas usadas para cobrir o objeto fractal, permitindo uma mensuração de maior precisão do objeto fractal [Kunick et al., 2008].

Vários estudos tem focado o comportamento da dinâmica dos vasos sanguíneos sob a atuação de CEM, estimulando [Roland et al., 1999; Ishida et al., 2008] ou inibindo a angiogênese [Cameron et al., 2005], estimulando a vasculogênese [Bekhite et al., 2010] e a arteriogênese [Okano et al., 2008]. Outros efeitos dos CEM's são vasoconstricção, vasodilatação [McKay et al., 2007], inibição da proliferação e apoptose das células endoteliais vasculares [Li et al., 2007].

No presente trabalho procurou-se compreender a dinâmica de formação da rede vascular sob efeito de CEM extremamente de baixa frequência (60 Hz) e densidade de fluxo magnético de 1 mT. As alterações na vascularização foram estimadas através do cálculo da dimensão fractal pelos métodos de contagem por caixa ( $D_{box}$ ) e dimensão de informação ( $D_{inf}$ ). As dimensões fractais da rede vascular das MCA's mostram que CEM's podem interferir no processo de vasculogênese e angiogênese extra-embrionária quando os ovos foram expostos durante 2 horas e 3 horas por sessão de exposição (6 e 9 horas por dia). Nesta condição experimental os CEM's inibiram o processo de formação vascular extra-embrionária nas primeiras 24 horas de exposição (72 horas de crescimento vascular). Os valores encontrados para  $D_{bc}$  (grupo 2 e 3) e  $D_{inf}$  (grupo 2) em relação ao grupo controle nas 72 horas

do desenvolvimento vascular é mostrado na tabela 2. O fato do valor da  $D_{inf}$  do grupo 3 não apresentar uma diferença estatística em relação ao controle pode ser explicada pela sensibilidade do método quando comparada ao método de contagem por caixas. Nas 24 horas seguintes de exposição ao campo (96 horas de crescimento vascular) nenhum grupo apresentou diferença estatística entre as dimensões fractais. Isso sugere que depois das 24 horas de exposição ou o CEM passou estimular a formação dos vasos ou que, é mais provável, passou a não ter efeito sobre a rede vascular da MCA.

Alguns trabalhos têm estudado o processo angiogênico em resposta a aplicação de CEM's em diferentes modelos experimentais. Balanezhad e colaboradores [2010] utilizando um CEM sinusoidal de 40 mT em ovos de galinha concluíram que houve um efeito antiangiogênico da rede vascular, pois houve uma redução significativa do número e dos comprimentos dos vasos sanguíneos das MCA's expostas ao CEM. Wang *et al.*, 2009 utilizando três modelos experimentais (cultura de HUVECs - células endoteliais de veias umbilicais humanas, câmara de matrigel em ratos, CAM) observaram um efeito inibitório sobre a angiogênese devido a um menor número de vasos e bifurcações das MCA's de galinha expostas ao campo magnético estático (0.2 – 0.4T) durante 2, 7 e 9 dias. Ruggiero et al. [2004], implantando esponjas contendo estimuladores angiogênicos (PGE-1 e soro fetal bovino) em ovos de galinha, expostos a um campo magnético de 0.2 T detectaram a inibição da angiogênese da rede vascular da MCA, porém ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, eles não observaram alteração da vasculogênese. A justificativa para esta discrepância pode estar relacionada às condições impostas no experimento, diferença no tempo de exposição e na densidade de fluxo magnético podem ter contribuído para os diferentes resultados obtidos. É importante observar que Ruggiero et al. [2004] submeteram os ovos ao CEM no décimo primeiro dia de incubação, uma fase em que a MCA do embrião de galinha já está quase formada e com a vascularização bem estável [Dimitropoulou et al.,

1998; Borges et al., 2003; Cimpean et al., 2008; Gabrielli; Accill, 2010] enquanto em nosso trabalho o CEM foi aplicado quando os ovos completaram 48 horas de incubação. Portanto, a discrepância entre os nossos resultados e os obtidos por Ruggiero et al. [2004] pode ser explicada também devido aos diferentes estágios de formação da MCA.

Trabalhos sugerem que o CEM pode atuar nos mecanismos mais conhecidos no processo de vasculogênese e angiogênese, ou seja, sobre os fatores de crescimento como o VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , interleucina 6. Promovendo a inibição ou o aumento da expressão desses fatores, dependendo da frequência e do tempo de exposição ao CEM [Tepper et al., 2004; Ruggiero et al., 2004; Okano et al., 2008; Wang et al., 2009]. Uma vez que o CEM esteja inibindo a expressão desses fatores pro-angiogênicos, como VEGF e bFGF, importantes para sobrevivência dos vasos sanguíneos, provavelmente houve não apenas um retardo do desenvolvimento vascular mas a indução de apoptose da células vasculares [Alavi *et al.*, 2003].

A aplicação do CEM em 3 sessões de 1 hora não foi suficiente para promover uma alteração na formação da rede vascular. Entretanto, os resultados evidenciaram a presença de efeito janela, ou seja nenhum efeito foi observado quando CEM foram aplicados em 3 sessões de 4 e 8 horas; contudo aplicações de CEM por 6 e 9 horas inibiram a vasculogênese e angiogênese. Este tipo de efeito janela já foi observado por *Calotã et al.* [2005] no trabalho com soro humano submetido aos CEMs, porém este fenômeno ainda não é bem esclarecido. Este efeito pode ser decorrente das células endoteliais, além de outras células responsáveis pela síntese e liberação de fatores de crescimento, como de outras estruturas responsáveis pelo mecanismo de formação dos vasos sanguíneos se adaptarem as condições de CEM, passando a não apresentar mais as influências da ação do CEM sobre elas.

## Conclusão

Em conclusão este estudo sugere que o campo eletromagnético de 1 mT e 60 Hz quando aplicado entre 48 e 72 horas de incubação, inibiu a angiogênese e vasculogênese na membrana corioalantóide de embriões de codorna se aplicado em sessões de 2 horas (6 horas por dia) e 3 horas (9 horas diárias). No entanto, o campo eletromagnético não influenciou a vascularização da membrana corioalantóide de codorna, se aplicado em 3 sessões de 1 (3 horas diárias), 4 (12 horas diárias) e 8 horas (24 horas). Aplicação do campo eletromagnético de 72 até 96 horas de incubação, não inibiu vasculogênese e angiogênese da rede vascular da membrana corioalantóide de codorna, independentemente do tempo de exposição.

## Referência Bibliografia

- Alavi A, Hood JD, Frausto R, Stupack DG, Cheresch DA. 2003. Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science* 301:94-96.
- Balanezhad SZ, Parivar K, Baharara J, Kouchesfehiani HM, Ashraf A. 2010. The effect of extremely low frequency electromagnetic field on angiogenesis. *Res J Environ Sci* 4:300-304.
- Bassett CA L. 1993. Effects of electromagnetic fields. *J cell Biochem* 51:387-393.
- Bekhite MM, Finkensieper A, Abou-Zaid FA, El-Shourbagy IK, Omar KM, Figulla H-R, Sauer H, Wartenberg M. 2010. Static electromagnetic fields induce vasculogenesis and chondro-osteogenesis of mouse embryonic stem cells by reactive oxygen species-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Stem cells and development* 19:731-743.
- Calotă V, Drăgoiu S, Meghea A, Giurgincă M. 2005. The influence of 50hz magnetic field exposure to the human serum. *Romanian J. Biophys* 15:99-104.
- Cameron IL, Sun L-Z, Short N, Hardman WE, Williams CD. 2005. Therapeutic electromagnetic field (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Cell Int* [Internet]. [cited 2010 june 01]; 5:23. Available from: <http://www.cancerci.com/content/5/1/23>.
- Cimpean AM, Ribatti D, Raica M. 2008. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis* 11:311-319.

- Dinmitropoulou C, Malkusch W, Fait K E, Maragoudakis ME, Konerding M A. 1998. The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. *Angiogenesis* 2:255 – 263.
- Frey AH. 1993. Electromagnetic field interactions with biological systems. *The FASEB J* 7:272-281.
- Gabrielli MG, Accili D. 2010. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. *J Biomed Biotechnol* 2010:1-12.
- Golinski MR, Boecklen WJ, Dawe AL, 2008. Two-dimensional fractal growth properties of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*: the effects of hypovirus infection. *J Basic Microbiol* 48:426–429.
- Grizzi F, Russo C, Colombo P, Franceschini B, Frezza EE, Cobos E, Chiriva-Internati M. 2005. Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. *BMC Cancer* [Internet]. [cited 2010 June 01]; 5:14. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/5/14>.
- Ishida M, Fujioka M, Takahashi KA, Arai Y, Kubo T. 2008. Electromagnetic fields a novel prophylaxis for steroid-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res* 466:1068–1073.
- Kirchner L M, Schmidt SP, Gruber BS. 1996. Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. *Microvasc Res* 54:2 -14.
- Kunicki, ACB, Araújo LS, Sá FB, Stosic B, Barbosa CTF, Nogueira, 2008. A fractal analysis of retinal vessel patterns in ophthalmically normal dogs. *Vet Ophthalmol* 11:2-6.
- Kunicki ACB, Oliveira AJ, Mendonça MBM, Barbosa CTF, Nogueira RA. 2009. Can the fractal dimension be applied for the early diagnosis of non-proliferative diabetic retinopathy? *Braz J Med Biol Res* 42:930-934.
- Li F, Xu K-W, Wang H-C, Guo W-Y, Han Y, Liu B, Zhang R-Q. 2007. Effects of static magnetic field on human umbilical vessel endothelial cell. *J Med Coll PLA* 22:106-110.
- Mancardi D, Varetto G, Bucci E, Maniero F, Guiot C. 2008. Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. *Theor Biol Med Modeling* [Internet]. [cited 2010 June 01]; 5:12. Available from: <http://www.tbiomed.com/content/5/1/12>.
- McKay JC, Prato FS, Thomas AW. 2007. A Literature Review: The effects of magnetic field exposure on blood flow and blood vessels in the microvasculature. *Bioelectromagnetics* 28:81–98.
- Okano H, Tomita N, Ikada Y. 2008. Spatial gradient effects of 120mT static magnetic field on endothelial tubular formation in vitro. *Bioelectromagnetics* 29:233-236.
- Parsons-Wingenter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, Clark JI, Sage, E.H. 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* 55:201-214.

Parsons-Wingenter P, Elliott KE, Clark JI, Farr AG. 2000. Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1250-1256.

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

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

Rugiero M, Bottaro DP, Liguri G, Gulisano M, Peruzzi B, Pacini S. 2004. 0.2T Magnetic field inhibits angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Bioelectromagnetics* 25(5):390-396.

Schulze MM, Hutchings N, Simpson TL. 2008. The use of fractal analysis and photometry to estimate the accuracy of bulbar redness grading scales. *IOVS* 49:1398–1406.

Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. 2003. Therapeutic uses of pulsed magnetic field exposure: A review. *Radio Sci Bull* 307:9-32.

Tepper OM, Callaghan M J, Chang EI, Galiano RD, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hopper RA, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *FASEB J* 18:1231-33.

Vico PG, Kyriacos S, Heymans O, Louryan S, Cartilier L. 1998. Dynamic study of the extraembryonic vascular network of the chick embryo by fractal analysis. *J Theor Biol* 95:525-532.

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

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

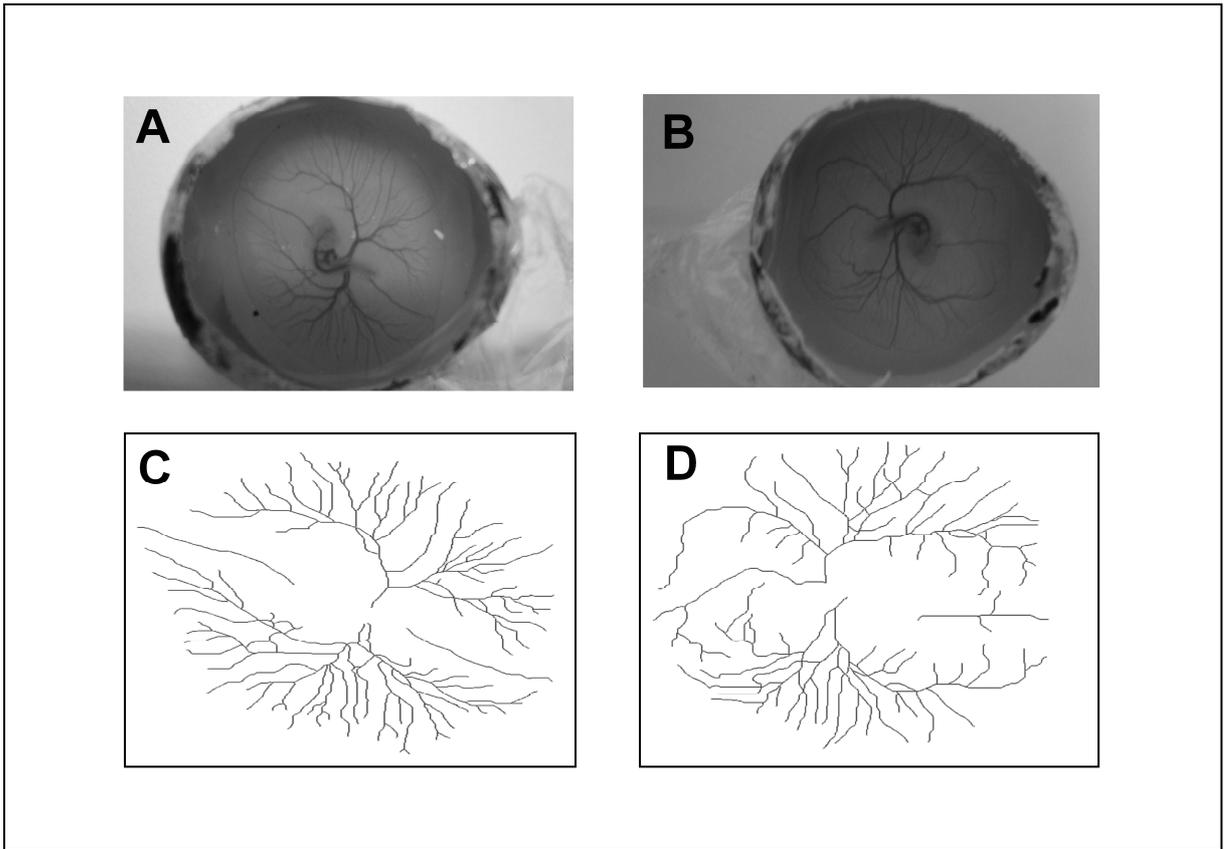
**Tabela 1. Grupo experimental relacionado à exposição de CEM**

Grupos	Número de Indivíduos	Tempo de exposição ao CEM (horas)	Intervalo entre as exposições (horas)	Tempo total de exposição ao CEM por dia
Controle	20	-----	-----	-----
Grupo 1	20	1 hora	7 horas	3 horas
Grupo 2	20	2 horas	6 horas	6 horas
Grupo 3	20	3 horas	5 horas	9 horas
Grupo 4	20	4 horas	4 horas	12 horas
Grupo 5	20	24 horas	-----	24 horas

**Tabela 2. Média e desvio padrão das DFs dos grupos experimentais por período de incubação**

Período de incubação		72 horas		96 horas		
Grupos	n	D <sub>bc</sub>	D <sub>inf</sub>	n	D <sub>bc</sub>	D <sub>inf</sub>
Controle	7	1,26±0,04	1,30±0,036	6	1,29±0,032	1,32±0,032
Grupo 1	6	1,22±0,042	1,26±0,040	4	1,25±0,025	1,29±0,022
Grupo 2	7	*1,19±0,025	*1,23±0,026	5	1,25±0,05	1,29±0,042
Grupo 3	14	*1,20±0,045	1,24±0,041	8	1,28±0,027	1,31±0,024
Grupo 4	10	1,26±0,037	1,30±0,035	7	1,30±0,03	1,33±0,027
Grupo 5	15	1,22±0,028	1,26±0,029	13	1,29±0,030	1,33±0,030

\* p<0.05, apresentando diferença significativa



**Figura 1.** Redes vasculares sanguíneas da MCA e correspondentes imagens esqueletizada (imagem de fundo em branco e vasos em preto). Rede vascular da MCA do embrião de codorna de uma amostra do grupo controle (A) e sua imagem esqueletizada (C); rede vascular da MCA com a aplicação de duas horas de CEM (B) e sua imagem esqueletizada (D).

## **ANEXOS**



**Fractal analysis of the extra-embryonic vascularization from Japanese quail embryos (*Coturnix japonica*) exposed to low frequency electromagnetic field.**

**Edbhergue Ventura Lola Costa<sup>1</sup>, George Chaves Jimenez<sup>2</sup>, Catão Temístocles de Freitas Barbosa<sup>3</sup> and Romildo Albuquerque Nogueira<sup>4</sup>**

<sup>1, 2, 3, 4</sup> Laboratório de Biofísica Teórico-Experimental e Computacional (LABTEC),  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

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

Running title: Electromagnetic field in vascularization.  
E.V.L.Costa was a MSc Fellowship from FACEPE

Grant sponsor: Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Facepe – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

## **Abstract**

Electromagnetic fields (EMFs) can alter the dynamic behavior of blood vascularization and may have a stimulatory or an inhibitory effect on blood vessels growth. The fractal geometry has been used in several studies as a possible tool to describe the development of blood vascular network. In this work we calculated the fractal dimension by the methods of box-counting and information dimension to evaluate the development of blood vessels of chorioallantoic membrane (CAM) from quail embryo after exposure to electromagnetic field (EMF) with magnetic flux density of 1 mT and frequency 60 Hz. Our results showed that exposure to EMF in intervals between 48 and 72 hours of incubation inhibited the growth of blood vascular network in quail CAM if applied in the interval of 6 hours per day (three sessions of 2 hours) and 9 hours per day (three sessions of 3 hours daily). However, the EMF applied in intervals shorter than 6 and bigger than 9 hours did not affect the vasculogenesis and angiogenesis of vascular network of quail CAM, even as exposure to the EMF between 72 and 96 hours of incubation.

**Keywords:** vasculogenesis, angiogenesis, chorioallantoic membrane, fractal dimension, electromagnetic field.

## Introduction

The study of blood flow distribution through the microvasculature is important for understanding the mechanisms involved in tissue healing, pain control on local circulatory disturbances and many other processes. EMFs were demonstrated to be able to change these same processes [Bassett, 1993; Shupak, 2003; McKay et al., 2007]. Balanezhad et al. [2010] showed that an EMF of 40 mT and 50 Hz can inhibit angiogenesis in CAM of chicken embryo by decrease the number and the length of blood vessels. Furthermore, pulsed EMFs can induce angiogenesis and vasodilation in the gluteofemoral region of rabbits [Ishida et al., 2008]. Li et al. [2007] observed that static magnetic fields of 1 and 10 mT prevented the growth of endothelial cells, while the magnetic field of 0.1 mT did not influence the proliferation of these cells. The main effect of the magnetic field of 10 mT is the induction of endothelial cells apoptosis and enhanced expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1).

The knowledge of the intensity, frequency and time exposure of EMFs are factors that are involved in the different effects on the formation of blood vessels as stimulatory or inhibitory. Therefore, details of the effects of EMFs on the microvasculature are not fully elucidated because some works show contradictions. However, it is a well established fact that EMFs can modify biological structures and molecules involved in cellular signaling processes and may thus cause functional changes in various cell types including endothelial cells [Frey, 1993, Ruggiero et al., 2004, Balanezhad et al., 2010].

The blood vascular system is a complex network of branching and tubular structures of different sizes that are irregularly distributed in various tissues which compose the organs. This network is well established fractal object due to its self-similarity, irregularity, fractional dimension and dependence on a scale of observation [Grizz et al., 2005]. The fractal

dimension has been used as a reliable parameter to evaluate the vascular growth and to diagnose diseases on the vascular system and other diagnostics that depend on the vascular system, such as monitoring the effectiveness in tumor anti-angiogenic therapies, anti-proliferative therapies in autoimmune syndromes and retinopathies [Mancardi et al., 2008, Kunick et al. 2009].

In the study with CAM of chicken embryos, Vico et al. [1998] showed that the fractal dimension of the vascular network of the CAM from 100 hours of vascular growth reaches a value around  $D = 1.7$ , corresponding to a stabilization of the vascular architecture. Parsons-Wingter et al. [1998] calculated the fractal dimension of the CAM vascular network of quail embryos obtaining a value  $D = 1.49$  for the ninth day embryo, moreover these authors showed that the fractal dimension of the vascular system in CAM increased when treated with fibroblast growth factor (bFGF) and decreased when treated with angiostatin, confirming the inhibitory effect of angiostatin on vascularization.

In the present work we used the fractal dimension as a tool for detected the effect of electromagnetic field of 1 mT and 60 Hz on the development of vascular network in chorioallantoic membrane of Japanese quail embryos (*Coturnix japonica*).

## Materials and methods

### *Eggs incubation and CAM preparation*

We used 120 quail eggs (*Coturnix japonica*) yielded by the Small Animal Experimental Station of Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) in the Carpina city. The eggs were incubated at a temperature of 37.5 °C and relative humidity of 60%, in an incubator developed in the Laboratory of Theoretical - Experimental and Computational Biophysics (LABTEC) - UFRPE. The incubator is adapted to Helmholtz's coil (Phywe/Germany) to application of EMF. In the second day of incubation small windows of approximately 3 cm<sup>2</sup> were opened on the eggs shell, and it was removed an average of 2.5 ml of albumen and coated with PVC film (polyvinyl chloride). All the eggs were exposed to EMF during 48 hours of incubation and the fractal dimensions were calculated at 72 and 96 hours of incubation.

### *Formation of groups and exposure to EMF*

Six groups were formed, each of them containing 20 eggs. The procedure for exposure of eggs to EMF was carried out according to table 1 and the observations were performed in 72 and 96 hours of incubation.

**Table 1 here**

### *Image capture, digitalization and segmentation*

The vascular networks of the CAM were photographed with a digital camera Sony Cyber-shot DSC W-130 (8.1 megapixels) and the images were digitized in a IBM compatible computer. The images were taken by framing the entire window of access to CAM, limited by the minor axis of the egg, which ranged from 2.39 to 2.62 cm according to the sizes of eggs. The digital images (1920x1080 pixels) were processed to calculate the fractal dimension of the vascular network as follow. First, the images were segmented manually by the Microsoft® Paint to separate the blood vessels of the rest of the images. The images of the vessels were traced by a line corresponding to one pixel thick, after the images were binarized (background image in black and vase in white) also using the Microsoft® Paint program and then the software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis was used to calculate the fractal dimensions of blood vessels images.

### *Fractal analysis*

The methods used to calculate the fractal dimension were the box-counting ( $D_{bc}$ ) and the information dimensions ( $D_{inf}$ ). The  $D_{bc}$  is obtained by covering up the fractal object with  $N(r)$  boxes containing at least one point of the fractal object. This procedure is repeated with boxes of different sizes and draws up a double log graph of  $N(r)$  in function on the sides of boxes  $r$  [Kunick et al., 2009]. The slope of this graph with the inverted signal is the box-counting dimension, which can be defined formally by the following expression:

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

The  $D_{inf}$  is a method capable to characterize the fractal structure that is not homogeneous in its invariance of scale, in this case the object is also covered by boxes, but it takes into account the relative probability of occupancy of the elementary boxes used to cover the fractal object, in other words, the size will depend on the frequency with which each box is visited. As defined by the following expression:

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

Where  $S(r) = - \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log(m_i)$  is called the Kolmogorov entropy. N is the number of boxes,  $m_i = M_i / M$ , and  $M_i$  is the number of points in the  $n^{th}$  box and M is the total number of points on the fractal object [Kunick et al., 2009].

The calculation of  $D_{bc}$  through the software Benoit<sup>TM</sup> 1.3 Fractal Analysis System was conducted with 22 sets of different sizes boxes, the length of the larger box side was 270 pixels and the reduction coefficient of the box size was 1.3. The calculations of the  $D_{inf}$  were used nine sets of different sizes boxes, the length of the larger box side was 270 pixels and the reduction coefficient of box size was 2.0.

### Statistical analysis

After the calculation to obtain the fractal dimension of each vascular network of the CAM, the differences between experimental groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc, because the samples did not follow a normal distribution of according to the Shapiro – Wilk's test, so we adopted a nonparametric test more appropriate to compare the six groups of independent samples.

## Results

Figure 1 shows the vascular network of the CAM of quail embryo from 72 hours incubation and its corresponding skeletonized image for the control group and the exposed group to EMF per 6 hours. By visual inspection it is impossible to distinguish the different images of the chorioallantoic membranes. The segmentation of images also did not allow observing possible differences. Therefore, it is necessary to use a finer tool that can really quantify small differences in both the development of the vascular tree in their different growth stages and possible changes in its development influenced for EMF.

### Figure 1 here

In Table 2, we can observe that the groups showed samples of different sizes, this occurred due to the death of the embryos during the incubation and by the presence of unfertilized eggs. These groups were compared according to the following categories, values  $D_{bc}$  to 72 hours,  $D_{bc}$  to 96 hours,  $D_{inf}$  to 72 hours and  $D_{inf}$  to 96 hours. The statistical tests of Kruskal-Wallis and Dunn post-hoc showed that groups 1, 4 and 5 in 72 hours of incubation showed no significant differences when compared to the control group for both types of dimensions used ( $D_{bc}$  and  $D_{inf}$ ). Unlike the values  $D_{bc}$  of the groups 2 and 3 and  $D_{inf}$  values of group 2 showed significant differences by Dunn's test ( $p < 0.05$ ). The information dimension of group 3 did not differ significantly of control group. After 96 hours of incubation, none of the groups showed statistical difference in fractal dimension compared to control group as by the method of box-counting dimension  $D_{bc}$  ( $p = 0.095$ ) as by the method of information dimension  $D_{inf}$  ( $p = 0.067$ ).

**Table 2 here**

## **Discussion**

The fractal analysis has been shown as an adequate technique to detect changes in various biological systems [Schulze et al., 2008]. Several studies have used fractal geometry as an appropriate tool able to describe the evolution of the blood vasculature in various animal models. One of these models is the CAM of chicken and quail embryo which allows the study of the development of vascular network in a basically two-dimensional structure and that may facilitate the understanding of signaling processes and cellular interactions that are involved in vasculogenesis and angiogenesis [Risau, 1997]. The method  $D_{bc}$  has been used by Kirchner et al. [1996] to quantify the behavior of angiogenesis from images of normal CAM and with tumor graft. This form of morphometric analysis also was used to assess the effects of molecules that induce or inhibit angiogenesis and have been reported in the work of Parsons-Wingter et al. [1998, 2000] and Výboh et al. [2010]. The method of  $D_{bc}$  has also been used to measure other structures or microorganisms, such as the work done by Golinski et al. [2008] which used the method to evaluate the fractal growth of infected fungal colonies by mycovirus. The  $D_{inf}$  is another way to obtain the fractal dimension, is a method that makes inference based on the probability of occupancy of the boxes used to cover the fractal object, allowing a more precise measurement of the fractal object [Kunick et al. 2008].

Several studies have focused on the behavior dynamics of blood vessels after exposure to EMF, stimulating [Roland et al., 1999, Ishida et al., 2008] or inhibiting the angiogenesis [Cameron et al., 2005], stimulating the vasculogenesis [Bekhite et al., 2010] and the arteriogenesis [Okano et al., 2008]. Other actions of EMFs are vasoconstriction,

vasodilatation [McKay et al., 2007], inhibition of proliferation and apoptosis of vascular endothelial cells [Li et al., 2007].

In the present study we have used the fractal analysis to determine the dynamics of the growth of the vascular network under the action of EMF with extremely low frequency (60 Hz) and magnetic flux density 1 mT. Changes in vascularization were estimated by calculating the fractal dimension by box-counting ( $D_{\text{box}}$ ) and information dimension method ( $D_{\text{inf}}$ ). The fractal dimensions of CAMs vascular network show that EMFs can affect the process of vasculogenesis and extra-embryonic angiogenesis when eggs were exposed to the intervals between 6 and 9 hours per day. In this intervals the EMFs inhibited the process of extra-embryonic vascular formation in the first 24 hours of exposure (72 hours of vascular growth.) The values found for  $D_{\text{bc}}$  (group 2 and 3)  $D_{\text{inf}}$  (group 2) compared to control group at 72 hours of vascular development is shown in Table 2. The fact that the value  $D_{\text{inf}}$  of group 3 did not show a statistical difference compared to control group that can be explained by the sensitivity of the method when compared to the box-counting method. For subsequent 24 hours of exposure to EMF that was 96 hours of vascular growth, the groups did not show statistical difference between the fractal dimensions. This suggests that after 24 hours of exposure or the EMF passed to stimulate the formation of blood vessels or, more likely, that had not effect on the vascular network of the CAM.

Balanezhad and colleagues [2010] used a sinusoidal EMF of 40 mT in chicken eggs and suggested that this EMF induced a significant reduction in the number and lengths of the blood vessels of CAM. While, Wang et al. [2009] by using three experimental models: culture of HUVECs – human umbilical veins endothelial cells, chamber matrigel in mice, CAM observed an inhibitory effect on angiogenesis due to a smaller number of vessels and bifurcations of chicken CAMs exposed to static magnetic field (0.2 - 0.4T) for 2, 7 and 9

days. Ruggiero et al. [2004] implanting sponges containing angiogenic stimulators (PGE-1 and fetal calf serum) in chicken eggs exposed to a magnetic field of 0.2 T detected the inhibition of angiogenesis of the vascular network of the CAM, but differently from our results they did not observe change in vasculogenesis. The reason for this discrepancy may be related to the conditions imposed in the experiment, the difference in exposure time and magnetic flux density may have contributed to the different results. It is important to note that Ruggiero et al. [2004] treated the eggs with an EMF on the eleventh day of incubation, a stage at which the CAM of chicken embryo is almost formed and the vascularity to be stable [Dimitropoulos et al., 1998, Cimpean et al., 2008; Gabrielli; Accill, 2010] while in our work EMF was applied when the eggs completed 48 hours of incubation. Therefore, the difference in our results and those obtained by Ruggiero et al. [2004] can also be explained due to the different stages of formation of the CAM for chicken embryo.

Studies suggest that EMFs may act over known factors in the process of vasculogenesis and angiogenesis, such as growth factors like VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ , interleukin 6. The stimulation or inhibition of the expression these factors, depending on the frequency and duration of exposure to EMF [Tepper et al., 2004, Ruggiero et al., 2004, Okano et al., 2008, Wang et al., 2009]. Once EMF is causing a reduction in the expression of pro-angiogenic factors such as VEGF and bFGF, that are important for survival of blood vessels, probably is inducing the apoptosis of vascular cells so leaving to inhibition of vases growth [Alavi et al. 2003].

The results showed that the application of EMF in the interval of 48 to 72 hours to the blood vessels of CAM with low exposure in three sessions of 1 hour was not sufficient to promote a change in the formation of vascular network. None effect was observed when EMF were applied in three sessions from 4 and 8 hours. However applications for three sessions from 2 and 3 hours inhibited the vasculogenesis and angiogenesis showing that the action of

the EMF is dependent of the time exposure and the intensity of EMF. This effect is called of window effect that has been observed by Calotă et al. [2005] when was working with human serum subjected to EMFs, but this phenomenon is not well understood. This effect can be due to endothelial cells, or other cells responsible for synthesis and release of growth factors, and other structures responsible for the formation mechanism of the blood vessels to adapt the action of EMF.

## **Conclusions**

In conclusion this study suggests that 1 mT and 60 Hz electromagnetic field when applied between 48 and 72 hours of incubation, inhibited angiogenesis and vasculogenesis in the quail chorioallantoic membrane if applied in sessions of 2 hours (6 hours per day) and 3 hours (9 hours daily). Nevertheless, the electromagnetic field did not influenced the vascularization of quail chorioallantoic membrane if applied in 3 sessions of 1 (3 hours daily), 4 (12 hours daily) and 8 hours (24 hours). Application of electromagnetic field after 72 to 96 hours of incubation, did not inhibit vasculogenesis and angiogenesis of vascular network from quail chorioallantoic membrane, regardless of exposure time.

**Table 1. Experimental group related to EMF exposure**

---

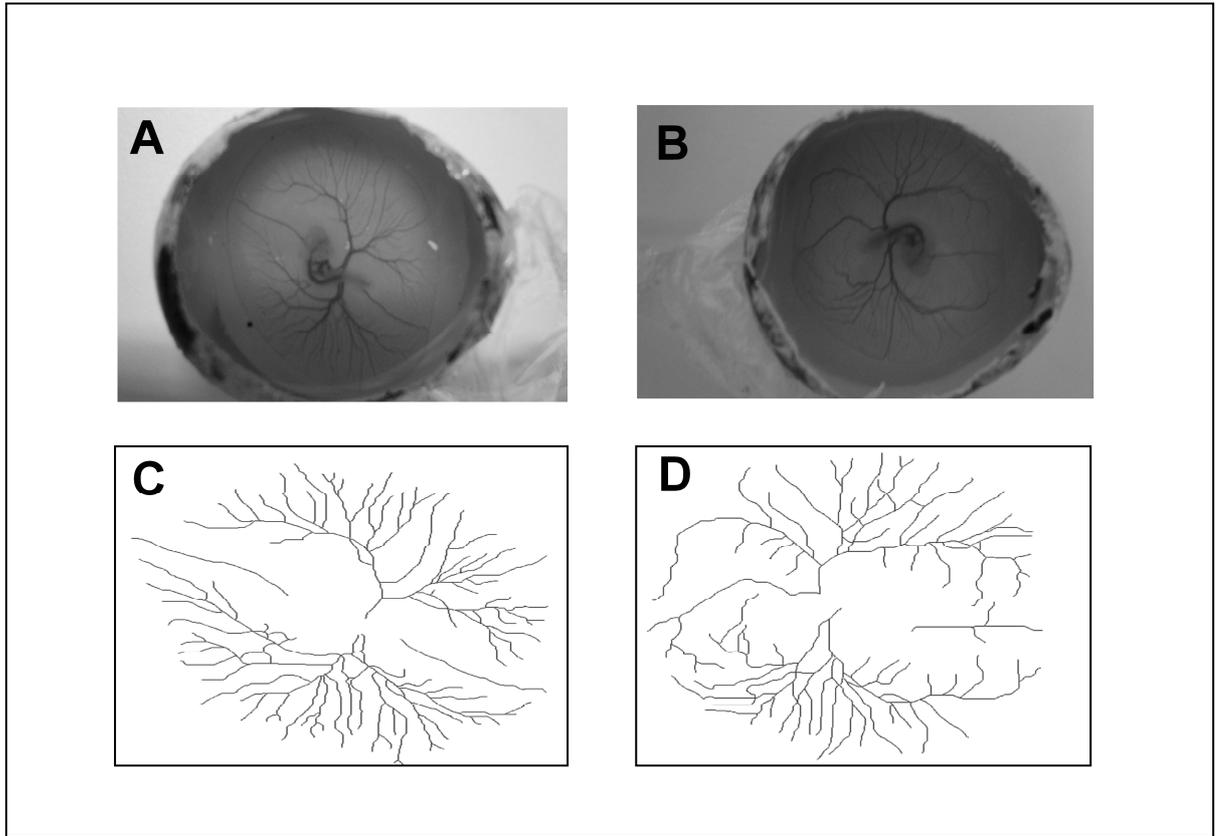
Groups	Number of individuals	Exposure time to EMF (hours)	Interval between exposures (hours)	Total time of daily exposure to EMF
Controle	20	-----	-----	-----
Group 1	20	1 hour	7 hours	3 hours
Group 2	20	2 hours	6 hours	6 hours
Group 3	20	3 hours	5 hours	9 hours
Group 4	20	4 hours	4 hours	12 hours
Group 5	20	24 hours	-----	24 hours

---

**Table 2. Mean and standard deviation of the fractal dimensions of the experimental groups by incubation**

Incubation		72 hours		96 hours		
Groups	n	D <sub>bc</sub>	D <sub>inf</sub>	n	D <sub>bc</sub>	D <sub>inf</sub>
Control	7	1.26±0.04	1.30±0.036	6	1.29±0.032	1.32±0.032
Group 1	6	1.22±0.042	1.26±0.040	4	1.25±0.025	1.29±0.022
Group 2	7	*1.19±0.025	*1.23±0.026	5	1.25±0.05	1.29±0.042
Group 3	14	*1.20±0.045	1.24±0.041	8	1.28±0.027	1.31±0.024
Group 4	10	1.26±0.037	1.30±0.035	7	1.30±0.03	1.33±0.027
Group 5	15	1.22±0.028	1.26±0.029	13	1.29±0.030	1.33±0.030

\*p < 0.05 shows significance difference



**Figure 1.** Blood vascular networks of the CAM and corresponding skeletonized images (background image in white and vases in black). CAM vascular network from quail embryo of a control sample (A) and its corresponding skeletonized image (C); CAM vascular network with application of 2 hour of EMF (B) and its corresponding skeletonized image (D).

## Author Guidelines (instrução para submissão)

Disk	Submission	Instructions
<u>Wiley's Journal Styles and EndNote</u>		

*Bioelectromagnetics* is a peer-reviewed, internationally circulated scientific journal that specializes in biological, biochemical, biophysical, epidemiological and clinical research on the interaction of biological systems with electric, magnetic, and electromagnetic fields with frequencies from zero (DC) to the optical region and with ultrasound. It is sponsored by the Bioelectromagnetics Society and published by Wiley-Liss, Inc., and is the official journal of the Bioelectromagnetics Society and the European Bioelectromagnetics Association. It publishes both experimental and theoretical papers, as well as reviews that offer novel insights into or criticism of concepts of field-organism interactions. The journal also welcomes papers on mechanical or other physical factors that may lead to better understanding of bioelectromagnetic interactions.

**STYLE:** All manuscripts must be written in clear, correct English. Authors should follow the recommendations in *CBE Style Manual*, 6th Edition (Council of Biology Editors, 1994, Cambridge: Cambridge Univ. Press) the recommendations by the IUPAC and IUB Commissions for nomenclature in abbreviations, and symbols and units of the International System of Units (SI) in reporting quantitative data. When original data have been measured in non-SI units, e.g., inches or feet, use of such units is permissible only if near-equivalent SI units are also given parenthetically. Numbers should be unambiguous concerning significant digits, e.g., use  $2.10 \times 10^4$  rather than 21000; use a leading zero for all numbers less than one (0.1, 0.7, etc.). Assemble the manuscript in separate files as noted in the "Submission" section.

**SUBMISSION:** All manuscripts should be submitted through the on-line manuscript handling system, accessible through the Internet at <http://mc.manuscriptcentral.com/bem>, following the instructions on the Internet pages. Pre-submission inquiries on any topic should be directed to the Editor-in-Chief, James C. Lin.

The on-line manuscript handling system has explicit instructions on format and other matters that should be followed. This Journal has a completely digital submission, review, and production process. We therefore ask for production-quality files at initial submission and in any case at the submission of your revised article. This will speed the production and distribution of your work across a variety of print and electronic platforms.

Manuscripts that do not meet the guidelines will be returned for additional revision. This will of course delay review and, in the event that the work is accepted, would delay publication. So please pay careful attention at the time of submission; your cooperation is appreciated.

**Text:** Submit text in DOC, RTF, or TXT format, as instructed on the Internet pages. Do not embed figures or tables in this document; these should be submitted as separate files. Figure captions should be collected on one or more pages that are placed at the end of the text.

**Tables:** Tables should be created with a word processor and saved in either DOC or RTF format. Do not embed tables in the text.

**Figures:** To ensure the highest print quality, figures must be submitted in EPS, DOC, XLS, or PPT formats according to the following minimum resolutions:

- 1200 dpi (dots per inch) for black and white line art (simple bar graphs, charts, etc.)
- 300 dpi for halftones (black and white photographs)
- 600 dpi for combination halftones (photographs that also contain line art such as labeling or thin lines)

High-quality (1000 dpi or more) TIF or JPG files are also acceptable. Vector-based figures (e.g. figures created in Adobe Illustrator) should be submitted in EPS format.

**Color Figures:** In addition to the above resolution guidelines, color figures must be submitted in a CMYK colorspace. Do not submit color figures as RGB.

**Unacceptable Figure Formats:** Do not submit figures in any of the following formats: GIF, PSD, CRD, PCT, PDF, LaTeX, Tex, PICT, Tar, BMP, 123 (or other Lotus formats).

**QUESTIONS?** To ensure that digital graphics are suitable for print media, Rapid Inspector <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zwi/index/jsp> , a free stand-alone software application, will help you verify illustration quality. Detailed guidelines on preparing digital images can also be found at <http://cjs.cadmus.com/da/guidelines.asp>

**Data Deposit and Internet Links:** The publisher's Internet site allows authors to deposit data tables or files too massive for inclusion in an Article for online access by subscribers. Data to be deposited should be submitted with the original manuscript and are subject to the same peer review and editing as other parts of the manuscript. The Internet site can also incorporate a link in the freely available online abstract to a number of other Internet data banks, including Genome Database (GDB), Protein Databank (PDB), and European Molecular Biology Laboratory (EMBL), though not all links can be accommodated. Link requests should also accompany the initial submission of the manuscript. There is presently no charge for data deposit or links, and none is contemplated. If fees ever are imposed, authors would be asked to choose between assuming them or dropping the deposited data or link.

**Assurances, Notifications, and Conflicts of Interest:** For all reports of work using animals or human subjects, the Methods section must note compliance with the relevant safeguards, noting relevant regulations and oversight committees. *Bioelectromagnetics* seeks to follow the accountability policy enunciated by the International Committee of Medical Journal Editors (see Davidoff F., et al. 2001. Editorial. N. Engl. J. Med, 345: 825-827). Authors must acknowledge all financial or in kind support of the work from sources outside of their institutions. They must also identify any significant past or present situations that plausibly might affect the ability of any of them to make disinterested scientific judgments related to the work. Such situations are impossible to list fully, but they include past or present employment; paid or unpaid consulting; substantial financial interest or ownership on the part of an author or a close family member or other personally significant individual; other types of close or adversarial personal or professional relationships; etc. Such situations also include some types of participation or oversight by sponsors in research design, implementation, or publication.

**TYPES OF MANUSCRIPTS:** The journal publishes Articles, Reviews, Brief Communications, Comments and Letters. The first two, longer type of manuscripts should be

organized into sections appropriate to the material. All types of papers should observe the recommendations for Articles where applicable, e.g., title page, abstract and key words, reference format, etc.

**ARTICLES** report the results of experimental, theoretical, epidemiological, or clinical research. A well-written paper generally will not exceed 8 printed pages, equivalent to approximately 16 double-spaced manuscript pages, excluding title, abstract, figures and tables. Introductory comments and discussion of results should generally be directly relevant to the data being presented. Interpretive statements and speculations should be clearly indicated as such. Conclusions drawn from experimental data should be consistent with experimental uncertainties.

**Title Page:** This page should contain a brief but informative title, the names and complete institutional affiliations of all authors, and the name and address to be used for editorial correspondence and reprint requests. The corresponding author's telephone, fax, and email address should also be included. A short running title and sources of grant, contract, and other major financial support should be placed at the bottom of the title page.

**Abstract:** The abstract must be a factual condensation of the entire work, including in the case of experimental studies, a clear description of primary variables and major findings. In one paragraph of not more than approximately 200 words (about one double spaced manuscript page), provide a concise summary of approach, data or theory, and conclusions.

**Key Words:** At the bottom of the abstract page, include 3-5 words or short phrases that capture the subject matter of the manuscript for use in the annual Subject Index. Do not repeat words already used in the title.

**Text:** Use a format appropriate to the material, which will generally include, in the following order, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (can be combined with Discussion), Acknowledgments (if necessary), References, and Appendices (if any). Sources of grant and contract funding are identified on the title page. Required assurances and notifications (see above) appear in the Methods section. Assistance from others should be mentioned in the Acknowledgment section.

#### **References:**

**Wiley's Journal Styles Are Now in EndNote**  
EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley journal style.  
**Download Reference Style for this Journal:** If you already use EndNote, you can download the reference style for this journal.  
**How to Order:** To learn more about EndNote, or to purchase your own copy, click here.  
**Technical Support:** If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit www.endnote.com/support.

In text, cite references by author and year of publication in brackets; for more than two authors, use only the first author's surname with "et al." If an author has two or more reports during

agiven year of publication, identifythem withletter suffixes to the year ofpublication (e.g., Doe, 1995a, b).Reference toreports that are nonarchivalor limited in circulation, e.g.,conferenceabstracts or laboratory, company,or government agency reports, isdiscouragedbecause they are often difficultto obtain and generally lackformal peerreview. Similarly, references to personalcommunications orunpublishedmanuscripts are discouraged, but if used, permissionfrom theauthor of thecommunication must be obtained. These citations areincorporatedinto the textin brackets [ ]. The list of references must bedouble spacedin alphabeticalorder. Abbreviate names of journals in accordancewith the styleof IndexMedicus. Note the following examples:

Cohen HD, Graham C, Cook MR, Phelps JW. 1992. ELF exposure facility for human testing. *Bioelectromagnetics* 13:169-182.

Lin JC. 1978. *Microwave Auditory Effects and Applications*. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas.

McLee BD, Finch ED. 1973. Analysis of reported physiological effects of microwave radiation. In Lawrence JH, Goffman JR (eds): *Advances in Biological and Medical Physics*, Vol. 14. New York: Academic Press, pp 163-223.

Wilkinson GR, Shand DG. 1975. Commentary: A physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther* 18:377-390.

References to Internet resources parallel the print format whenever possible. If print publications also are available on the Internet, authors may at their option add the Internet citation. For example:

WHO International EMF Project. [undated]. Agenda for Research [Internet]. Geneva (CH): World Health Organization. Available from: [http://www.who.int/peh-emf/research\\_agenda/agenda\\_intro](http://www.who.int/peh-emf/research_agenda/agenda_intro) [Last updated 14 March 2002]

de Vocht F, Stevens T, Glover P, Sunderland A, Gowland P, Kromhout H. 2007. Cognitive effects of head-movements in stray fields generated by a 7 Tesla whole-body MRI magnet. DOI: 10.1002/bem.20311. Published Online: Feb 8 2007. Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/114113833/abstract> (subscription required)

For further information, see Patrias K. 2001. *National Library of Medicine Recommended Formats for Bibliographic Citation. Supplement: Internet Formats*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 106 pp. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/pubs/formats/internet.pdf>

**Tables:** Compose each table, double spaced, on a separate page. Tables are given Arabic numbers in order of appearance and must be keyed to the text. Each table must have a self-explanatory title; additional explanatory information should be placed in footnotes, placed below the body of the table, to the title, column headings and entries. Use symbols (asterisk, dagger, etc.) or lower case Roman letters for footnotes, rather than numerals.

**Figures:** Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals and be keyed to the text. Line drawings and computer generated figures must be of high quality; see guidelines concerning figures in Submission section, above. *Lines and lettering must be large and dense*

*enough (minima of 1 point line width, 12 point bold face lettering) to be legible after the figure is reduced to one column width (8.25 cm or 3.25 inches) . We encourage submitting original figures of this width. Scanned figures are generally not of acceptable quality due to grey backgrounds and lack of sharp-edged lines and letters. Photographs, including photomicrographs, must be taken from high contrast glossy prints. Magnification factors must be provided when appropriate; they should be indicated by a calibration bar in the figure. If color plates are necessary, the extra costs involved must be assumed by the authors.*

As noted above, authors are expected to pay the extra costs of publishing figures in color. Color photographs or graphs that reproduce well in black and white (b/w) are acceptable; they will appear in b/w in print, but in color on the publisher's Internet file of the article. *Authors should test such figures by viewing their computer files in "greyscale" or by making a photocopy of a color printout .* Color figures that almost never reproduce well include false-color maps running from red through blue, fluorescence photomicrographs of more than one color, and graphs that do not use differently-shaped points to distinguish multiple lines.

**Captions and Legends:** Descriptive figure captions and legends must accompany illustrations. Captions should be typed, double spaced, on a separate page or pages at the end of the manuscript. A figure and its caption should convey a clear message without asking the reader to scan the text, but should rely on the text for details beyond the basic information needed to convey the message and should not repeat information already in the figure itself. All special abbreviations and symbols should be defined by legends in a figure or by the caption.

**BRIEF COMMUNICATIONS:** Short, but complete reports of novel experimental findings or theories are solicited, and the editors will attempt to secure reviews with a minimum of delay and to speed publication. Manuscripts should be limited to 5 double-spaced pages of text and a maximum of two figures and/or tables. Do not include section headings. The abstract should be kept to a few lines, and only essential references should be included.

**COMMENTS:** The journal welcomes short comments that address specific scientific research issues raised by papers published in *Bioelectromagnetics*. All Comments will be reviewed for scientific content and appropriateness in furthering the goals of eliminating errors and enhancing understanding of published research. Comments that are accepted will be published in as timely a manner as possible, accompanied if appropriate by a reply from the original author(s). Comments should be no longer than one printed page, including figures and references (about 400 words or 2 double spaced pages, less space for figures). Authors with longer submissions should use the Brief Communication or Article formats

**REVIEWS:** Manuscripts providing a critical and analytical synopsis and assessment of prior work are welcome. They should provide a sufficiently complete and balanced set of references to enable the reader to begin independent study of the topic. These papers may also include the authors' original contributions or assessments, if clearly identified. They will generally be longer than articles, but rarely more than 40 double spaced manuscript pages. Authors contemplating reviews are advised to consult the Editor in Chief early in order to avoid duplication or content inconsistent with the journal's purpose.

**LETTERS TO THE EDITOR:** Short (not more than 250 words, about 1 double spaced manuscript page), clear, informative letters appropriate to an archival journal are invited. Generally letters are limited to a single idea on a topic that is of interest to a significant

portion of our readers, which may be related to something published recently in this journal. However, almost all technical comments on specific articles should use the Comments format, and all reports of new data or theories should be submitted as Articles or Brief Communications. The Bioelectromagnetics Society's Newsletter is the forum for time sensitive items, such as announcements of meetings. The Editor in Chief has discretion to accept or refuse publication of any letter, with or without seeking the advice of referee(s), to solicit comment on a letter from another party for simultaneous publication, and to terminate extended exchanges. Letters may be edited for clarity or length, generally without asking authors' approval of the edited version.

**OTHER INFORMATION:** All manuscripts submitted to *Bioelectromagnetics* must be under consideration solely by this journal, may not have been published in any part or form in any other publication of any type, professional or lay. The journal presumes that all authors have approved the submitted manuscript. Manuscripts, though not their contents, become the property of the journal. Authors must secure permission to republish any copyrighted material. Upon acceptance of a manuscript for publication the author will be requested to sign an agreement transferring copyright to the publisher, which reserves copyright. No material published in *Bioelectromagnetics* may be reproduced or published elsewhere without the written permission of the publisher and the author. Should possible scientific misconduct or dishonesty in research submitted for review by the journal be suspected or alleged, the journal reserves the right to forward any submitted manuscript to the sponsoring or funding institution or other appropriate authority for investigation. The journal recognizes the responsibility to ensure that the question is appropriately pursued, but does not undertake the actual investigation or make determinations of misconduct.

The Bioelectromagnetics Society now requests no page charges, voluntary or otherwise, or other fees for authors or their institutions. At their option, authors may purchase reprints at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=BEM>

**Note to NIH Grantees.** Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate) .