

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU**

**QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE CORNEANA *IN VIVO* ATRAVÉS DE  
PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS**

**FORTALEZA  
2006**

**FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU**

**QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE CORNEANA *IN VIVO* ATRAVÉS DE  
PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

**FORTALEZA  
2006**

**FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU**

**QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE CORNEANA *IN VIVO* ATRAVÉS DE  
PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em 24/11/2006

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. João Batista Calixto  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Profa. Dra. Ana Paula Drummond Lage Wainstein  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

---

Prof. Dr. Jaílton Vieira Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

**Aos meus pais, Raimundo Rodrigues  
do Nascimento e Zélia Rodrigues  
Fechine, responsáveis pela formação  
dos meus valores, por acreditarem ser  
a educação a melhor herança para os  
filhos.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador, Professor Doutor Manoel Odorico de Moraes Filho, exemplo de pesquisador e de dedicação à Ciência, por nos mostrar o glorioso caminho da pesquisa científica, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e competência com que orientou este estudo e por ter acreditado na viabilidade do nosso projeto, apoiando, incentivando, motivando e propiciando meios para a sua efetivação.

Ao Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães pela honrosa participação no segundo exame de qualificação e na banca de defesa, contribuindo sobremaneira para o aprimoramento desta tese.

Ao Professor Doutor Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, que com inegável competência coordena o Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio e pela relevante contribuição no primeiro exame de qualificação.

Ao Professor Doutor Jaílton Vieira Silva pela amizade, pelo incentivo e pela brilhante participação na banca examinadora desta tese.

Aos Professores Doutores João Batista Calixto da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Ana Paula Drummond Lage Wainstein da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que, com brilhantismo, dignificaram e enobreceram a banca examinadora desta tese.

Aos Professores Doutores Lúcio Flávio Gonzaga Silva e José Huygens Parente Garcia pela valiosa participação na banca do segundo exame de qualificação.

Ao Professor Doutor Lusmar Veras Rodrigues pela importante colaboração no primeiro exame de qualificação.

Ao Professor Doutor José Alberto Dias Leite pelo incentivo, pela contribuição no primeiro exame de qualificação e por idealizar novas aplicações, na sua área de atuação, para o software desenvolvido neste estudo.

À Professora Doutora Maria Elisabete Amaral de Moraes pelo apoio e incentivo, pela oportunidade de também participarmos de pesquisas clínicas e pela brilhante idéia de usar cápsulas para administrar fármacos a coelhos.

À Professora Doutora Vilma de Lima pelo esclarecimento de dúvidas acerca das drogas antiinflamatórias.

Ao acadêmico de Medicina José Ueides Fechine Júnior pela dedicação irrestrita e pela inestimável contribuição em todas as etapas ao longo do desenvolvimento deste estudo.

Ao acadêmico de Medicina Eduardo Gomes de Azevedo pela dedicada e valiosa participação na fase experimental deste trabalho.

Aos Doutores Valmirlan Fechine Jamacaru, cirurgião-dentista, e Valderlan Fechine Jamacaru, médico patologista, pela relevante contribuição em diversas etapas deste estudo.

À minha irmã Vagneide Fechine Mesquita, pedagoga, pelo apoio e estímulo irrestritos em todos os momentos.

Às Senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, pela dedicação e competência com que conduzem os trabalhos da secretaria e pela atenção dada aos pós-graduandos.

Ao Senhor Bento Francisco de Oliveira, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental, pelos cuidados dispensados aos animais.

Às Senhoras Norma de Carvalho Linhares e Maria Dolores Prado Carvalho, bibliotecárias da Faculdade de Medicina, pelo auxílio na revisão bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Cirurgia, Farmacologia e Clínica Médica pelos ensinamentos ministrados.

Aos mestrandos e doutorandos do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela amizade e companheirismo, especialmente as Doutoras Maria Sônia Felício Magalhães e Conceição Aparecida Dornelas, o Doutor Miguel Ricardo Barbosa Moraes e os Professores José Antônio David Morano e Marcos Rabelo de Freitas pela oportunidade de participarmos dos seus respectivos trabalhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo importante apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

**“Não se pode ensinar tudo a alguém,  
pode-se apenas ajudá-lo a encontrar  
por si mesmo.”**

Galileu Galilei

## RESUMO

**QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE CORNEANA *IN VIVO* ATRAVÉS DE PROCESSAMENTO DE IMAGENS DIGITAIS.** FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Um programa de computador foi desenvolvido especificamente para a segmentação e quantificação de angiogênese corneana em imagens digitais capturadas *in vivo*. O propósito foi estabelecer um método automático para quantificar, de forma rápida, objetiva e acurada, a progressão temporal da resposta angiogênica. Desenvolveu-se ainda um modelo de angiogênese corneana inflamatória em coelhos, induzida por uma cauterização alcalina pontual, onde a resposta angiogênica foi avaliada, conforme cinco métodos manuais, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 após a cauterização, ocasiões em que também foram obtidas, de maneira padronizada, imagens digitais da córnea. O software é composto de cinco módulos, com funções específicas, que identificam e segmentam automaticamente os neovasos e quantificam a resposta angiogênica mediante a determinação de três parâmetros principais: área de neovascularização, comprimento vascular total e número de vasos sanguíneos. Assim, o sistema dispensa a rotulação prévia da neovascularização, propiciando, por conseguinte, o monitoramento espacial e temporal da resposta angiogênica *in vivo*. A avaliação da validade do método automático proposto envolveu a determinação do grau da correlação entre cada um dos quantificadores automáticos e os cinco parâmetros manuais. Compreendeu ainda a comparação do reconhecimento automático dos vasos sanguíneos realizado pelo software em 50 subimagens com o reconhecimento manual efetuado, consensualmente, por três examinadores (padrão-ouro), determinando-se então a sensibilidade, especificidade e o coeficiente de concordância *kappa*. Para avaliar a confiabilidade, três examinadores utilizaram o método automático para analisar 50 imagens em dois momentos. A concordância intra e interexaminadores foi medida pelo coeficiente de correlação intraclass. Para ilustrar a utilidade do método automático, delineou-se um ensaio que avaliou o efeito dos fármacos prednisona, talidomida, ácido acetilsalicílico, etoricoxib e celecoxib no modelo de angiogênese corneana inflamatória. A análise dos gráficos dos quantificadores manuais e automáticos revelou que a evolução temporal da resposta angiogênica no modelo de angiogênese corneana inflamatória seguiu um padrão bifásico: crescimento exponencial até o dia 12 (fase de proliferação), seguido de crescimento linear até o dia 21 (fase de maturação). Constatou-se uma forte correlação linear positiva estatisticamente significante entre os quantificadores automáticos e manuais, denotando que o método automático mensurou a resposta angiogênica de forma análoga à realizada pelo método manual. A sensibilidade do método automático foi 85,32%, enquanto sua especificidade foi 96,37%. A concordância entre o reconhecimento manual e o reconhecimento automático dos vasos sanguíneos foi classificada pela estatística *kappa* como quase perfeita. A concordância interexaminadores foi avaliada em seis situações, sendo classificada como excelente em quatro delas e como boa nas outras duas. A concordância intra-examinador foi mensurada em nove situações, sendo classificada como boa em apenas uma e como excelente nas demais. Além disso, o sistema automático foi capaz de identificar diferenças na intensidade do efeito antiangiogênico dos diferentes fármacos avaliados, possibilitando graduar a atividade inibitória em plena (prednisona), parcial (talidomida, ácido acetilsalicílico e etoricoxib) e insuficiente (celecoxib), demonstrando, assim, o seu valor como método para análise quantitativa de angiogênese. Portanto, tais dados demonstram que o sistema automático proposto constitui um método de quantificação de angiogênese acurado e reproduzível.

**PALAVRAS-CHAVE:** Neovascularização da córnea. Inflamação. Processamento de imagem assistido por computador. Córnea. Coelhos.

## ABSTRACT

**IN VIVO QUANTIFICATION OF CORNEAL ANGIOGENESIS USING DIGITAL IMAGE PROCESSING.** FRANCISCO VAGNALDO FECHINE JAMACARU. Thesis (Doctorate). Post-Graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery. Federal University of Ceará. Supervisor: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

A software was developed specifically for segmentation and quantification of corneal angiogenesis in digital images acquired *in vivo*. The purpose was to establish an automatic method to quantify the corneal progression of the neovascular response in a rapid, objective and accurate manner. It was also developed a model of inflammatory corneal angiogenesis in rabbits induced by a punctual alkaline cauterization. Angiogenic response was evaluated at days 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 after cauterization. At these occasions, digital images of cornea were also captured in a standardized fashion. The software is composed of five modules, each with specific functions, which automatically identify and segment the neovessels and quantify the neovascular response through the calculation of three main parameters: neovascularization area, total vascular length and blood vessels number. Thus, the system does not require previous enhancement of the neovascularization, so that it provides the temporal and spatial monitoring of the angiogenic response *in vivo*. To assess the validity of the automatic method, it was determined the correlation degree between each automatic parameters and the five manual variables. It was also evaluated by comparing automatic recognition of blood vessels performed by the software on 50 subimages with the manual recognition performed by three raters by consensus (gold-standard) and then calculating the sensitivity, specificity and *kappa* coefficient. To assess reliability, three raters used the automatic method for analysing 50 images at two moments. The intra and inter-raters agreement was assessed by calculating intraclass correlation coefficient. To illustrate the utility of the automatic method, it was designed an assay that evaluated the effect of prednisone, thalidomide, acetylsalicylic acid, etoricoxib and celecoxib in the model of inflammatory corneal angiogenesis. The analysis of the graphics of the manual and automatic parameters showed that the temporal progression of the neovascular response in this model followed a biphasic pattern: exponential growth until day 12 (proliferation phase), followed by linear growth until day 21 (maturation phase). It was found a statistically significant positive linear correlation between automatic and manual variables, denoting that both methods measured the angiogenic response in an analogous fashion. The sensitivity of the automatic method was 85.32% and the specificity was 96.37%. The agreement between manual and automatic recognition of blood vessels was classified as almost perfect, according to *kappa* statistics. The inter-raters agreement was measured in six situations and it was classified as good in two of them and as excellent in the others. Among the nine situations analysed, the intra-rater agreement was classified as good in only one of them and as excellent in the others. Furthermore, the automatic system was able to detect differences in the intensity of the antiangiogenic effect of tested drugs, allowing the inhibitory activity to be graduated as full (prednisone), partial (thalidomide, acetylsalicylic acid and etoricoxib) and insufficient (celecoxib), demonstrating, thus, its value as method for quantitative analysis of angiogenesis. Therefore, such results demonstrate that the proposed automatic system constitutes an accurate and reproducible method of angiogenesis quantification.

**KEY WORDS:** Corneal neovascularization. Inflammation. Computer-assisted image processing. Cornea. Rabbits.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Processo de formação de novos vasos (vasculogênese, angiogênese, arteriogênese) .....	23
<b>FIGURA 2</b> – Estabilização <i>versus</i> regressão vascular.....	24
<b>FIGURA 3</b> – Mecanismos da angiogênese fisiológica: seqüência de eventos e seus respectivos mediadores. ....	33
<b>FIGURA 4</b> – Córnea de coelho. A córnea é uma estrutura avascular, transparente e de fácil acesso, de modo que propicia um monitoramento direto da resposta angiogênica.....	37
<b>FIGURA 5</b> – Coelhos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) brancos da raça Nova Zelândia.....	49
<b>FIGURA 6</b> – Posicionamento do coelho em decúbito lateral esquerdo. Aposição de campos e colocação do blefarostato graduável, expondo a córnea e a região límbica superior.....	51
<b>FIGURA 7</b> – Posicionamento da peça de papel filtro na periferia superior da córnea direita e aspecto da região cauterizada. ....	51
<b>FIGURA 8</b> – Desenho esquemático do círculo corneano, mostrando a região de angiogênese, bem como os parâmetros utilizados na sua quantificação. ....	53
<b>FIGURA 9</b> – Relações angulares entre o eixo do microscópio ( <i>m</i> ), o plano horizontal ( <i>h</i> ) e a reta simultaneamente tangente à periferia da córnea e à esclera ( <i>t</i> ). ....	58
<b>FIGURA 10</b> – Localização dos quatro pontos de enquadramento na tela do monitor.....	59
<b>FIGURA 11</b> – Resultado do procedimento de aquisição das imagens.....	60
<b>FIGURA 12</b> – Etapas do procedimento de aquisição das imagens.....	61
<b>FIGURA 13</b> – Mistura das cores primárias (vermelho, verde e azul) produzindo as cores secundárias (magenta, ciano e amarelo) e a luz branca. ....	62
<b>FIGURA 14</b> – Cubo de cores do modelo RGB.....	62
<b>FIGURA 15</b> – Decomposição de uma imagem colorida nos 3 componentes do modelo RGB.....	63
<b>FIGURA 16</b> – Decomposição de uma imagem colorida nos 3 componentes do modelo HSI. ....	64
<b>FIGURA 17</b> – Tela inicial. O operador interage com o sistema ativando os botões apropriados. ....	65

<b>FIGURA 18</b> – Módulos que compõem o sistema.....	66
<b>FIGURA 19</b> – Determinação de distâncias entre dois pontos. Considerando que os segmentos delimitados são a corda de neovascularização ( $C_N$ ) e o comprimento vascular radial ( $C_R$ ), então o sistema calcula automaticamente os demais parâmetros manuais que são dependentes de $C_N$ e $C_R$ , quais sejam: o ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), a área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ) e a área do setor de coroa circular ( $A_S$ ). .....	68
<b>FIGURA 20</b> – Seleção da região de interesse na imagem original. A região selecionada é automaticamente recortada, gerando uma nova imagem.....	69
<b>FIGURA 21</b> – Representação de imagens digitais.....	70
<b>FIGURA 22</b> – Imagem com 256 tons de cinza e o seu histograma.....	71
<b>FIGURA 23</b> – Imagem original e sua análoga em 256 tons de cinza, correspondente ao componente G do modelo RGB: o escolhido pelo sistema.....	71
<b>FIGURA 24</b> – Negativo da imagem B da Figura 23. ....	72
<b>FIGURA 25</b> – Resultado da aplicação do algoritmo de alargamento do contraste na imagem da Figura 24.....	73
<b>FIGURA 26</b> – Resultado do algoritmo de intensificação do contraste, que utiliza uma transformação adaptativa local, na imagem da Figura 25.....	74
<b>FIGURA 27</b> – Resultado da aplicação do algoritmo de remoção do fundo na imagem da Figura 26. ....	75
<b>FIGURA 28</b> – Resultado da aplicação do procedimento de equalização do histograma na imagem da Figura 27.....	76
<b>FIGURA 29</b> – Operações morfológicas em imagens em tons de cinza. Resultado da operação fechamento (dilatação seguida da erosão). ....	77
<b>FIGURA 30</b> – Máscaras usadas na implementação digital do operador laplaciano e do filtro gaussiano. ....	79
<b>FIGURA 31</b> – Resultado da aplicação do filtro gaussiano na imagem B da Figura 29. ....	80
<b>FIGURA 32</b> – Resultado do operador laplaciano da gaussiana. ....	81
<b>FIGURA 33</b> – Resultado da aplicação do algoritmo de binarização na imagem da Figura 32. ....	83
<b>FIGURA 34</b> – Resultado da etapa de pós-processamento. ....	84

<b>FIGURA 35</b> – Após as fases de pré-processamento, segmentação e pós-processamento, o sistema mostra a imagem resultante, com os vasos nas suas cores originais e o fundo na cor branca, assim como o valor do limiar de segmentação.....	85
<b>FIGURA 36</b> – O software também disponibiliza duas barras de rolagem para que o operador ajuste interativamente uma faixa de limiares, caso julgue necessário.....	86
<b>FIGURA 37</b> – Área de neovascularização segmentada e reinserida na imagem original. Os valores da área de neovascularização, em mm <sup>2</sup> e pixels <sup>2</sup> , da área total da córnea, em mm <sup>2</sup> , e o percentual daquela em relação a esta são mostrados. ....	87
<b>FIGURA 38</b> – Vizinhança de 8 do pixel $P_1$ usada pelo algoritmo de afinamento. ....	88
<b>FIGURA 39</b> – Árvore vascular esquemática e sua análoga esqueletizada. ....	89
<b>FIGURA 40</b> – Resultado da aplicação do algoritmo de esqueletização na imagem da Figura 34. ....	90
<b>FIGURA 41</b> – Rotulação dos pixels do esqueleto como ponto terminal, bifurcação ou nó.....	91
<b>FIGURA 42</b> – Exibição do valor do comprimento vascular total, em mm e pixels, do número de vasos sanguíneos e do número de pontos terminais, bifurcações e nós.....	92
<b>FIGURA 43</b> – Determinação do comprimento vascular total, do número de vasos sanguíneos e do número de pontos terminais, bifurcações e nós na árvore vascular esquemática da Figura 39A. ....	93
<b>FIGURA 44</b> – Sistema-teste constituído por uma grade de quadrados de lado igual a 8 pixels (0,2105 mm) superposta à imagem dos vasos esqueletizados, previamente reinserida na imagem original.....	94
<b>FIGURA 45</b> – Resultado do cômputo do número de intersecções entre os vasos esqueletizados e as linhas de uma grade de quadrados. ....	95
<b>FIGURA 46</b> – Exemplos de subimagens de 20 x 20 pixels analisadas pelos métodos manual (padrão-ouro) e automático. ....	99
<b>FIGURA 47</b> – Cânula metálica, própria para a administração de cápsulas a coelhos, dotada de um dispositivo para expulsar a cápsula na faringe. ....	102
<b>FIGURA 48</b> – Administração das cápsulas aos coelhos. Após a imobilização do animal, a cânula contendo a cápsula é introduzida na cavidade oral até alcançar a base da língua, momento em que o êmbolo é acionado, expulsando a cápsula na faringe, que é então imediatamente deglutida. ....	102

<b>FIGURA 49</b> – Delineamento do ensaio que avaliou o efeito de fármacos antiangiogênicos (prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib) no modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho .....	103
<b>FIGURA 50</b> – Método gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre dois métodos A e B .....	108
<b>FIGURA 51</b> – Progressão da resposta angiogênica nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização (D0) .....	112
<b>FIGURA 52</b> – Outro exemplo representativo da evolução temporal da resposta angiogênica.....	113
<b>FIGURA 53</b> – A peça de papel filtro sem o agente alcalino não causou lesão epitelial, não alterou o padrão da vasculatura perilímbica, nem induziu angiogênese corneana. ....	114
<b>FIGURA 54</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o quantificador comprimento vascular radial ( $C_R$ ) .....	115
<b>FIGURA 55</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o parâmetro área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ) .....	115
<b>FIGURA 56</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo a variável área do setor de coroa circular ( $A_S$ ) .....	116
<b>FIGURA 57</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o parâmetro índice angiogênico ( $I_A$ ) .....	116
<b>FIGURA 58</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o quantificador ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ) .....	116
<b>FIGURA 59</b> – Diagramas de dispersão de $C_R$ em função de $A_T$ , $A_S$ e $I_A$ .....	117
<b>FIGURA 60</b> – Diagramas de dispersão de $A_T$ em função de $C_R$ , $A_S$ e $I_A$ .....	118
<b>FIGURA 61</b> – Diagramas de dispersão de $A_S$ em função de $C_R$ , $A_T$ e $I_A$ .....	118
<b>FIGURA 62</b> – Diagramas de dispersão de $I_A$ em função de $C_R$ , $A_T$ e $A_S$ .....	118
<b>FIGURA 63</b> – Diagramas de dispersão de $A_C$ em função de $C_R$ , $A_T$ , $A_S$ e $I_A$ .....	118
<b>FIGURA 64</b> – Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, referente aos intervalos de 3 dias entre as avaliações.....	120
<b>FIGURA 65</b> – Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12º e o 21º dia. ....	120
<b>FIGURA 66</b> – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária $C_R(t)$ , obtida por regressão não linear.....	121

<b>FIGURA 67</b> – Derivada de $C_R$ em relação a $t$ ( $dC_R/dt$ ), que corresponde à taxa instantânea de angiogênese radial ( $TAR_I$ ) .....	122
<b>FIGURA 68</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica de acordo com a variável área de neovascularização ( $A_N$ ).....	123
<b>FIGURA 69</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica de acordo com a variável comprimento vascular total ( $C_T$ ).....	123
<b>FIGURA 70</b> – Progressão temporal da resposta angiogênica de acordo com a variável número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). ....	124
<b>FIGURA 71</b> – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente aos intervalos de 3 dias entre as avaliações. ....	125
<b>FIGURA 72</b> – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12º e o 21º dia.....	126
<b>FIGURA 73</b> – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária $A_N(t)$ , obtida por regressão não linear. ....	127
<b>FIGURA 74</b> – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária $C_T(t)$ , obtida por regressão não linear. ....	127
<b>FIGURA 75</b> – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária $N_V(t)$ , obtida por regressão não linear. ....	128
<b>FIGURA 76</b> – Derivada de $A_N$ em relação a $t$ ( $dA_N/dt$ ), que corresponde à taxa instantânea de angiogênese superficial ( $TAS_I$ ). ....	129
<b>FIGURA 77</b> – Diagramas de dispersão de $A_N$ , $C_T$ e $N_V$ em função de $C_R$ . ....	130
<b>FIGURA 78</b> – Diagramas de dispersão de $A_N$ , $C_T$ e $N_V$ em função de $A_T$ .....	130
<b>FIGURA 79</b> – Diagramas de dispersão de $A_N$ , $C_T$ e $N_V$ em função de $A_S$ .....	130
<b>FIGURA 80</b> – Diagramas de dispersão de $A_N$ , $C_T$ e $N_V$ em função de $I_A$ .....	131
<b>FIGURA 81</b> – Diagramas de dispersão de $A_N$ , $C_T$ e $N_V$ em função de $A_C$ .....	131
<b>FIGURA 82</b> – Diagramas de dispersão da taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) em função da taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ).....	131
<b>FIGURA 83</b> – Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as medições da variável área de neovascularização ( $A_N$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels. ....	138
<b>FIGURA 84</b> – Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as medições da variável comprimento vascular total ( $C_T$ )	

efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels.....	139
<b>FIGURA 85</b> – Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as medições da variável número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels.....	139
<b>FIGURA 86</b> – Diagrama de dispersão do número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) em função do número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema-teste ( $N$ ). .....	141
<b>FIGURA 87</b> – Concordância entre as variáveis número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) e número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema-teste ( $N_I$ ), de acordo com o gráfico de Bland-Altman. ....	141
<b>FIGURA 88</b> – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo controle (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização.....	145
<b>FIGURA 89</b> – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo prednisona (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização.....	145
<b>FIGURA 90</b> – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo talidomida (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização.....	146
<b>FIGURA 91</b> – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo AAS (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. ....	146
<b>FIGURA 92</b> – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo etoricoxib (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização.....	147
<b>FIGURA 93</b> – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo celecoxib (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização.....	147
<b>FIGURA 94</b> – Quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos de tratamento, conforme o parâmetro área de neovascularização ( $A_N$ ).....	149
<b>FIGURA 95</b> – Quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos de tratamento, conforme o parâmetro comprimento vascular total ( $C_T$ ).....	150
<b>FIGURA 96</b> – Quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos de tratamento, conforme o parâmetro número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). .....	151

<b>FIGURA 97</b> – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12º e 21º dia, verificada nos seis grupos de tratamento.....	152
<b>FIGURA 98</b> – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao período entre os dias 3 e 21, verificada nos seis grupos de tratamento.....	153
<b>FIGURA 99</b> – Intensidade do efeito antiangiogênico ( $IEA$ ), expressa em termos percentuais, referente aos fármacos prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib, verificada nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.....	154
<b>FIGURA 100</b> – Intensidade média do efeito antiangiogênico ( $IEA$ média), expressa em termos percentuais, referente aos fármacos prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib.....	155
<b>FIGURA 101</b> – Intensidade final do efeito antiangiogênico ( $IEA$ final), expressa em termos percentuais, referente aos fármacos prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib.....	155
<b>FIGURA 102</b> – Variação de peso corporal ( $VP$ ), expressa em termos percentuais, referente aos seis grupos de tratamento.....	156

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1 – Principais fatores endógenos indutores e inibidores de angiogênese.....</b>	<b>26</b>
<b>QUADRO 2 – Critérios para a interpretação do coeficiente de concordância <i>kappa</i> .....</b>	<b>106</b>
<b>QUADRO 3 – Critérios para a interpretação do coeficiente de correlação intraclasse.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, referente aos intervalos de 3 dias e aos períodos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 e 3 e 21 .....	119
<b>TABELA 2</b> – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente aos intervalos de 3 dias e aos períodos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 e 3 e 21 .....	125
<b>TABELA 3</b> – Classificação dos <i>pixels</i> como pertencentes aos vasos sangüíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o próprio limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema .....	133
<b>TABELA 4</b> – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o próprio limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema .....	134
<b>TABELA 5</b> – Classificação dos <i>pixels</i> como pertencentes aos vasos sangüíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema menos 1 ( $L - 1$ ).....	134
<b>TABELA 6</b> – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema menos 1 ( $L - 1$ ).....	134
<b>TABELA 7</b> – Classificação dos <i>pixels</i> como pertencentes aos vasos sangüíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema menos 2 ( $L - 2$ ).....	135
<b>TABELA 8</b> – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema menos 2 ( $L - 2$ ).....	135
<b>TABELA 9</b> – Classificação dos <i>pixels</i> como pertencentes aos vasos sangüíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema mais 1 ( $L + 1$ ).....	135
<b>TABELA 10</b> – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema mais 1 ( $L + 1$ ) .....	136

<b>TABELA 11</b> – Classificação dos <i>pixels</i> como pertencentes aos vasos sanguíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema mais 2 ( $L + 2$ ).....	136
<b>TABELA 12</b> – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema mais 2 ( $L + 2$ ). .....	136
<b>TABELA 13</b> – Concordância entre as medições das variáveis área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho 20 x 20 <i>pixels</i> , avaliada pelo coeficiente de correlação intraclasse (CCI).....	137
<b>TABELA 14</b> – Concordância interexaminadores em relação ao parâmetro área de neovascularização ( $A_N$ ).....	142
<b>TABELA 15</b> – Concordância intra-examinador em relação ao parâmetro área de neovascularização ( $A_N$ ).....	142
<b>TABELA 16</b> – Concordância interexaminadores em relação ao parâmetro comprimento vascular total ( $C_T$ ).....	143
<b>TABELA 17</b> – Concordância intra-examinador em relação ao parâmetro comprimento vascular total ( $C_T$ ).....	143
<b>TABELA 18</b> – Concordância interexaminadores em relação ao parâmetro número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ).....	144
<b>TABELA 19</b> – Concordância intra-examinador em relação ao parâmetro número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ).....	144

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AAS – ácido acetilsalicílico  
A<sub>C</sub> – ângulo central de neovascularização  
A<sub>N</sub> – área de neovascularização  
Ang-1 – angiopoetina-1  
Ang-2 – angiopoetina-2  
A<sub>S</sub> – área do setor de coroa circular  
A<sub>T</sub> – área do triângulo de neovascularização  
CAM – membrana corioalantóidea  
CCI – coeficiente de correlação intraclasse  
CDI – inibidor derivado de cartilagem  
C<sub>N</sub> – corda da circunferência corneana que delimita a zona de neovascularização  
COX-1 – cicloxigenase-1  
COX-2 – cicloxigenase-2  
C<sub>R</sub> – comprimento vascular radial  
C<sub>T</sub> – comprimento vascular total  
DAINS – drogas antiinflamatórias não esteroidais  
EGF – fator de crescimento epidérmico  
FGF – fator de crescimento de fibroblastos ácido (FGF-1) e básico (FGF-2)  
FGFR – receptor do FGF  
FITC – isotiocianato de fluoresceína  
G-CSF – fator estimulador de colônia de granulócitos  
HGF – fator de crescimento de hepatócitos  
HIF-1 – fator de transcrição induzido por hipoxia 1  
HSI – modelo de cores baseado no matiz, saturação e intensidade  
HSPGs – proteoglicanos sulfato de heparano  
I<sub>A</sub> – índice angiogênico  
ICAM-1 – molécula de adesão intercelular 1  
IEA – intensidade do efeito antiangiogênico  
IGF – fator de crescimento insulina-símile  
IL – interleucina  
KGF – fator de crescimento de queratinócitos  
L – limiar de segmentação

M – molar

MCP-1 – proteína para quimiotaxia de macrófagos 1

MMP-2 – metaloproteinase da matriz 2

NaOH – hidróxido de sódio

NF-κB – fator nuclear *kappa* B

$N_i$  – número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema-teste

NO – óxido nítrico

$N_V$  – número de vasos sangüíneos

PA – ativador do plasminogênio

PAI – inibidor do ativador do plasminogênio

PD-ECCF – fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaquetas

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PECAM-1 – molécula de adesão plaqueta-célula endotelial 1

PGE<sub>1</sub> – prostaglandina E<sub>1</sub>

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>

PGH<sub>2</sub> – prostaglandina H<sub>2</sub>

PIGF – fator de crescimento da placenta

RGB – modelo de cores baseado nas cores primárias vermelho, verde e azul

SQAN – Sistema de Quantificação de Angiogênese

TAR<sub>I</sub> – taxa instantânea de angiogênese radial

TAR<sub>M</sub> – taxa média de angiogênese radial

TAS<sub>I</sub> – taxa instantânea de angiogênese superficial

TAS<sub>M</sub> – taxa média de angiogênese superficial

TGF – fator de crescimento transformador α (TGF-α) e β (TGF-β)

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinases

TNF-α – fator de necrose tumoral α

TP – timidina fosforilase

TSP-1 – trombospondina-1

TXB<sub>2</sub> – tromboxano B<sub>2</sub>

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

VEGFR – receptor do VEGF

VP – variação do peso corporal

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE QUADROS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	22
1.1 Angiogênese: conceito, mecanismos e implicações clínicas .....	22
1.2 Ensaios de angiogênese em córnea .....	35
1.3 Métodos manuais de quantificação de angiogênese em córnea.....	40
1.4 Métodos automáticos de quantificação de angiogênese em córnea.....	43
1.5 Relevância e justificativa .....	46
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	48
2.1 Geral .....	48
2.2 Específicos .....	48
<b>3 MÉTODO.....</b>	49
3.1 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho .....	50
3.2 Método manual de quantificação de angiogênese .....	52
3.3 Aquisição das imagens .....	56
3.4 Método automático de quantificação de angiogênese .....	64
3.5 Validação do método automático de quantificação de angiogênese.....	96
3.6 Avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático .....	100
3.7 Análise estatística .....	104
<b>4 RESULTADOS.....</b>	111
4.1 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho .....	111
4.2 Método automático de quantificação de angiogênese .....	122
4.3 Avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático .....	144
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	157
5.1 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho .....	157
5.2 Método automático de quantificação de angiogênese .....	169
5.3 Avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático .....	187
5.4 Considerações finais .....	202
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	205
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	206
<b>APÊNDICES .....</b>	226
<b>ANEXO .....</b>	242

## **1 INTRODUÇÃO**

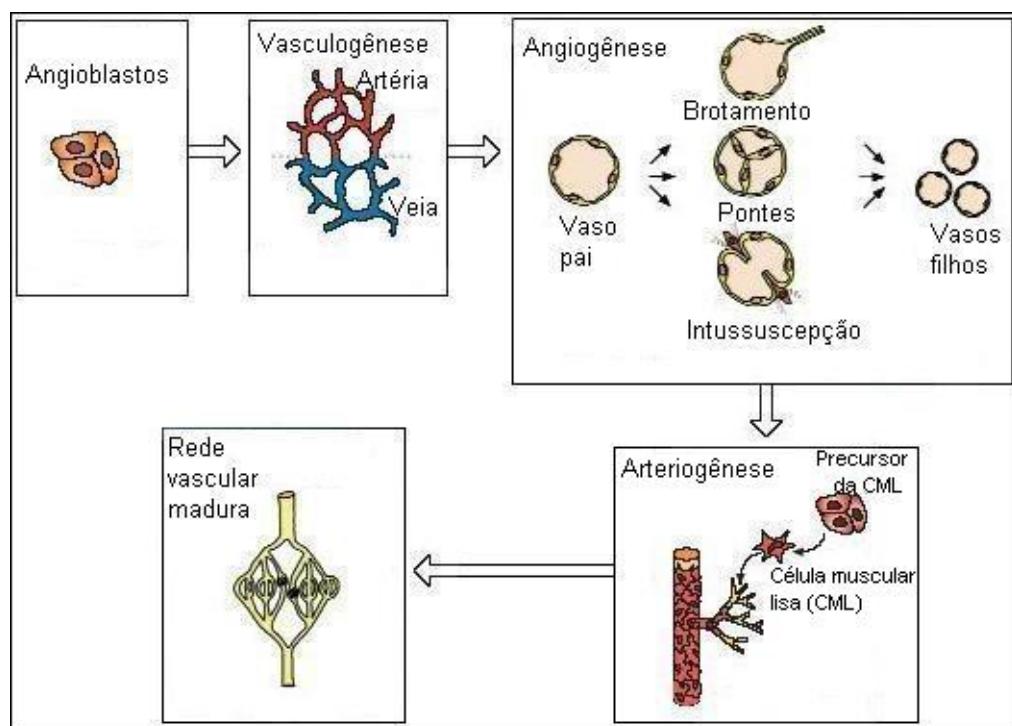
### **1.1 Angiogênese: conceito, mecanismos e implicações clínicas**

A formação de novos vasos sanguíneos envolve dois processos fundamentais: vasculogênese e angiogênese (RISAU, 1997; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001). Vasculogênese é a formação primária de vasos sanguíneos a partir dos precursores da célula endotelial, os angioblastos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; RISAU, 1997; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; CARMELIET, 2003). Caracteriza-se pela diferenciação dos angioblastos em células endoteliais, que proliferam e se organizam numa rede vascular primitiva denominada de plexo vascular primário. Uma vez formado, o plexo vascular primário é remodelado pelo brotamento e ramificação de novos vasos derivados daqueles já existentes. Assim, progressivamente, forma-se a rede vascular adulta (RISAU, 1997; PAPETTI; HERMAN, 2002).

O processo de desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existentes é denominado de angiogênese ou neovascularização (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; RISAU, 1997; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001; AUERBACH, 2003). Podem ser descritos três mecanismos distintos de angiogênese: brotamento de novos capilares, intussuscepção (RISAU, 1997; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001) e formação de pontes celulares (CARMELIET, 2000). O primeiro mecanismo corresponde à geração de novos brotos capilares derivados de vasos pré-existentes (RISAU, 1997). Na angiogênese por intussuscepção, ocorre o crescimento, e subsequente estabilização, de pilares de células periendoteliais para dentro do vaso, resultando na divisão desse vaso (RISAU, 1997; CARMELIET, 2000; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001). O terceiro mecanismo envolve a formação de pontes celulares transendoteliais no interior do capilar, as quais promovem a sua cisão e o surgimento de novos capilares (CARMELIET, 2000) (Figura 1).

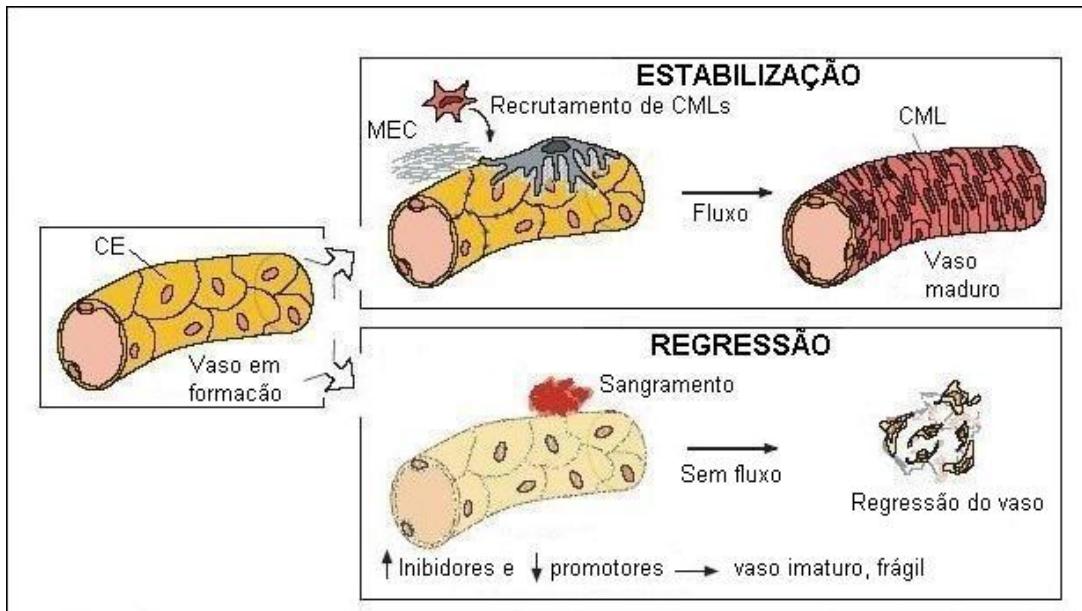
Os vasos recém-formados pelo mecanismo de angiogênese são constituídos apenas de células endoteliais. O fortalecimento das adesões entre as células endoteliais e o recrutamento de células murais, pericitos e células musculares lisas, são necessários para promover a estabilização e maturação desses neovasos. Assim, células musculares lisas proliferam e migram ao longo do vaso nascente, formando uma camada muscular que recobre as células endoteliais,

dando estabilidade e durabilidade a esse neovaso. Esse processo é chamado de arteriogênese. O estabelecimento de fluxo sanguíneo no vaso neoformado constitui também um fator essencial para a maturação vascular. Quando, porém, o estímulo angiogênico é insuficiente, o neovaso torna-se frágil, dilatado, sujeito a rupturas e sangramentos, resultando na redução do fluxo e, finalmente, na sua regressão (CARMELIET, 2000; CARMELIET, 2003) (Figuras 1 e 2).



**FIGURA 1 – Processo de formação de novos vasos.** Os precursores da célula endotelial (os angioblastos) se diferenciam e proliferam, formando um plexo vascular primitivo (vasculogênese), que sofre expansão e remodelação pelo processo de angiogênese. Os neovasos são estabilizados pelo recrutamento de células murais: pericitos e células musculares lisas (arteriogênese). Assim, tornam-se maduros e duráveis. Adaptado de Carmeliet (2000) e Carmeliet (2003).

Durante a embriogênese, os vasos sanguíneos são formados tanto por vasculogênese como por angiogênese (VAILHÉ; VITTEL; FEIGE, 2001). No adulto, porém, a formação de novos vasos ocorre, mormente, pelo processo de angiogênese, embora vasculogênese também possa ocorrer (CARMELIET, 2000; VAILHÉ; VITTEL; FEIGE, 2001; CONTI, 2002). De fato, por muitos anos prevaleceu o pensamento de que a vasculogênese era um evento exclusivo do período embrionário. No entanto, evidências recentes indicam que os precursores da célula endotelial também contribuem para o crescimento vascular em tecidos tumorais, isquêmicos ou inflamados no adulto (CARMELIET, 2003).



**FIGURA 2 –** Estabilização *versus* regressão vascular. Os vasos em formação são constituídos apenas de células endoteliais. A maturação desses neovasos requer um estímulo angiogênico com uma duração tal que propicie uma forte adesão entre as células endoteliais, bem como uma adequada cobertura por células murais. O estabelecimento do fluxo é um evento crucial para a maturação vascular. Quando, porém, os fatores angiogênicos são insuficientes e inibidores estão presentes, o neovaso, composto por células endoteliais desnudas, torna-se frágil e sujeito a rupturas e sangramentos: condições que reduzem o fluxo e resultam na regressão do vaso, provavelmente por apoptose da célula endotelial. CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; MEC: matriz extracelular. Adaptado de Carmeliet (2003).

A angiogênese normal ou fisiológica ocorre, mormente, durante o desenvolvimento embrionário (PAPETTI; HERMAN, 2002). É observada, porém, ao longo da vida adulta, em alguns eventos fisiológicos, tais como: ovulação, ciclo endometrial, desenvolvimento da placenta, reparação de feridas (FOLKMAN, 1995; RISAU, 1997; PAPETTI; HERMAN, 2002). Dessa forma, a angiogênese é essencial para o processo de reprodução, desenvolvimento e reparação. Nessas condições, a resposta angiogênica é limitada e rigorosamente controlada, de modo que é ativada por um breve período, sendo, em seguida, completamente inibida (FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1997), no momento em que as demandas metabólicas do tecido em crescimento foram atendidas pela rede vascular neoformada (PAPETTI; HERMAN, 2002).

O controle da angiogênese é feito por um fino balanço entre fatores endógenos promotores (angiogênicos) e inibidores ou angiotáticos (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; PEPPER, 2001; CONTI, 2002). De fato, exceto nas condições fisiológicas enumeradas anteriormente, a célula endotelial do organismo adulto sadio apresenta um tempo de *turnover* muito longo (MALONNE *et al.*, 1999; PEPPER,

2001), que pode exceder 1.000 dias (FOLKMAN, 1995). Durante a angiogênese, porém, o tempo médio de *turnover* é de 5 dias (FOLKMAN; SHING, 1992; FOLKMAN, 1995). Dessa forma, ao longo de quase toda sua existência, a célula endotelial permanece fora do ciclo celular, num estado quiescente, embora mantenha a capacidade de proliferar (FOLKMAN, 1997).

A manutenção da célula endotelial no estado quiescente decorre da ação de reguladores endógenos negativos, uma vez que reguladores positivos são detectados, com freqüência, em tecidos adultos nos quais não se observa angiogênese. Por outro lado, reguladores positivos e negativos freqüentemente coexistem em tecidos nos quais a célula endotelial está ativada (PEPPER, 1997; PEPPER, 2001). Surgiu então o conceito de que o mecanismo regulador da angiogênese é caracterizado pela ação coordenada de fatores indutores e inibidores, onde o balanço entre essas funções antagônicas determina o estado da célula endotelial. Dessa forma, quando os reguladores positivos predominam, a célula endotelial é ativada, tornando-se capaz de proliferar e migrar, ao passo que, quando o domínio é dos reguladores negativos, a célula endotelial se mantém quiescente; um mecanismo análogo ao funcionamento de um dispositivo interruptor (*angiogenic switch*) (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; PEPPER, 1997; PEPPER, 2001). Assim, a ativação da angiogênese pode envolver uma redução na concentração de fatores inibidores e/ou um aumento nos níveis de fatores indutores. A estratégia a ser utilizada pelos diferentes tecidos para induzir angiogênese será determinada pelas suas características fisiológicas (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Esta abordagem para explicar o processo de ativação da angiogênese foi inicialmente usada para descrever, dentro do contexto do crescimento tumoral, a passagem de um estádio pré-vascular para uma fase vascular. Entretanto, tal conceito pode também ser aplicado à angiogênese embrionária, fisiológica e patológica (PEPPER, 1997; PEPPER, 2001).

Diversos fatores de crescimento e citocinas estão envolvidos na regulação da angiogênese. No Quadro 1, enumeram-se os principais fatores pró-angiogênicos. Dentro os agentes indutores de angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) são considerados os mais importantes (PEPPER, 2001; CONTI, 2002).

Fatores indutores	Fatores inibidores
Angiogenina	Angiopoetina-2 (Ang-2)
Angiopoetina-1 (Ang-1)	Angiostatina
Fator de crescimento da placenta (PIGF)	Endostatina
Fator de crescimento de fibroblastos ácido (FGF-1) e básico (FGF-2)	Fator plaquetário IV
Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	Fragmento de antitrombina III
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Fragmento de prolactina 16 kDa
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Glicocorticóides
Fator de crescimento epidérmico / fator de crescimento transformador- $\alpha$ (EGF/TGF- $\alpha$ )	Inibidores de ativadores do plasminogênio (PAIs)
Fator de crescimento insulina-símile (IGF)	Inibidor derivado de cartilagem (CDI)
Fator de crescimento transformador- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)
Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Interferons
Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF)	Interleucina-4
Interleucina-8	Interleucina-12
Proliferina	Proteína relacionada à proliferina
Prostaglandina E <sub>1</sub> e E <sub>2</sub>	Trombospondina-1 (TSP-1)
Timidina fosforilase (TP) / fator de crescimento da célula endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF)	Vasostatina

**QUADRO 1** – Principais fatores endógenos indutores e inibidores de angiogênese (MALONNE *et al.*, 1999; GONZÁLEZ, 2000; ZHANG; BICKNELL, 2001; LONGO *et al.*, 2002; PAPETTI; HERMAN, 2002, FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005).

O VEGF, também chamado de VEGF-A, é um dos membros de uma família de fatores de crescimento que inclui ainda: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento da placenta (PIGF) (FERRARA, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; FERRARA, 2004). O VEGF é o principal regulador tanto da angiogênese fisiológica como da patológica (FERRARA, 2001; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003). É uma glicoproteína que compreende quatro isoformas principais: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>206</sub>, compostas de 121, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente. Outras isoformas são menos freqüentes e incluem: VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>165b</sub>. VEGF<sub>165</sub> constitui a isoforma mais comumente expressada. Tal heterogeneidade molecular é gerada por *splicing* alternativo de um único gene (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). As ações do VEGF são mediadas por dois receptores localizados na membrana celular, que possuem atividade da tirosina-quinase: VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flk-1 / KDR) (FERRARA, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). VEGFR-2 é o responsável pela transmissão do sinal mitogênico, enquanto VEGFR-1 desempenha um papel regulador (TURNER *et al.*, 2003; FERRARA, 2004). Existe ainda um terceiro membro dessa família de receptores, VEGFR-3 (Flt-4), que, porém, não é receptor do VEGF. Liga-se, de fato, a VEGF-C e VEGF-D e está envolvido na regulação da linfangiogênese (FERRARA, 2001; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004).

Os efeitos biológicos do VEGF podem ser assim enumerados: VEGF estimula a migração e proliferação da célula endotelial vascular, constituindo um potente mitógeno para este tipo celular; inibe a apoptose da célula endotelial, agindo, assim, como fator de sobrevida dessa célula; aumenta a permeabilidade vascular, mediada pelo óxido nítrico (NO), possibilitando o extravasamento de proteínas plasmáticas, que resulta na formação de um gel de fibrina extravascular, o qual constitui um substrato para a migração e proliferação da célula endotelial; estimula a produção, pela célula endotelial, de ativadores do plasminogênio (uPA e tPA), do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e da colagenase intersticial, os quais compõem um sistema de proteólise balanceado que promove a remodelação da matriz extracelular (FERRARA, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004).

A concentração local de oxigênio desempenha um papel fundamental na regulação do VEGF. A hipóxia estimula a expressão do VEGF através do aumento da taxa de transcrição do seu gene, mediado pelo fator de transcrição induzido por hipóxia-1 (HIF-1), bem como pelo aumento da estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; PAPETTI; HERMAN, 2002; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). A expressão do VEGF também pode ser induzida por outros fatores de crescimento, tais como: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento insulina-símile-I (IGF-I), FGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). Igualmente, citocinas inflamatórias, como interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), estimulam a produção de VEGF, sugerindo que este fator pode ser o mediador da angiogênese associada a doenças inflamatórias (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). Alguns hormônios são também importantes reguladores do VEGF, entre eles: tireotrofina (TSH), corticotrofina (ACTH), gonadotrofinas (FSH e LH), andrógenos e estrógenos (BROWN *et al.*, 1997; TURNER *et al.*, 2003; FERRARA, 2004). Da mesma forma, a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores aumentam a expressão do VEGF, de modo que este constitui um importante mediador da angiogênese tumoral (BROWN *et al.*, 1997; FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; CONTI, 2002; FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; FERRARA, 2004). Além disso, a produção de VEGF pode ser estimulada pela prostaglandina E<sub>2</sub>, cuja indução, por sua vez, resulta da ação da cicloxigenase-2 (COX-2) (FERRARA, 2004; ROMANO; CLÀRIA, 2003).

A família dos fatores de crescimento de fibroblastos é composta por 22 polipeptídios estruturalmente relacionados (GROSE; DICKSON, 2005; PRESTA *et al.*, 2005). Os dois principais componentes, considerados os protótipos dessa família, são: FGF ácido (FGF-1 ou aFGF) e FGF básico (FGF-2 ou bFGF) (KLEIN; ROGHANI; RIFKIN, 1997; GROSE; DICKSON, 2005; PRESTA *et al.*, 2005). Os FGFs podem interagir com duas classes de receptores. A primeira comprehende um grupo de receptores transmembrana de alta afinidade do tipo tirosina-quinase, que inclui quatro membros: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4 (KLEIN; ROGHANI; RIFKIN, 1997; GONZÁLEZ, 2000; PRESTA *et al.*, 2005). FGF-1 interage com os quatro receptores, enquanto FGF-2 liga-se com maior afinidade a FGFR-1 e FGFR-2

(KLEIN; ROGHANI; RIFKIN, 1997). Os FGFs também se ligam, porém com baixa afinidade, a proteoglicanos sulfato de heparano (HSPGs), que estão presentes na superfície de quase todos os tipos celulares, inclusive o endotélio, bem como na matriz extracelular. Os HSPGs estão envolvidos na regulação da biodisponibilidade dos FGFs, assim como na facilitação da interação desses fatores com os seus receptores de alta afinidade (FGFRs) (KLEIN; ROGHANI; RIFKIN, 1997; GONZÁLEZ, 2000; PRESTA *et al.*, 2005). Entretanto, os efeitos biológicos dos FGFs são mediados via ligação específica aos receptores tirosina-quinases de alta afinidade (KLEIN; ROGHANI; RIFKIN, 1997; PRESTA *et al.*, 2005). Assim, tanto FGF-1 como FGF-2 estimulam a migração e proliferação da célula endotelial, bem como a produção, por esta célula, de ativadores do plasminogênio e proteases. Além disso, FGF-2 modula a expressão de várias integrinas e estimula a célula endotelial a formar estruturas tubulares (KLEIN; ROGHANI; RIFKIN, 1997; PAPETTI; HERMAN, 2002; PRESTA *et al.*, 2005). Todavia, os FGFs não são mitógenos primários da célula endotelial, uma vez que estimulam a proliferação de vários outros tipos celulares (PRESTA *et al.*, 2005), incluindo fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, condrocitos e osteoblastos (FOLKMAN; SHING, 1992; PAPETTI; HERMAN, 2002).

Os inibidores endógenos da angiogênese podem ser divididos em quatro grupos: interferons, fragmentos proteolíticos, interleucinas e inibidores de proteases (PAPETTI; HERMAN, 2002). Na família dos interferons, destacam-se o interferon- $\alpha$  e interferon- $\beta$ , os quais diminuem a expressão de FGF-2 e VEGF (CARMELIET, 2000; PAPETTI; HERMAN, 2002). Dentre as interleucinas, IL-4 e IL-12 são inibidoras da proliferação da célula endotelial (ZHANG; BICKNELL, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002). Os inibidores de proteases impedem a remodelação da matriz extracelular, tornando-a desfavorável para a migração, adesão e formação de tubos pela célula endotelial (PAPETTI; HERMAN, 2002). Pertencem a esse grupo os inibidores de ativadores do plasminogênio (PAIs), inibidores derivados da cartilagem (CDI) (ZHANG; BICKNELL, 2001) e inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), entre os quais: TIMP-1 e TIMP-2 (PAPETTI; HERMAN, 2002). Diversos agentes antiangiogênicos potentes constituem, de fato, fragmentos de proteínas maiores, as quais carecem de atividade inibitória (FOLKMAN, 1997). A maioria desses produtos de clivagem deriva de componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, ou de enzimas como plasminogênio e metaloproteinase da

matriz-2 (MMP-2) (PAPETTI; HERMAN, 2002). Os dois principais membros dessa classe são a angiotatina e a endostatina. A angiotatina, um fragmento interno do plasminogênio, inibe seletivamente a proliferação da célula endotelial e constitui um potente inibidor da angiogênese (O'REILLY, 1997). A endostatina, por sua vez, é um fragmento do colágeno tipo XVIII, sendo também um potente e específico inibidor da proliferação da célula endotelial (PAPETTI; HERMAN, 2002). Um outro importante inibidor da angiogênese é a trombospondina-1 (TSP-1), que está envolvida na modulação da adesão da célula endotelial, na inibição da colagenase, bem como na inibição da proliferação e migração da célula endotelial (ZHANG; BICKNELL, 2001).

A lista de inibidores da angiogênese cresce a cada dia. A função de muitos desses agentes, tanto na angiogênese fisiológica como na patológica, permanece ainda obscura (CARMELIET, 2003). No Quadro 1, destacam-se os principais inibidores.

A angiogênese constitui, pois, um complexo e ordenado processo, onde diversos tipos celulares, como células endoteliais, pericitos, fibroblastos, entre outros, expressam diferentes citocinas e fatores de crescimento, que reagem com outras células ou componentes da matriz extracelular para propiciar a migração, proliferação e formação de tubos pela célula endotelial, assim como a estabilização vascular. Envolve, portanto, mediadores solúveis, interações célula-célula e célula-matriz extracelular, além de forças biomecânicas, como o estabelecimento do fluxo sangüíneo (PAPETTI; HERMAN, 2002).

O processo angiogênico compreende uma seqüência de eventos (a cascata angiogênica) que pode ser dividida em duas fases: crescimento (proliferação) e estabilização (maturação) (VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001). A primeira fase se inicia com a remoção de pericitos do endotélio, desarranjo da parede vascular e desestabilização do vaso, pela ação da angiopoetina-2 (Ang-2). Um aumento da permeabilidade vascular é induzido pelo VEGF e pela caderina do endotélio vascular (VE-caderina), com consequente extravasamento local de proteases. Ocorre, então, a degradação e remodelação da membrana basal e da matriz extracelular por proteases específicas, como as metaloproteinases da matriz. Os eventos seguintes são a migração da célula endotelial através da matriz remodelada, induzida por VEGF, FGFs e integrina- $\alpha_5\beta_3$ , e a proliferação dessa célula, logo atrás da zona de migração, por estímulo de fatores de crescimento como VEGF, FGFs e EGF. Após uma quantidade suficiente de divisões, as células

endoteliais se dispõem em camada única, podendo assim formar estruturas tubulares, que, por sua vez, podem se conectar com outros brotos em formação através de anastomoses. Os fatores FGFs, PDGF e TNF- $\alpha$  estão envolvidos nessa etapa. As junções entre as células endoteliais são mediadas pelas moléculas de adesão VE-caderina e efrina-B2. O surgimento do lume permite então o estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso (CARMELIET, 2000; PEPPER, 2001; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; CARMELIET, 2003).

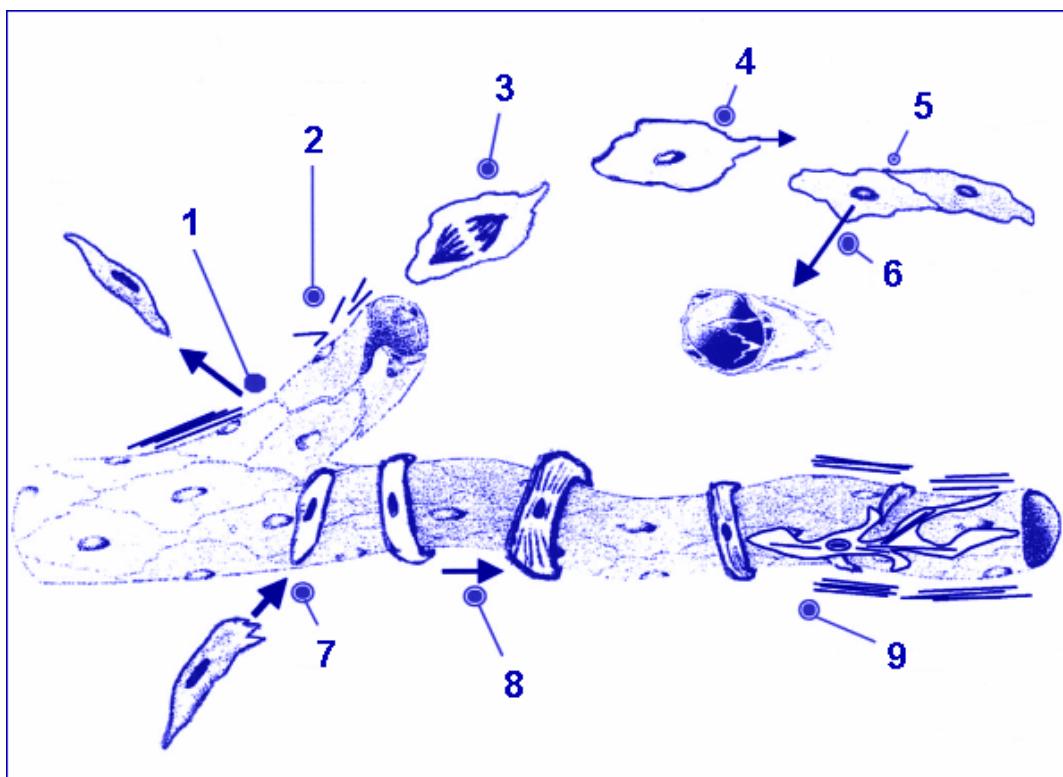
A fase de estabilização compreende a inibição da proliferação e migração da célula endotelial, a reconstrução da membrana basal e a maturação da parede vascular, conferindo durabilidade ao novo vaso. Células murais, pericitos e células musculares lisas, são recrutadas para a superfície do vaso nascente, formando uma cobertura sobre o endotélio desnudo. Essas células se diferenciam a partir dos progenitores mesenquimais, proliferam e migram ao longo do neovaso. Tais ações são mediadas por PDGF, angiopoetina-1 (Ang-1) e TGF- $\beta$ . A estabilização do novo vaso é completada pela mudança da célula endotelial para o estado quiescente, pelo fortalecimento dos complexos juncionais célula-célula e pela elaboração de uma nova matriz. Mediadores como angiopoetina-1, PDGF, VE-caderina e TGF- $\beta$  estão associados a esses eventos. O estabelecimento de fluxo sanguíneo no novo vaso é fundamental para a sua sobrevida, visto que vasos não perfundidos geralmente regredem, enquanto aqueles que adquirem fluxo sanguíneo tornam-se funcionais e parte integrante da rede vascular. Assim, forças hemodinâmicas também contribuem para o processo de remodelação da árvore vascular em formação. A fase de estabilização é, portanto, tão importante quanto a fase de crescimento para o êxito do processo angiogênico. A ausência de estabilização do neovaso implica na sua regressão, provavelmente pela apoptose da célula endotelial (CARMELIET, 2000; PEPPER, 2001; VAILHÉ; VITTET; FEIGE, 2001; PAPETTI; HERMAN, 2002; CARMELIET, 2003). A Figura 3 esquematiza a seqüência de eventos observados durante a angiogênese, enquanto a Figura 2 mostra o processo de estabilização vascular.

Em condições fisiológicas, os diversos mecanismos que regulam o processo angiogênico agem de forma orquestrada, influenciando de forma positiva ou negativa o crescimento vascular, de modo a assegurar que a resposta angiogênica seja proporcional às demandas metabólicas do tecido em crescimento

ou em reparação. Entretanto, certas condições patológicas alteram os mecanismos de controle para propiciar a propagação da doença, como se observa, por exemplo, durante a angiogênese tumoral (PAPETTI; HERMAN, 2002). Nesses casos, a angiogênese anormal — seja excessiva ou deficiente — contribui, sobremaneira, para a patogênese de uma série de doenças que inclui desordens inflamatórias, infecciosas, imunológicas, isquêmicas e malignas: as chamadas doenças dependentes de angiogênese (FOLKMAN, 1995; CARMELIET, 2003). De fato, doenças ou condições onde a angiogênese constitui um dos fatores subjacentes podem ser identificadas em diversos órgãos e sistemas (PEPPER, 1997). Entre as afecções onde se observa exacerbação do processo angiogênico, podem ser citadas: artrite reumatóide, sinovite, psoríase, dermatite alérgica, sarcoma de Kaposi, hemangiomas, aterosclerose, obesidade, retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, retinopatia da prematuridade, glaucoma neovascular, neovascularização corneana, rejeição de transplante de córnea, asma, pólipos nasais, doença intestinal inflamatória, endometriose, crescimento tumoral e metastático (FOLKMAN, 1995; ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; ZHANG; BICKNELL, 2001; CARMELIET, 2003). Outras doenças ou condições decorrem, por outro lado, de uma angiogênese insuficiente ou uma regressão vascular anormal, entre as quais: úlcera gástrica e duodenal, úlcera cutânea crônica, queda de cabelo, retardos na consolidação óssea, osteoporose, pré-eclâmpsia, isquemia cerebral, miocárdica e periférica (FOLKMAN, 1995; ZHANG; BICKNELL, 2001; CARMELIET, 2003).

Algumas evidências sugerem a existência de mecanismos de controle distintos para a angiogênese patológica observada no organismo adulto e a angiogênese fisiológica do período embrionário, embora estas aparentes diferenças possam refletir a ainda incompleta compreensão do processo angiogênico. Tal fato não seria inesperado, visto que as células endoteliais estão frouxamente conectadas e em ativo crescimento no embrião, enquanto no adulto estão quiescentes e encapsuladas por uma espessa camada de células murais. Entre as moléculas com mínimo envolvimento no desenvolvimento da rede vascular embrionária, mas que afetam substancialmente a angiogênese patológica, incluem-se: cicloxygenase-2 (COX-2), PIGF, integrina- $\alpha_1\beta_3$ , inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), óxido nítrico e TSP-2. Outra diferença entre angiogênese fisiológica e patológica diz respeito ao fato de que esta última é freqüentemente induzida pela inflamação.

Assim, monócitos/macrófagos, mastócitos, plaquetas e outros leucócitos são atraídos para os locais de inflamação ou de reparação de ferida, sendo que fatores angiogênicos como VEGF contribuem em parte na promoção dessa quimiotaxia. Tais células produzem então fatores angiogênicos, como VEGF, FGF-2, TGF- $\beta$ 1, interleucina-8, PDGF, proteína quimiotática de monócitos-1, TNF- $\alpha$ , proteinases, que, por sua vez, atraem células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, leucócitos e plaquetas (CARMELIET, 2000).



**FIGURA 3 – Mecanismos da angiogênese fisiológica: seqüência de eventos e seus respectivos mediadores.** 1) Desestabilização do vaso (Ang-2); 2) Aumento da permeabilidade vascular (VEGF, VE-caderina), remodelação da matriz extracelular (proteases); 3) Proliferação da célula endotelial (VEGF, FGF, EGF); 4) Migração da célula endotelial através da matriz remodelada (integrina- $\alpha_1\beta_3$ , VEGF, FGF); 5) Contatos célula-célula (VE-caderina, efrina); 6) Formação de tubos e estabelecimento de fluxo sanguíneo (FGF, PDGF, TNF- $\alpha$ ); 7) Proliferação e migração de células mesenquimais ao longo do novo vaso (PDGF, Ang-1); 8) Diferenciação de células mesenquimais em pericitos (TGF- $\beta$ ); 9) Estabilização do neovaso pela mudança da célula endotelial para o estado quiescente, fortalecimento dos contatos célula-célula e elaboração de uma nova matriz (Ang-1, PDGF, VE-caderina, TGF- $\beta$ ). Adaptado de Papetti e Herman (2002).

Os avanços alcançados ao longo dos anos acerca da compreensão dos mecanismos moleculares e celulares do processo angiogênico possibilitaram o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para combater as doenças dependentes de angiogênese. De um lado está a angiogênese terapêutica, isto é, a possibilidade do uso clínico de fatores pró-angiogênicos naquelas situações onde a

angiogênese é insuficiente, como nas doenças isquêmicas (SCHUMACHER *et al.*, 1998; HENRY, 1999; SIMONS, 2001; LOSORDO; DIMMELER, 2004a, 2004b). O objetivo é restaurar e manter a perfusão tecidual pela estimulação da angiogênese no território isquêmico (PEPPER, 1997; LOSORDO; DIMMELER, 2004a; PRESTA *et al.*, 2005).

Do outro lado, destaca-se a aplicação clínica de agentes antiangiogênicos naquelas condições caracterizadas por angiogênese excessiva, mormente o câncer, ou seja, a terapia antiangiogênica (PEPPER, 1997; ZHANG; BICKNELL, 2001; LONGO *et al.*, 2002; GASPARINI *et al.*, 2005). Os diversos agentes inibidores de angiogênese podem atuar em diferentes alvos ao longo do processo angiogênico. Classificam-se em inibidores diretos, indiretos e mistos. Os diretos têm como alvo a célula endotelial, inibindo a sua migração, proliferação ou a sua capacidade de formar novos vasos. Os inibidores indiretos interferem na produção de fatores angiogênicos por células malignas, estromais e inflamatórias. Os inibidores mistos têm como alvo tanto a célula endotelial como a célula maligna (LONGO *et al.*, 2002; GASPARINI *et al.*, 2005).

Vários ensaios clínicos avaliaram ou estão avaliando a eficácia de diversos inibidores de angiogênese, mormente no que se refere à terapia anticâncer (FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005; GASPARINI *et al.*, 2005). Os relatos preliminares sugerem que a terapia antiangiogênica com um único agente é pouco eficaz em tumores avançados (CARMELIET, 2003; GASPARINI *et al.*, 2005). Por outro lado, a combinação da terapia antiangiogênica com a quimioterapia convencional parece mais promissora. Ensaios clínicos mostraram que a associação da quimioterapia com um inibidor de angiogênese proporcionava melhores benefícios. Como exemplo, citam-se os resultados positivos obtidos com a combinação do bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGF que inibe a atividade de todas as isoformas desse fator, com a quimioterapia tradicional no tratamento do câncer colorretal metastático (FERNANDO; HURWITZ, 2004; HURWITZ *et al.*, 2004; FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005; GASPARINI *et al.*, 2005).

Resultados satisfatórios também foram relatados após o tratamento de certos tumores com pequenas moléculas denominadas inibidores de tirosina-quinases. Alguns desses fármacos bloqueiam, ainda que de forma não seletiva, a atividade da tirosina-quinase dos receptores do VEGF, sendo, portanto, inibidores de

angiogênese (ARORA; SCHOLAR, 2005; MORABITO *et al.*, 2006). Entre eles, destacam-se o sunitinib e o sorafenib, os quais são administrados por via oral e inibem a atividade da tirosina-quinase dos três receptores do VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) (MOTZER *et al.*, 2006; WILHELM *et al.*, 2006). O sunitinib é utilizado no tratamento do carcinoma de células renais avançado (MOTZER *et al.*, 2006) e do tumor estromal gastrintestinal (DEMETRI *et al.*, 2006), enquanto o sorafenib é igualmente empregado no tratamento do carcinoma de células renais avançado (WILHELM *et al.*, 2006).

O advento dos fármacos antiangiogênicos também proporcionou novas opções terapêuticas para as doenças oftalmológicas dependentes de angiogênese, sobretudo a forma neovascular da degeneração macular relacionada à idade (WIJNGAARDEN; COSTER; WILLIAMS, 2005). Nessa afecção, estudos demonstraram claros benefícios com o tratamento, por via intravítreia, com os seguintes inibidores de VEGF: pegaptanib, um aptâmero de ácido ribonucleico com 28 bases nitrogenadas (oligonucleotídeo), que se liga e bloqueia especificamente a isoforma VEGF<sub>165</sub> (GRAGOUDAS *et al.*, 2004; KURLAS; SCHILLER, 2006; ZHOU; WANG, 2006); ranibizumab, um fragmento de anticorpo monoclonal anti-VEGF, que inibe a atividade de todas as isoformas do VEGF (FERRARA *et al.*, 2006; DUGEL, 2006); como também o próprio bevacizumab (AVERY *et al.*, 2006; SPAIDE *et al.*, 2006).

Entretanto, apesar de alguns resultados promissores, persiste o desafio de aprofundar o conhecimento das bases moleculares das doenças dependentes de angiogênese, notadamente o câncer, de modo a propiciar o desenvolvimento de terapias antiangiogênicas mais eficazes e seguras.

## 1.2 Ensaio de angiogênese em córnea

Vários modelos para estudo de angiogênese foram desenvolvidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, com o intuito de desvendar os mecanismos envolvidos no processo angiogênico, bem como realizar ensaios pré-clínicos para selecionar drogas cujos alvos sejam tais mecanismos e que possam ser incorporadas ao arsenal terapêutico das doenças dependentes de angiogênese. O ensaio de angiogênese ideal deve ser simples, reproduzível e de baixo custo, além de permitir uma adequada análise quantitativa da resposta angiogênica (HASAN *et al.*, 2004;

TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Os ensaios *in vitro* provêem uma fácil e rápida análise, permitindo, inclusive, a reprodução de uma única ou de algumas etapas específicas do processo angiogênico. Entretanto, os seus dados não podem ser considerados conclusivos, necessitando confirmação em ensaios *in vivo*. Estes, por sua vez, são usualmente mais complexos e dispendiosos, além de requererem habilidades cirúrgicas específicas (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004).

Os ensaios *in vivo* devem possibilitar a formação e maturação de novos vasos em um ambiente natural, além de permitir o monitoramento temporal, preferencialmente de forma não invasiva, e uma adequada e rápida quantificação da resposta angiogênica (JAIN *et al.*, 1997; TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Nenhum dos modelos já desenvolvidos satisfaz completamente esses requisitos (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Cada um apresenta vantagens e limitações que lhe são peculiares. Assim, o ensaio de angiogênese ideal não existe, de modo que, muitas vezes, é necessário o uso de mais de um modelo com características complementares (HASAN *et al.*, 2004).

Os principais ensaios de angiogênese *in vivo* incluem: microbolsa na córnea de coelho, rato ou camundongo; membrana corioalantóidea (CAM) de embrião de pinto; câmaras transparentes na orelha de coelho, na bolsa jugal de hamster, no crânio ou numa prega de pele no dorso de ratos e camundongos; janela mesentérica em ratos e camundongos; saco de ar dorsal em ratos e camundongos; implante de uma matriz biocompatível, natural ou sintética, que serve de suporte para a neovascularização (esponja, matrigel, alginato); implante subcutâneo de células tumorais (JAIN *et al.*, 1997; ANDRADE, 2001; JAIN; MUNN; FUKUMURA, 2002; HASAN *et al.*, 2004; TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Alguns desses ensaios permitem o acompanhamento da progressão temporal da resposta neovascular, uma vez que a angiogênese é induzida num local acessível, seja ele natural (córnea) ou criado artificialmente (câmaras). Outros permitem apenas uma avaliação pontual (matrigel). Em alguns desses modelos, a neovascularização é induzida num ambiente previamente avascular, seja natural (córnea) ou exógeno (esponja, matrigel). Em outros, porém, a presença de uma rede vascular natural (CAM, câmaras) dificulta sobremaneira a análise quantitativa (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004).

O mais tradicional e um dos modelos mais utilizados é o ensaio de angiogênese em córnea (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Nesse modelo, um

estímulo artificialmente induzido na córnea promove uma resposta angiogênica, principalmente pelo mecanismo de brotamento, caracterizada pelo crescimento de neovasos, derivados do plexo vascular límbico, no estroma corneano, em direção ao local do estímulo angiogênico (HASAN *et al.*, 2004). É considerado um dos melhores ensaios *in vivo*, uma vez que a córnea é uma estrutura avascular, transparente e de fácil acesso e observação (Figura 4), de modo que qualquer vaso sanguíneo que cresça no seu estroma decorre do estímulo angiogênico utilizado (ZICHE, 2001; AUERBACH *et al.*, 2003). Tais peculiaridades anatômicas facilitam o monitoramento direto da resposta neovascular, de forma não invasiva, e permitem inclusive a aplicação tópica da droga em teste (KENYON *et al.*, 1996). Além disso, os neovasos, originados a partir do plexo vascular límbico, podem ser detectados na córnea mesmo na fase inicial da neovascularização (BECKER *et al.*, 1998).



**FIGURA 4** – Córnea de coelho. A córnea é uma estrutura avascular, transparente e de fácil acesso, de modo que propicia um monitoramento direto da resposta angiogênica.

Assim, uma característica interessante dos ensaios de angiogênese em córnea é a possibilidade de múltiplas observações numa mesma unidade experimental, proporcionando o acompanhamento temporal e espacial do processo angiogênico por um longo período (CONRAD *et al.*, 1994; ZICHE, 2001).

Vários foram então os modelos descritos para o estudo de angiogênese em córnea, seja de coelho, rato ou camundongo, nos quais o potencial angiogênico de células e substâncias pode ser determinado (YOSHIDA *et al.*, 2003b). Uma das técnicas consiste na injeção intra-estromal de substâncias (KENYON *et al.*, 1996;

STECHSCHULTE *et al.*, 2001) ou ainda o implante intra-estromal de células, de natureza neoplásica ou não (CONRAD *et al.*, 1994; KENYON *et al.*, 1996).

A técnica mais difundida, porém, consiste na elaboração de uma microbolsa no estroma corneano, mediante a separação das lamelas estromais, a partir de uma incisão central, em direção à periferia da córnea, até uma dada distância do limbo córneo-escleral — cerca de 2,5 mm no coelho (ZICHE, 2001). Esta técnica foi descrita inicialmente por Gimbrone *et al.* (1974) para uso em coelhos, sendo posteriormente modificada para uso em ratos e camundongos (KENYON *et al.*, 1996). No interior da microbolsa, podem então ser introduzidos fragmentos de tecidos não neoplásicos (BREM; FOLKMAN, 1975; MOULTON *et al.*, 2003; KONYA *et al.*, 2005) ou tumorais (GIMBRONE *et al.*, 1974; GROSS *et al.*, 1981), ou ainda suspensões de células (ZICHE *et al.*, 1997; MARCONCINI *et al.*, 1999; SAITA *et al.*, 2000). Mais comumente, porém, são implantados *pellets* de liberação lenta, preparados com polímeros inertes, aos quais são incorporados fatores pró-angiogênicos, como VEGF ou FGF-2, ou drogas antiangiogênicas. São utilizados os polímeros poli-hidroxietilmetacrilato (D'AMATO *et al.*, 1994; CAO *et al.*, 1996; KENYON *et al.*, 1996; VOLPERT *et al.*, 1996; GU *et al.*, 1999; O'LEARY *et al.*, 1999; SCHWARZ *et al.*, 1999; MASFERRER *et al.*, 2000; HERNÁNDEZ *et al.*, 2001; KUO *et al.*, 2001; SHAN *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2004; KUWANO *et al.*, 2004; USUI *et al.*, 2004), etilenovinilacetato copolímero (GROSS *et al.*, 1981; ZICHE *et al.*, 1994; BENEZRA *et al.*, 1997; ZICHE *et al.*, 1997; MARCONCINI *et al.*, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000) e menos comumente polimetilmetacrilato (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Fatores pró-angiogênicos também podem ser incorporados a *pellets* de metilcelulose (BECKER *et al.*, 1998; KRUSE *et al.*, 1998; JOUSSEN *et al.*, 1999; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999). O implante de *pellets* de liberação lenta contendo um fator pró-angiogênico provê uma resposta neovascular persistente e agressiva, dependente da estimulação direta pelo fator utilizado e não de estímulos indiretos decorrentes da indução de inflamação (KENYON *et al.*, 1996; GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Por outro lado, tal procedimento demanda habilidade técnica e tempo para a sua execução, além de ser dispendioso. Todavia, a microbolsa corneana é considerada por muitos o ensaio padrão-ouro para o estudo de angiogênese *in vivo* (HASAN *et al.*, 2004).

Outra técnica bastante utilizada é a indução de angiogênese inflamatória na córnea, seja mediante uma lesão mecânica (CONRAD *et al.*, 1994; ZHENG *et al.*, 2001a), térmica (ROBIN *et al.*, 1985) ou, mais comumente, uma cauterização química. A substância química mais utilizada para a realização da cauterização é o nitrato de prata, seja isoladamente (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991; SENNLAUB; COURTOIS; GOUreau, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; KON *et al.*, 2003; PINTO; MALUCELLI, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2003b; SONODA *et al.*, 2005) ou em associação com o nitrato de potássio na proporção de 3:1 (GLAT; KLINTWORTH, 1986; PROIA *et al.*, 1988; CONRAD *et al.*, 1994; BENELLI *et al.*, 1998; BOCCI *et al.*, 1999; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; ZHANG; LI; BACIU, 2002; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004). Em ambos os casos, é usado geralmente no estado sólido, na forma de bastão. Um aplicador apropriado promove o contato com a córnea durante alguns segundos, determinando uma cauterização localizada.

O hidróxido de sódio também é utilizado para induzir neovascularização corneana inflamatória. Entretanto, é empregado na forma de solução, que é instilada na superfície da córnea, provocando uma lesão difusa do epitélio, o qual é, em seguida, removido. A finalidade é simular ceratopatias que evoluem com neovascularização (SOTOZONO *et al.*, 1999; MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; GÖTTE *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2002; AMBATI *et al.*, 2003; JOUSSEN *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2005).

Nos bioensaios de angiogênese em córneas que envolvem a cauterização química, a neovascularização é induzida pela inflamação, a partir da vasculatura límbica. Trata-se, pois, de um estímulo neovascular indireto e inespecífico (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991; KENYON *et al.*, 1996). Por outro lado, constituem modelos de angiogênese e inflamação de baixo custo, fácil reprodução e quantificação (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). Dessa forma, são mais indicados para a triagem de drogas com atividade antiangiogênica. Além disso, são mais vantajosos que a microbolsa com implante de *pellets* contendo um fator pró-angiogênico específico, quando o objetivo é estudar a neovascularização inflamatória decorrente de diversas doenças corneanas (JOUSSEN *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2003b).

Uma outra técnica para indução de neovascularização corneana, apesar de menos comumente usada, consiste na realização de uma sutura na córnea. No coelho, implanta-se um ponto único com fio de seda 7-0 a aproximadamente 1 mm

do limbo, envolvendo cerca de metade da espessura corneana (HOLZER *et al.*, 2003). No camundongo, utiliza-se fio de seda 8-0, que é colocado no centro da córnea como ponto único, envolvendo toda sua espessura (SAMOLOV *et al.*, 2005). Alternativamente, podem ser implantados 3 pontos intra-estromais com fio de náilon 11-0, cada um abrangendo cerca de 120° da circunferência corneana, os quais são removidos após 7 dias (CURSIEFEN *et al.*, 2004a; CURSIEFEN *et al.*, 2004b; MARUYAMA *et al.*, 2005). Nesses casos, o estímulo angiogênico também é indireto, decorrente da reação inflamatória que se instala.

### **1.3 Métodos manuais de quantificação de angiogênese em córnea**

Tão fundamental quanto desenvolver bioensaios de angiogênese é estabelecer métodos acurados e reproduutíveis para quantificar a resposta neovascular e, assim, mensurar o efeito do estímulo angiogênico ou avaliar a eficácia de potenciais inibidores (CONRAD *et al.*, 1994; ZICHE, 2001). Nesse sentido, descreveram-se diversos métodos para quantificar a angiogênese corneana. Os mais simples consistem em verificar se a neovascularização está presente ou ausente (GLAT; KLINTWORTH, 1986; PROIA *et al.*, 1988), ou se os vasos neoformados alcançaram o local do estímulo, o que seria considerado uma resposta positiva (PROIA *et al.*, 1988; VOLPERT *et al.*, 1996; VOLPERT *et al.*, 1998; HERNÁNDEZ *et al.*, 2001). O crescimento neovascular pode ainda ser expresso através de uma escala de graduação: 0 a 3 ou 0 a 4. Na primeira escala, grau 0 denota ausência; grau 1, leve; grau 2, moderada e grau 3, intensa atividade angiogênica (KONYA *et al.*, 2005). Na segunda, os valores representam, em termos percentuais, o quanto da área entre o limbo e o estímulo está sendo ocupada pela neovascularização: grau 0, ausência de angiogênese; 1, 1 a 25%; 2, 26 a 50%; 3, 51 a 75%; 4, acima de 75% (VASSE *et al.*, 1999; MURATA *et al.*, 2006). Outra forma de estimar a angiogênese corneana é através da contagem do número total de neovasos na córnea (BREM; FOLKMAN, 1975), do número de neovasos que partem do limbo em direção ao estímulo (JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999; SCHWARZ *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2001b; LEE *et al.*, 2002; JEONG *et al.*, 2003) ou ainda do número de neovasos na fronteira de crescimento da zona de neovascularização (KRUSE *et al.*, 1998; JOUSSEN *et al.*, 1999).

Usualmente, o comprimento vascular radial máximo, equivalente à distância entre o limbo e a extremidade central do maior vaso (GROSS *et al.*, 1981; CAO *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1996; VOEST *et al.*, 1995; KENYON *et al.*, 1996; CAO *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 1999; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999; JOUSSEN *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2001; SEO *et al.*, 2001; EKSTRAND *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2003), ou médio, correspondente à média das medidas do comprimento vascular radial em pontos determinados da área de neovascularização (BREM; FOLKMAN, 1975; MASFERRER *et al.*, 2000; LEAHY *et al.*, 2002), são utilizados como parâmetros para quantificar a atividade angiogênica. O comprimento vascular radial é geralmente acompanhado pela determinação do arco da circunferência corneana envolvido pela neovascularização, cuja medida pode ser representada pelo seu comprimento ou pelo ângulo central correspondente; sendo este medido em graus ou mais comumente expresso como horas do relógio, onde 1 hora equivale a 30° (CAO *et al.*, 1995; VOEST *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1996; KENYON *et al.*, 1996; CAO *et al.*, 1998; CAO *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2001; SEO *et al.*, 2001; EKSTRAND *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2003). Sob visão microscópica (estereomicroscópio ou biomicroscópio), tais parâmetros podem ser mensurados mediante o uso de um paquímetro (JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999; WU *et al.*, 2003) ou de uma ocular apropriada (micrômetro ocular), equipada com uma escala linear com precisão de décimos de milímetro (GIMBRONE *et al.*, 1974; KENYON *et al.*, 1996; ZICHE, 2001) ou uma escala angular em graus (KENYON *et al.*, 1996; SEO *et al.*, 2001).

As medidas do comprimento vascular radial e do arco da circunferência corneana correspondente à zona de angiogênese podem ser combinadas para calcular áreas que constituem uma aproximação ou estimativa da real área ocupada pela neovascularização. Sendo assim, tais parâmetros podem ser relacionados à base e à altura de um triângulo, cuja área seria então facilmente determinada (PROIA *et al.*, 1988; CONRAD *et al.*, 1994; BENEZRA *et al.*, 1997), ou aos eixos maior e menor de uma elipse e assim calcular o valor de metade de sua área — a região de angiogênese corresponderia à superfície de uma semi-elipse (KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997; O'LEARY *et al.*, 1999; SCHWARZ *et al.*, 1999; KUO *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001b; LEE *et al.*, 2002; ZHENG *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004). Podem ainda ser associados ao raio da córnea para compor a expressão que

calcula a área de um setor de coroa circular (D'AMATO *et al.*, 1994; MASFERRER *et al.*, 2000; SEO *et al.*, 2001; LEAHY *et al.*, 2002).

Uma outra abordagem consiste em determinar um índice de angiogênese através da multiplicação do comprimento vascular radial pela densidade de vasos, isto é, o número de neovasos observados na extremidade distal (fronteira de crescimento) da zona de neovascularização (número de vasos distais), normalizado para o intervalo de 1 a 5. Dessa forma, quando o número de neovasos está entre 0 e 25, normaliza-se para o valor 1; entre 26 e 50, para o valor 2; entre 51 e 75, para o valor 3; entre 76 e 100, para o valor 4; acima de 100, normaliza-se para o valor 5 (ZICHE *et al.*, 1994; ZICHE *et al.*, 1997; MARCONCINI *et al.*, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2001; ZICHE, 2001).

Glat e Klintworth (1986) propuseram uma técnica morfométrica baseada no princípio de que o comprimento de uma linha curva é proporcional ao número de vezes que esta intercepta uma grade de linhas paralelas a ela sobreposta. De acordo com esse método, após a indução de neovascularização corneana mediante a cauterização com nitrato de prata, camundongos eram submetidos a perfusão com tinta da Índia, que é composta de partículas pretas em estado coloidal. Dessa forma, o sangue era substituído pela tinta da Índia e os vasos, por ela preenchidos, rotulados na cor preta. Em seguida, o olho era enucleado e colocado em substância fixadora por no mínimo 24 horas. Após isto, a córnea era removida, mantendo-se um anel de tecido escleral adjacente, e aplanada através de três incisões radiais periféricas, possibilitando assim a montagem em lâminas (*flat-mounted cornea*). Fotografias convencionais da córnea montada eram obtidas, às quais uma grade de linhas horizontais, paralelas e descontínuas era sobreposta. O comprimento vascular total era então avaliado de forma indireta pela determinação do número de intersecções entre as linhas da grade e os vasos corneanos preenchidos pela tinta da Índia.

A técnica de enfatização da neovascularização corneana mediante a perfusão com tinta da Índia — e subsequente remoção, aplanamento (através de 3 ou 4 incisões radiais) e montagem da córnea em lâminas — é bastante utilizada (PROIA *et al.*, 1988; BENELLI *et al.*, 1998; BOCCI *et al.*, 1999; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; GU *et al.*, 1999; SENNLAUB; CURTOIS; GOUREAU, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; SHAN *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001a; WHITE *et al.*, 2003), uma vez que facilita sobremaneira a quantificação da resposta angiogênica, seja por

métodos manuais ou automáticos. Todavia, permite apenas uma única mensuração, já que o animal necessita ser sacrificado. Em outros estudos, em vez de tinta da Índia, utilizou-se o carbono coloidal como marcador vascular (GIMBRONE *et al.*, 1974; BREM; FOLKMAN, 1975; VOLPERT *et al.*, 1996; VOLPERT *et al.*, 1998; KON *et al.*, 2003; PINTO; MALUCELLI, 2002).

#### **1.4 Métodos automáticos de quantificação de angiogênese em córnea**

Todos os métodos descritos até aqui podem ser classificados como manuais e quantificam a resposta angiogênica de forma indireta, subjetiva e pouco precisa (PARKE *et al.*, 1988; CONRAD *et al.*, 1994; ZICHE, 2001). Alguns constituem procedimentos tediosos e que demandam um tempo significativo para realizá-los. Além disso, todos estão sujeitos a vieses por parte de quem os executa.

Pelas suas peculiaridades, os computadores se tornaram, com o tempo, ferramentas indispensáveis para facilitar e tornar mais objetivo o processo de quantificação de angiogênese. Os primeiros métodos de quantificação de angiogênese corneana assistidos por computador foram descritos na segunda metade da década de 80 (GLAT; KLINTWORTH, 1986; PROIA *et al.*, 1988). Técnicas de processamento de imagens digitais possibilitaram a implementação de tais métodos. Entretanto, para realçar os vasos sanguíneos, a maioria das técnicas descritas desde então requer a realização de perfusão com um meio de contraste, como tinta da Índia ou, mais recentemente, compostos fluorescentes. Conseqüentemente, a córnea necessita ser removida, preparada e montada em lâminas, como anteriormente descrito. Trata-se, portanto, de medições pontuais.

Glat e Klintworth (1986) descreveram uma técnica, denominada de planimetria computadorizada, para mensuração do comprimento vascular total. Para tanto, com o auxílio de um planímetro computadorizado, delineava-se o traçado de cada vaso pertencente à zona de neovascularização, previamente rotulada com tinta da Índia, em fotografias convencionais da córnea. Ao final do processo, ou seja, após o delineamento de toda a rede vascular, o computador fornecia uma medida correspondente à soma de todos os segmentos traçados.

Proia *et al.* (1988) relataram um método para quantificar a neovascularização em imagens digitais, em tons de cinza, de córneas de rato cauterizadas com nitrato de prata/nitrato de potássio e montadas em lâminas, após

perfusão com tinta da Índia. Um programa de computador analisava as imagens e determinava: a área total da córnea, após a delimitação do seu perímetro pelo operador; a área ocupada pela neovascularização, mediante a identificação dos níveis de cinza que representavam os neovasos rotulados pela tinta da Índia; e o percentual da área de neovascularização em relação à área da córnea. Outros pesquisadores usaram um método semelhante para quantificar angiogênese em córneas submetidas tanto a cauterização (BENELLI *et al.*, 1998; BOCCI *et al.*, 1999; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; SENNLAUB; CURTOIS; GOUreau, 1999; PINTO; MALUCELLI, 2002) como a implante de *pellets* (GU *et al.*, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; SHAN *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2003).

Mais recentemente, tornou-se freqüente o uso de marcadores vasculares fluorescentes, como lectinas conjugadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se ligam à célula endotelial vascular (MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; GÖTTE *et al.*, 2002), ou dextrana conjugada com FITC (AUERBACH, 2003; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; HASAN *et al.*, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005), para realçar a neovascularização corneana. Tal abordagem decerto tornar-se-á o método de escolha (AUERBACH, 2003), pois permite uma medida mais precisa da angiogênese (ZICHE, 2001). Para tanto, realiza-se a perfusão do animal, geralmente camundongo, com esses compostos, seguida da enucleação do olho, remoção e montagem da córnea em lâmina. Após isto, a córnea montada é colocada em um microscópio de fluorescência, que propicia o exame dos vasos sanguíneos fluorescentes, os quais são vistos na cor verde. Imagens digitais podem ser obtidas e a área de fluorescência, que corresponde à zona de neovascularização, pode ser mensurada através de processamento de imagens (MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; STECHSCHULTE *et al.*, 2001; GÖTTE *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2002; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; POULAKI *et al.*, 2004; USUI *et al.*, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005).

A imuno-histoquímica também pode ser usada para evidenciar a neovascularização corneana. Para tanto, após a remoção e montagem da córnea em lâmina, a peça é submetida a tratamento imuno-histoquímico que utiliza anticorpo contra a molécula de adesão plaqueta-célula endotelial (CD31 / PECAM-1) conjugado com FITC para marcar os vasos sanguíneos. Em seguida, a córnea é colocada em um microscópio de fluorescência, onde imagens digitais dos vasos fluorescentes podem ser obtidas e a área a eles correspondente facilmente

determinada por sistemas analisadores de imagens (AMBATI *et al.*, 2003; CURSIEFEN *et al.*, 2004a; CURSIEFEN *et al.*, 2004b; BISWAS *et al.*, 2005; MARUYAMA *et al.*, 2005).

A enfatização da neovascularização com tinta da Índia ou fluorescência e a subsequente remoção e preparação da córnea determinam a realização de uma única avaliação. Isto impede observações múltiplas numa mesma unidade experimental, além de requerer um grande número de animais para a implementação dos experimentos. Alguns pesquisadores tentaram contornar esse problema propondo abordagens não invasivas, nas quais o aumento do contraste dos neovasos era obtido mediante o uso de recursos ópticos, propiciando assim medições múltiplas da resposta angiogênica num mesmo animal. Parke *et al.* (1988) obtinham fotografias da córnea utilizando uma câmera convencional equipada com um filtro verde. Imagens dos negativos das fotografias eram captadas por uma câmera de vídeo conectada a um analisador de imagens que então determinava a área correspondente à neovascularização. Os autores, porém, não relataram como era feito o enquadramento da zona de angiogênese nem como era calculada a área. Conrad *et al.* (1994) descreveram um método mais completo para aquisição das imagens, realce dos neovasos e subsequente cálculo da área de neovascularização. A aquisição das imagens era feita por um complexo aparato que propicia um adequado alinhamento entre a córnea e o dispositivo de captura, mas que requeria a realização de fotografias da zona de angiogênese a cada 15 graus, as quais eram posteriormente montadas para formar uma única imagem. A enfatização dos neovasos era conseguida através do uso de um filtro do tipo passa-banda, que selecionava uma estreita faixa de comprimento de onda de luz, centrada no pico de absorção da hemoglobina, fazendo com que os vasos se tornassem mais escuros contra um fundo claro.

Alternativamente, diapositivos da área de neovascularização corneana podem ser obtidos, os quais são projetados numa folha de papel apropriada. Com uma caneta de cor preta delineia-se manualmente o trajeto dos vasos na folha de papel. Um *scanner* é então utilizado para a aquisição de imagens digitais da rede vascular manualmente delineada, cuja área é facilmente determinada por sistemas de processamento de imagens (MOHAN *et al.*, 2000).

Eventualmente, imagens digitais da córnea, seja *in vivo* ou após tratamento para evidenciar a neovascularização, são obtidas e processadas por

softwares com o objetivo de determinar parâmetros próprios dos métodos manuais de quantificação de angiogênese, tais como: o comprimento vascular radial ou o arco de neovascularização (SENNLAUB; CURTOIS; GOUreau, 1999; SAITA *et al.*, 2000; SHAN *et al.*, 2001; KON *et al.*, 2003; PINTO; MALUCELLI, 2002; WHITE *et al.*, 2003). Tais imagens também possibilitam o delineamento, com o *mouse*, do contorno ou perímetro da região de neovascularização corneana, cuja área pode então ser calculada (BENELLI *et al.*, 1998; KLOTZ *et al.*, 2000; SHAN *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003; KUWANO *et al.*, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005). Esta, por sua vez, representa melhor a real área de neovascularização do que as áreas do triângulo, semi-elipse ou do setor de coroa circular anteriormente descritas.

## 1.5 Relevância e justificativa

Os métodos automáticos para quantificação de angiogênese corneana expressam a resposta neovascular apenas como a área ocupada pelos neovasos. Na literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo que descrevesse um método para calcular, de forma automática, o número de vasos ou o comprimento vascular total da árvore neovascular. Além disso, os métodos que determinam automaticamente a área de neovascularização dependem da enfatização prévia dos neovasos, seja por meios de contraste ou mediante o emprego de recursos ópticos. Tais métodos costumam ser dispendiosos, complexos e geralmente não permitem o monitoramento contínuo da angiogênese *in vivo*. Ademais, na maioria das vezes, utilizam sistemas analisadores de imagens de uso geral, que não são específicos para essa tarefa.

Sendo assim, o desenvolvimento de uma ferramenta computacional própria, simples, de fácil manipulação e específica para a quantificação de angiogênese em córneas constituiu a motivação maior para a realização deste estudo. A ferramenta deverá quantificar a resposta angiogênica de forma rápida, objetiva e acurada, através do cálculo da área de neovascularização, do número total de neovasos e do comprimento vascular total. Além disso, proporcionará o monitoramento temporal e espacial do processo angiogênico, *in vivo*, uma vez que permitirá medições múltiplas num mesmo animal, de forma não invasiva, sem a necessidade de meios de contraste, pois o realce dos neovasos será obtido mediante o emprego de técnicas de processamento de imagens digitais. O software

deverá ser ainda suficientemente robusto para permitir futuras modificações que propiciem a quantificação de angiogênese em outros modelos, bem como a realização de análises morfométricas em outras situações, como, por exemplo, em imagens radiográficas, ultra-sonográficas e histopatológicas.

Ademais, uma diversidade de substâncias com potencialidades terapêuticas são estudadas nos laboratórios da Universidade Federal do Ceará, oriundas tanto da flora como da fauna locais. Algumas dessas substâncias têm certamente ação antiangiogênica que necessita então ser investigada, tendo em vista a crescente importância da terapia antiangiogênica no tratamento das doenças dependentes de angiogênese, sobretudo o câncer. Sendo assim, surgiu a necessidade de estabelecer um modelo de angiogênese corneana com a finalidade de triar drogas com atividade antiangiogênica. Entretanto, contrariando a maioria dos atuais modelos, que são complexos e onerosos, o modelo proposto deverá ser simples, de baixo custo e fácil reprodução, além de possibilitar o monitoramento temporal da resposta angiogênica. Por fim, tal modelo constituirá a base para a validação do método automático proposto.

Portanto, o modelo de angiogênese corneana e o método automático de quantificação propostos são interdependentes. O primeiro induzirá uma resposta angiogênica que será documentada na forma de imagens digitais. O segundo, por sua vez, processará tais imagens, realizando uma análise quantitativa da resposta neovascular e, por conseguinte, do efeito antiangiogênico da droga em teste.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Desenvolver e validar um método para quantificação automática de angiogênese corneana *in vivo*.

### 2.2 Específicos

Estabelecer um modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho.

Desenvolver um programa de computador para a segmentação e quantificação, *in vivo*, de angiogênese em córnea de coelho.

Validar o método automático tomando-se como base o modelo de angiogênese corneana inflamatória.

Avaliar o efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático proposto.

### 3 MÉTODO

O estudo foi realizado conforme o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Universidade Federal do Ceará, em 10 de dezembro de 2003 (Protocolo Nº 07/03; Anexo A), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, brancos, da raça Nova Zelândia (Figura 5), saudáveis, com idade entre 90 e 120 dias e peso variando entre 1.800 e 2.700 gramas, procedentes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, os quais foram previamente examinados para exclusão de doenças oculares externas.

Os coelhos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, alojados em gaiolas específicas para a espécie: gaiolas individuais de 50x50x50 cm e coletivas de 80x50x60 cm, estas com capacidade para abrigar até 3 animais adultos. Permaneceram em um ambiente climatizado, com condições adequadas de temperatura e umidade, e com iluminação apropriada, observando-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Ofereceram-se água e alimento *ad libitum*. Este último consistia de ração balanceada própria para coelhos (Fri-Coelhos®, DISPA – Indústria de Rações, Maracanaú – CE).



**FIGURA 5** – Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) brancos da raça Nova Zelândia.

Os animais foram submetidos a um período de adaptação de pelo menos sete dias, que precedeu a realização dos procedimentos. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microcirurgia, parte integrante do Laboratório de Cirurgia Experimental.

### **3.1 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho**

O modelo proposto consiste na indução de angiogênese inflamatória em córnea de coelho mediante uma cauterização pontual com hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 1 molar (M). Sendo assim, delineou-se um experimento para verificar a viabilidade e estabelecer as características da resposta angiogênica no modelo proposto, no qual foram utilizados 18 coelhos.

Para a realização do procedimento de cauterização, bem como dos exames subseqüentes, os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de cetamina a 5% (Vetanarcol<sup>®</sup>, König do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba – SP), 12 mg/kg de peso corporal, associado a cloridrato de xilazina a 2% (Kensol<sup>®</sup>, König do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba – SP), 4 mg/kg de peso, complementada com a instilação, no saco conjuntival, de 2 gotas do anestésico tópico cloridrato de proximetacaína, solução oftálmica a 0,5% (Anestalcon<sup>®</sup>, Alcon Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo – SP). Cada animal foi observado até tornar-se alerta e, em seguida, devolvido à sua gaiola.

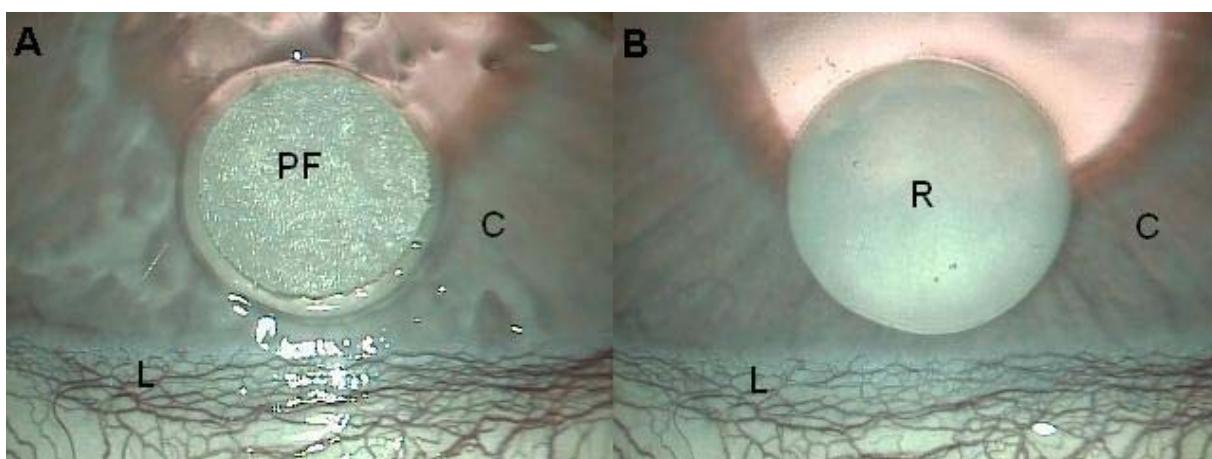
Uma vez anestesiado, acomodava-se o animal numa base de isopor, em decúbito lateral, esquerdo ou direito, dependendo do olho a ser operado, e com o dorso voltado para o examinador. A seguir, colocava-se um blefarostato do tipo graduável, que propicia um adequado afastamento das pálpebras, expondo quase toda a superfície da córnea e a região límbica superior (Figura 6).

Doze coelhos foram então submetidos a uma cauterização alcalina pontual na periferia superior da córnea direita, com o auxílio de um microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M90, D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP) com aumento de 16 vezes. Para tanto, utilizou-se uma peça circular de papel filtro com 3 mm de diâmetro. Inicialmente, um trépano de 3 mm de diâmetro foi usado apenas para tocar levemente a superfície da córnea e demarcar um círculo de igual tamanho a aproximadamente 1 mm do limbo córneo-escleral, em um ponto situado às 11 horas, próximo à inserção do músculo reto superior. A seguir, a peça de papel filtro

foi embebida numa solução de NaOH 1 M (QEEL – Química Especializada Erich Ltda., São Paulo – SP) durante 1 minuto. Removeu-se o excesso da solução tocando o papel filtro em um cotonete. A peça de papel filtro foi então posicionada no círculo previamente demarcado, aí permanecendo durante 2 minutos (Figura 7A). Logo após, irrigou-se o olho com 5 ml de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, para remoção do excesso de NaOH. Tal técnica resultou em um sítio de cauterização circular, homogêneo e de bordas bem definidas, com cerca de 3,5 mm de diâmetro (Figura 7B).



**FIGURA 6** – Posicionamento do coelho em decúbito lateral esquerdo (A). Aposição de campos e colocação do blefarostato graduável (B), expondo a córnea e a região límbica superior (C).



**FIGURA 7** – Posicionamento da peça de papel filtro na periferia superior da córnea direita, a aproximadamente 1 mm do limbo córneo-escleral (A); aspecto da lesão resultante (B). C: córnea; L: região límbica; PF: peça de papel filtro; R: região cauterizada. Magnificação de 25 vezes.

Verificou-se ainda se a peça de papel filtro por si só, sem o agente alcalino, quando colocada na superfície da córnea, era capaz de induzir angiogênese. Para tanto, seis animais foram submetidos aos mesmos passos do procedimento de cauterização, exceto que a córnea usada foi a esquerda e que a peça de papel filtro foi embebida numa solução de NaCl 0,9%, ao invés de NaOH.

Os animais foram avaliados, subsequentemente, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização, ocasiões em que procedeu-se a aquisição das imagens para a quantificação automática, bem como foram obtidos os parâmetros para o cálculo dos quantificadores manuais de angiogênese, quais sejam: o número de neovasos presentes no extremo distal (fronteira de crescimento) da área de angiogênese (número de vasos distais); o comprimento radial do vaso mais distante do limbo ( $C_R$ ); a medida do segmento que une os 2 pontos do limbo córneo-escleral que delimitam a região de neovascularização, ou seja, a corda ( $C_N$ ) da circunferência corneana correspondente (Figura 8). Durante o tempo de exposição, a córnea foi mantida hidratada com instilações freqüentes do gel oftálmico ácido poliacrílico (Vidisic® Gel, Bausch & Lomb Indústria Ótica Ltda., Porto Alegre – RS) — um substituto do fluido lacrimal. As medições de  $C_R$  e  $C_N$  foram feitas com o auxílio de uma delicada régua graduada em décimo de milímetro, sob visão microscópica, com aumento de 25 vezes. A magnificação utilizada para a contagem dos vasos distais foi de 40 vezes.

### **3.2 Método manual de quantificação de angiogênese**

A quantificação manual de angiogênese foi realizada de acordo com 5 métodos (Figura 8). O primeiro deles consiste em determinar a distância entre a extremidade do maior vaso e o limbo, ou seja, o comprimento vascular radial ( $C_R$ ) (GROSS *et al.*, 1981; CAO *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1996; KENYON *et al.*, 1996; CAO *et al.*, 1998; JOUSSEN *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2001; SEO *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003). O segundo envolve o cálculo do ângulo de neovascularização, isto é, o ângulo central  $\alpha$  ( $A_c$ ) correspondente ao arco da circunferência corneana que delimita a zona de neovascularização (CAO *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1996; KENYON *et al.*, 1996; CAO *et al.*, 1999; CAO *et al.*, 2001; SEO *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003).  $A_c$  pode ser obtido a partir de  $C_N$  e do raio da córnea ( $R$ ) — que no coelho é aproximadamente 6 mm (D'AMATO *et al.*, 1994). Assim, do triângulo MOS da Figura 8, tem-se que:

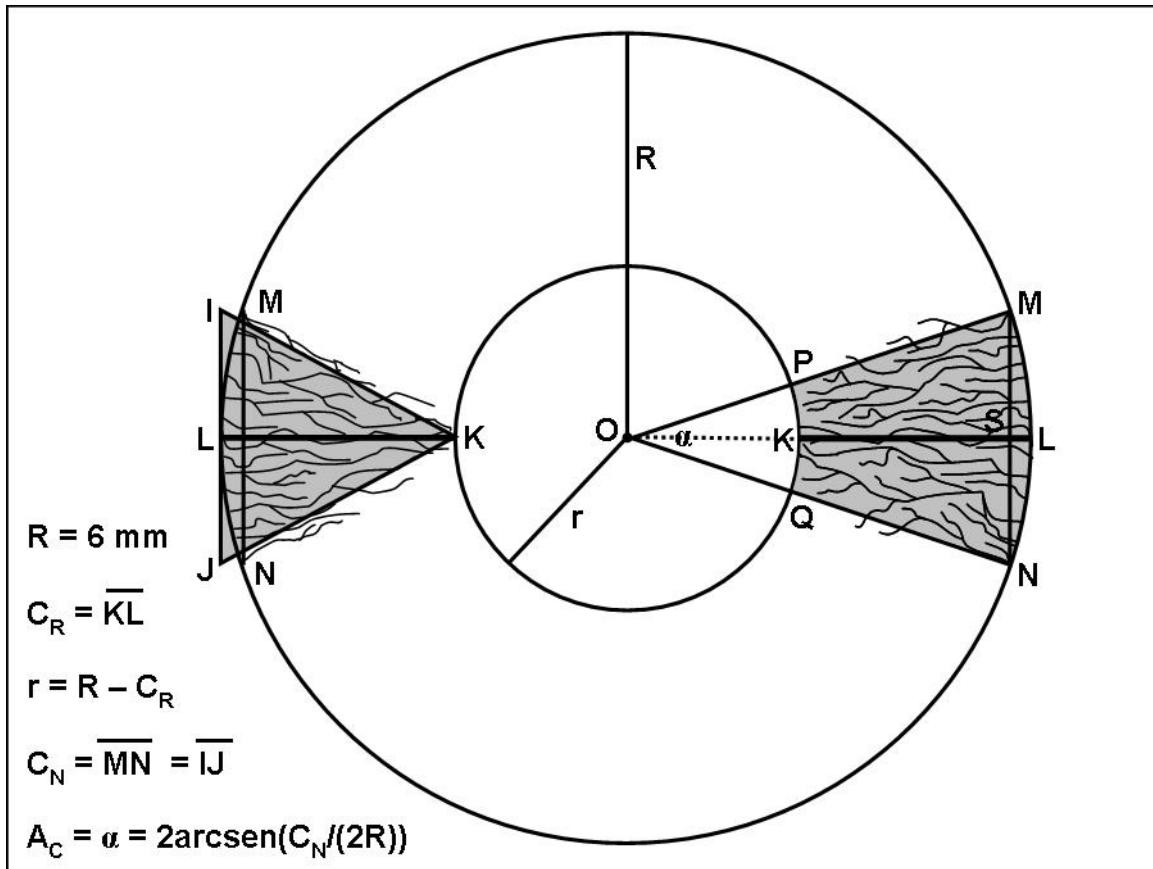
$$\text{sen}(\alpha/2) = \frac{C_N/2}{R} = \frac{C_N}{2R}.$$

Mas,  $\frac{\alpha}{2}$  pode ser obtido pela função inversa do seno (arco-seno), ou seja:

$$\frac{\alpha}{2} = \arcsen(C_N/2R), \text{ onde } \frac{\alpha}{2} \in \left[-\frac{\pi}{2}, \frac{\pi}{2}\right], \text{ logo:}$$

$$A_C = \alpha = 2\arcsen(C_N/2R), \text{ em radianos ou} \quad (3.1)$$

$$A_C = \alpha = \frac{360}{\pi} \arcsen(C_N/2R), \text{ em graus.}$$



**FIGURA 8** – Desenho esquemático do círculo corneano, cujo raio ( $R$ ) é igual a 6 mm, mostrando a região de angiogênese, bem como os parâmetros utilizados na sua quantificação. O segmento  $MN$  corresponde à corda ( $C_N$ ) da circunferência corneana que delimita a região de neovascularização. O segmento  $KL$  corresponde ao comprimento vascular radial ( $C_R$ ). A base do triângulo  $IJK$  é  $C_N$ , a sua altura é  $C_R$ , logo a sua área é  $A_T = C_N \cdot C_R / 2$ . O ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ) pode ser obtido a partir do triângulo  $MOS$ , sendo dado, em radianos, por  $A_C = \alpha = 2\arcsen(C_N / (2R))$ . A área do setor de coroa circular  $MNPQ$  ( $A_S$ ) é igual à área do setor circular  $MNO$  ( $\alpha \cdot R^2 / 2$ ) subtraída da área do setor circular  $OPQ$  ( $\alpha \cdot r^2 / 2$ ). Sendo assim,  $A_S = (\alpha/2)(R^2 - r^2)$ ,  $\alpha$  em radianos. Substituindo  $\alpha$  e  $r$ , tem-se que:  $A_S = \arcsen(C_N / (2R))[R^2 - (R - C_R)^2]$ .

O terceiro método requer o cômputo da área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), representado na Figura 8 pelo triângulo  $IJK$ , que constitui uma aproximação da real área de neovascularização da córnea (PROIA *et al.*, 1988; CONRAD *et al.*, 1994; BENEZRA *et al.*, 1997). A base do triângulo  $IJK$  é  $C_N$ , a sua altura é  $C_R$ , logo a sua área ( $A_T$ ) é:

$$A_T = \frac{C_N \cdot C_R}{2}. \quad (3.2)$$

O quarto método estabelece que outra aproximação da superfície da córnea envolvida pela neovascularização consiste em calcular a área do setor de coroa circular ( $A_S$ ), representada na Figura 8 pela região MNPQ (D'AMATO *et al.*, 1994; MASFERRER *et al.*, 2000; SEO *et al.*, 2001; LEAHY *et al.*, 2002). Assim, na Figura 8,  $A_S$  equivale à área do setor circular MNO ( $A_1$ ) subtraída da área do setor circular OPQ ( $A_2$ ), ou seja:

$$A_S = A_1 - A_2$$

$$\text{Como } A_1 = \frac{\alpha R^2}{2} \text{ e } A_2 = \frac{\alpha r^2}{2}, \text{ então:}$$

$$A_S = \frac{\alpha R^2}{2} - \frac{\alpha r^2}{2} = \frac{\alpha}{2}(R^2 - r^2)$$

Mas,  $\alpha = 2\arcsen(C_N/2R)$ , em radianos, e  $r = R - C_R$ .

Assim, substituindo  $\alpha$  e  $r$ , tem-se que:

$$A_S = \frac{2\arcsen(C_N/2R)}{2} [R^2 - (R - C_R)^2]$$

$$A_S = \arcsen\left(\frac{C_N}{2R}\right) [R^2 - (R - C_R)^2]. \quad (3.3)$$

Por fim, o quinto método consiste na determinação do índice angiogênico ( $I_A$ ), que é obtido multiplicando-se  $C_R$  pelo número de vasos distais normalizado para o intervalo de 1 a 5, conforme os seguintes critérios: 1 (0-25 vasos), 2 (26-50 vasos), 3 (51-75 vasos), 4 (76-100 vasos), 5 (acima de 100 vasos) (ZICHE *et al.*, 1994; ZICHE *et al.*, 1997; MARCONCINI *et al.*, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2001; ZICHE, 2001).

Considerando que a resposta angiogênica foi quantificada por cinco diferentes métodos, calculou-se então o coeficiente de correlação linear para verificar o sinal e o grau da dependência linear entre tais métodos.

A resposta angiogênica é uma função temporal, uma vez que o crescimento vascular varia, de forma não linear, com o tempo, conforme análise dos diagramas de dispersão dos parâmetros de quantificação de angiogênese em relação ao tempo. É interessante, pois, estabelecer um modelo matemático que exprima essa relação funcional. Assim, tomando-se a variável comprimento vascular radial ( $C_R$ ) para expressar a resposta angiogênica, determinou-se a função  $C_R(t)$  que define  $C_R$  num instante  $t$ , em dias, sendo  $t$  pertencente ao intervalo compreendido

entre a primeira e a última mensuração de  $C_R$ , isto é, entre 3 e 21 dias ou  $3 \leq t \leq 21$ . Para tanto, utilizou-se o modelo de regressão não linear (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003) para determinar a função de regressão  $C_R(t)$  que melhor se ajustava aos pontos do diagrama de dispersão de  $C_R$  em relação a  $t$ . Tal diagrama foi construído com os pares ordenados correspondentes aos valores médios de  $C_R$  nos tempos 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias, considerando-se  $t$  a variável independente e  $C_R$  a variável dependente. A determinação da função de regressão  $C_R(t)$  possibilita, pois, a previsão do valor de  $C_R$  em qualquer instante  $t$  pertencente ao intervalo entre 3 e 21 dias.

Uma vez estabelecido o relacionamento funcional entre  $C_R$  e  $t$ , pôde-se determinar ainda a taxa de variação de  $C_R$  por unidade de variação de  $t$ , que foi denominada de taxa de angiogênese radial ( $TAR$ ). Consideremos que  $t$  varia do valor  $t_1$  a  $t_2$ , com  $t_2 > t_1$ , então  $C_R$  variará de  $C_R(t_1)$  a  $C_R(t_2)$ . Portanto, a variação em  $C_R$  será  $\Delta C_R = C_R(t_2) - C_R(t_1)$  quando a variação de  $t$  for de  $\Delta t = t_2 - t_1$ . Assim, define-se a taxa média de variação de  $C_R$  por unidade de variação de  $t$  ou taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), quando  $t$  varia de  $t_1$  a  $t_2$ , pelo quociente (LEITHOLD, 1982):

$$TAR_M = \frac{C_R(t_2) - C_R(t_1)}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta C_R}{\Delta t}. \quad (3.4)$$

No entanto, a taxa média de angiogênese radial não proporciona informação sobre o crescimento vascular num instante específico  $t_i$ , (como, por exemplo, no sétimo dia), uma vez que se refere apenas ao crescimento vascular total durante todo o intervalo de tempo  $t_1$  a  $t_2$ . Essa informação é dada pela taxa instantânea de angiogênese radial ( $TAR_I$ ), ou seja, a taxa de variação instantânea de  $C_R$  por unidade de variação de  $t$  num instante  $t_1$ . De fato, diminuindo-se o intervalo de  $t_1$  a  $t_2$ , isto é, se  $t_2$  se aproxima de  $t_1$ , então  $TAR_M$ , referente a esse intervalo de tempo, se aproximará de  $TAR_I$  no instante  $t_1$ . Considerando que  $\Delta t = t_2 - t_1$ , então  $t_2 = t_1 + \Delta t$ , de modo que concluir que  $t_2$  tende a  $t_1$  ( $t_2 \rightarrow t_1$ ) é equivalente a dizer que  $\Delta t$  tende a zero ( $\Delta t \rightarrow 0$ ). Assim,  $TAR_I$  em  $t_1$  pode ser definida como o limite de  $TAR_M$  quando  $\Delta t \rightarrow 0$ , caso este limite exista (LEITHOLD, 1982), ou seja:

$$TAR_I(t_1) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{C_R(t_1 + \Delta t) - C_R(t_1)}{\Delta t}. \quad (3.5)$$

Ora, a expressão acima corresponde à definição da derivada de  $C_R$  em relação a  $t$  ( $dC_R/dt$ ) no instante  $t_1$  (LEITHOLD, 1982), isto é:

$$TAR_i(t_1) = \frac{dC_R}{dt} . \quad (3.6)$$

Portanto, calculando-se  $dC_R/dt$ , pode-se obter o valor de  $TAR_i$  em qualquer instante ao longo do intervalo entre o 3º e o 21º dia do experimento.

Tratando-se de uma derivada,  $TAR_i$  calculada em  $t_1$  também pode ser interpretada como a declividade ou coeficiente angular da reta tangente ao gráfico de  $C_R(t)$  no ponto  $(t_1, C_R(t_1))$  (LEITHOLD, 1982).

A taxa média de angiogênese radial foi calculada para os intervalos de 3 dias entre as avaliações, para o período entre 3 e 12 dias, para o intervalo entre o 12º e o 21º dia, assim como entre o 3º e o 21º dia do período de observação. Para tanto, utilizaram-se os valores de  $C_R$  obtidos durante as avaliações efetuadas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21.

A taxa instantânea de angiogênese radial para cada instante  $t_i$  pertencente ao intervalo de 3 a 21 dias foi calculada derivando-se a função de regressão  $C_R(t)$  em relação a  $t$  ( $dC_R/dt$ ).

### 3.3 Aquisição das imagens

O instrumental utilizado para a aquisição das imagens compreendeu: um microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M90, D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP) equipado com um divisor de luz e um adaptador para câmera de vídeo, além de um filtro verde; uma câmera de vídeo (Hitachi VCC-151, Japan), instalada no microscópio, analógica, dotada de dispositivo de carga acoplada (CCD – *charge-coupled device*), geradora de imagens em cores, com saída de vídeo composto (*composite video*) e vídeo separado (S-vídeo: *separate video*); um monitor vídeo de 20 polegadas (Cineral Eletrônica da Amazônia Ltda., Manaus – AM); um microcomputador com processador Intel® Pentium® III de 500 MHz, memória RAM (*random access memory*) de 128 *megabytes*, disco rígido de 20 *gigabytes* e sistema operacional Windows® Millennium Edition®; um sistema de captura de vídeo (PixelView® PV-TV304P, Prolink Microsystems Corp., Taiwan), instalado no microcomputador, composto por placa de captura de vídeo e software controlador, que possibilitava a captura tanto de vídeo quanto de imagens estáticas.

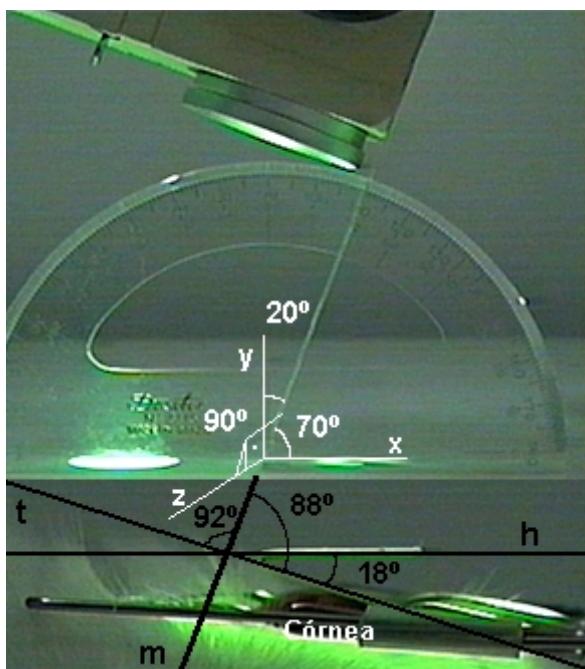
O procedimento de aquisição foi padronizado de maneira a permitir que a captura das imagens fosse realizada dentro do mesmo enquadramento ou de uma

mesma incidência, seja em animais diferentes, seja na mesma unidade experimental em observações subsequentes. Para tanto, era fundamental que o microscópio e o dispositivo de acomodação do coelho proporcionassem mobilidade adequada para o enquadramento ideal. O microscópio cirúrgico dispunha de um braço articulado que permitia movimentos nas três dimensões. Uma base de isopor foi preparada para acomodar os animais, os quais eram posicionados em decúbito lateral, direito ou esquerdo. Esta permitia movimentos em todas as direções no plano horizontal, além de rotação do olho em torno do seu eixo e da cabeça em torno do eixo cervical.

O enquadramento ideal deve ser entendido como aquele em que o microscópio e a córnea sejam alinhados de maneira tal que os raios de luz incidam perpendicularmente ao plano tangente à periferia superior da córnea, onde estão localizados o sítio de cauterização e a área de neovascularização. Assim, a distorção espacial decorrente da projeção de uma estrutura curva e tridimensional, como a córnea, numa imagem bidimensional é minimizada (CONRAD *et al.*, 1994; BECKER *et al.*, 1998). De acordo com essa incidência, o campo de visão do microscópio mostrava a região límbica superior na sua porção inferior e a região central da córnea na sua porção superior. Esta mesma disposição foi mantida nas imagens capturadas. Entretanto, o alinhamento perpendicular ocasionou o posicionamento do reflexo luminoso sobre a área de neovascularização. Esse problema foi contornado com a instilação do gel oftálmico ácido poliacrílico, que deslocava o reflexo em direção ao limbo, bem como com um leve aumento do ângulo de incidência, que definitivamente posicionou o reflexo luminoso fora da zona de neovascularização, na região perilímbica. O enquadramento ideal também deve conter, após a obtenção da focalização ótima, toda a região de neovascularização. Ao mesmo tempo, a magnificação deve ser tal que propicie uma adequada identificação da microvasculatura. Isto foi conseguido com um aumento de 25 vezes.

Uma vez estabelecido o enquadramento ideal, os parâmetros que o caracterizam foram obtidos (Figura 9). Com o auxílio de um transferidor, os ângulos entre o eixo do microscópio (reta *m* na Figura 9) e os eixos *x*, *y* e *z* do sistema de coordenadas tridimensionais foram determinados, quais sejam: 70°, 20° e 90°, respectivamente. O corpo do microscópio foi então fixado nessa angulação. Verificou-se ainda o ângulo entre o plano horizontal e a reta simultaneamente tangente à periferia da córnea e à esclera. Para tanto, utilizou-se um instrumento em forma de "V", onde o ângulo de abertura determinava que se uma haste fosse

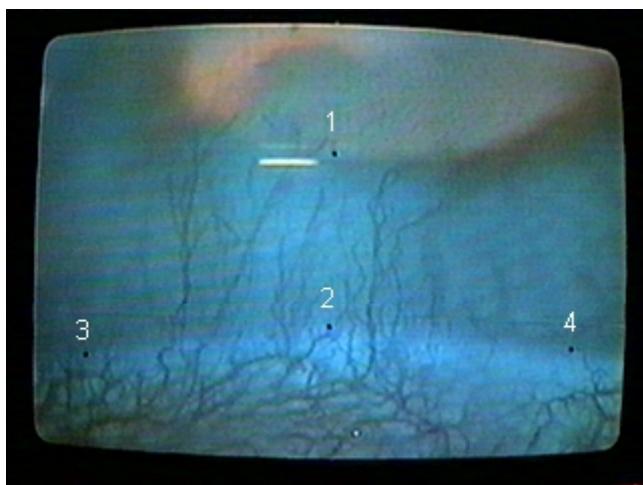
posicionada tangente à córnea, na altura do sítio de cauterização, e à esclera (reta  $t$  na Figura 9), a outra se posicionaria paralela ao plano horizontal (reta  $h$  na Figura 9). Este ângulo foi medido e correspondeu a  $18^\circ$ . Dessa forma, o ângulo entre o eixo do microscópio e a reta tangente à córnea e à esclera pôde ser calculado, sendo igual a  $88^\circ$  ( $70^\circ + 18^\circ$ ). A determinação de tais ângulos é importante para futuras reproduções do método. É necessário esclarecer que não foi utilizada a reta tangente à periferia da córnea em virtude da dificuldade em determiná-la. No entanto, essa reta possui uma inclinação um pouco maior que a reta  $t$  da Figura 9. Portanto, pode-se deduzir que o ângulo entre o eixo do microscópio e o plano tangente à periferia da córnea é um pouco maior que  $90^\circ$ , o que explica a localização do reflexo luminoso na região perilímbica, ou seja, numa posição inferior no plano de enquadramento. A distância entre a córnea e a objetiva do microscópio foi mantida constante e determinada pela distância focal do microscópio, após a focalização ideal.



**FIGURA 9** – Relações angulares entre o eixo do microscópio ( $m$ ), o plano horizontal ( $h$ ) e a reta simultaneamente tangente à periferia da córnea e à esclera ( $t$ ).

Logo após a definição do enquadramento ideal, foram marcados 4 pontos na tela do monitor, correspondendo a posições estratégicas na córnea e região límbica (Figura 10). O ponto 1 foi posicionado no centro do sítio de cauterização. O ponto 2 foi marcado na linha de transição córneo-escleral, determinando com o

ponto 1 uma reta perpendicular ao plano horizontal. Os pontos 3 e 4 foram marcados próximo aos cantos direito e esquerdo da área de enquadramento, na altura da linha de transição córneo-escleral. Essa abordagem garantia que, em observações múltiplas, a córnea fosse posicionada da mesma maneira, obedecendo à mesma angulação e ao mesmo enquadramento, tendo em vista que o eixo do microscópio era mantido fixo. Assim, foi eliminada a necessidade de se medir o ângulo entre o plano horizontal e a reta simultaneamente tangente à periferia da córnea e à esclera a cada avaliação.

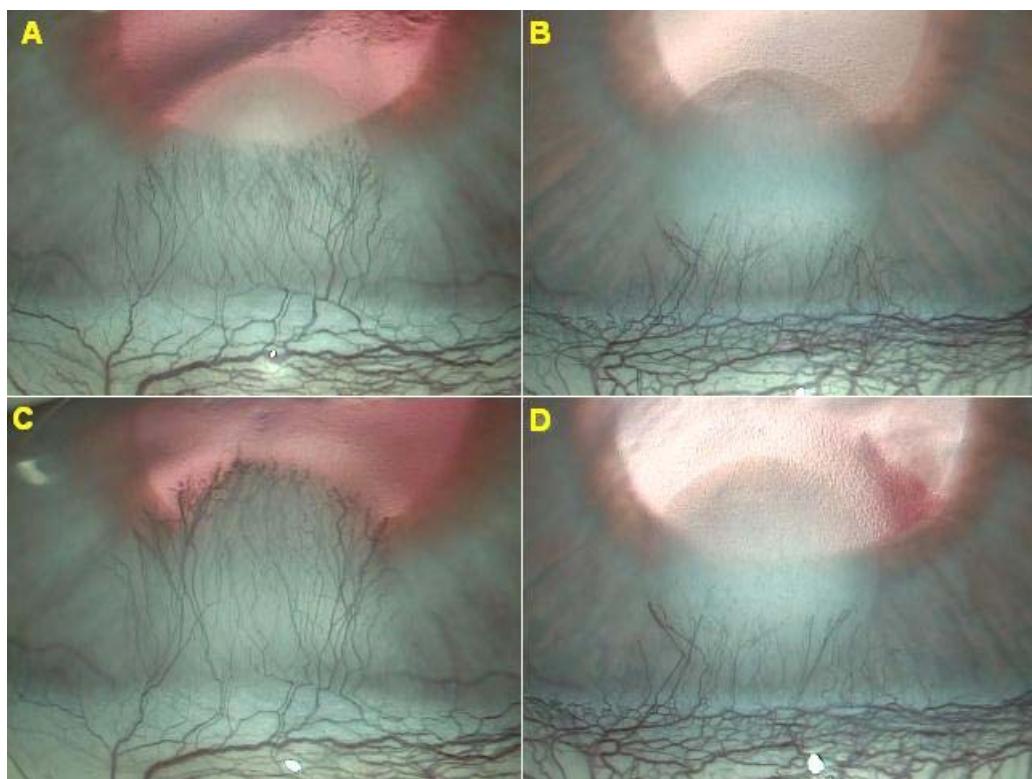


**FIGURA 10** – Localização dos 4 pontos de enquadramento na tela do monitor.

O resultado da padronização do processo de aquisição foi a captura de imagens com mínimas variações de enquadramento, tanto as obtidas em diferentes animais quanto aquelas obtidas no mesmo animal, em avaliações subsequentes (Figura 11). Isto foi fundamental para garantir que a região a ser estudada, ou seja, a área de angiogênese, não sofresse alterações decorrentes de variações na incidência, o que prejudicaria, sobremaneira, o processo de quantificação.

O sistema de iluminação constou de uma lâmpada halógena de 110 V e 150 W, cuja luz era conduzida por fibra óptica até o corpo do microscópio (luz fria), onde passava através de um filtro verde (*red free*). A iluminação verde é comumente usada para analisar os vasos da retina e da conjuntiva (OWEN *et al.*, 2002), pois aumenta o contraste entre os vasos sanguíneos e as demais estruturas (GIMBRONE *et al.*, 1974; PARKE *et al.*, 1988). Além disso, elimina o vermelho intenso característico dos tecidos biológicos, quando estes são iluminados com luz branca. A fonte de luz dispunha de um dispositivo para graduar a intensidade luminosa, de

modo que o mesmo valor foi utilizado em todas as observações e correspondeu à intensidade máxima.



**FIGURA 11** – Resultado do procedimento de aquisição das imagens. Notar o enquadramento semelhante em animais distintos (A e B; C e D) e no mesmo animal em momentos diferentes (A e C; B e D). Magnificação de 25 vezes.

As imagens em cores do olho eram captadas por uma câmera de vídeo analógica acoplada ao microscópio, que dispunha de saída dupla: vídeo composto e vídeo separado (S-vídeo). No vídeo composto, os sinais de brilho e cor são transmitidos em um único condutor, enquanto no vídeo separado essas informações são enviadas por condutores separados, de modo que proporciona uma imagem com qualidade superior quando comparada àquela do vídeo composto. Sendo assim, o sinal da saída de vídeo composto era enviado para o monitor, onde as imagens eram exibidas, possibilitando a obtenção do enquadramento ideal. O sinal da saída S-vídeo, de melhor qualidade, era enviado para a placa de captura instalada no microcomputador. Dessa forma, uma vez definido o enquadramento ideal, imagens estáticas coloridas do olho eram então capturadas, digitalizadas e armazenadas no disco rígido no formato Windows® Bitmap (BMP), com as dimensões de 320 x 240 pixels, correspondendo a 225 kbytes (Figura 12). De acordo com o sistema de digitalização utilizado, cada pixel (*picture element*), o

elemento básico de uma imagem digital, correspondia a 24 bits (*binary digit*), sendo as cores representadas segundo o modelo RGB (*Red, Green, Blue*).

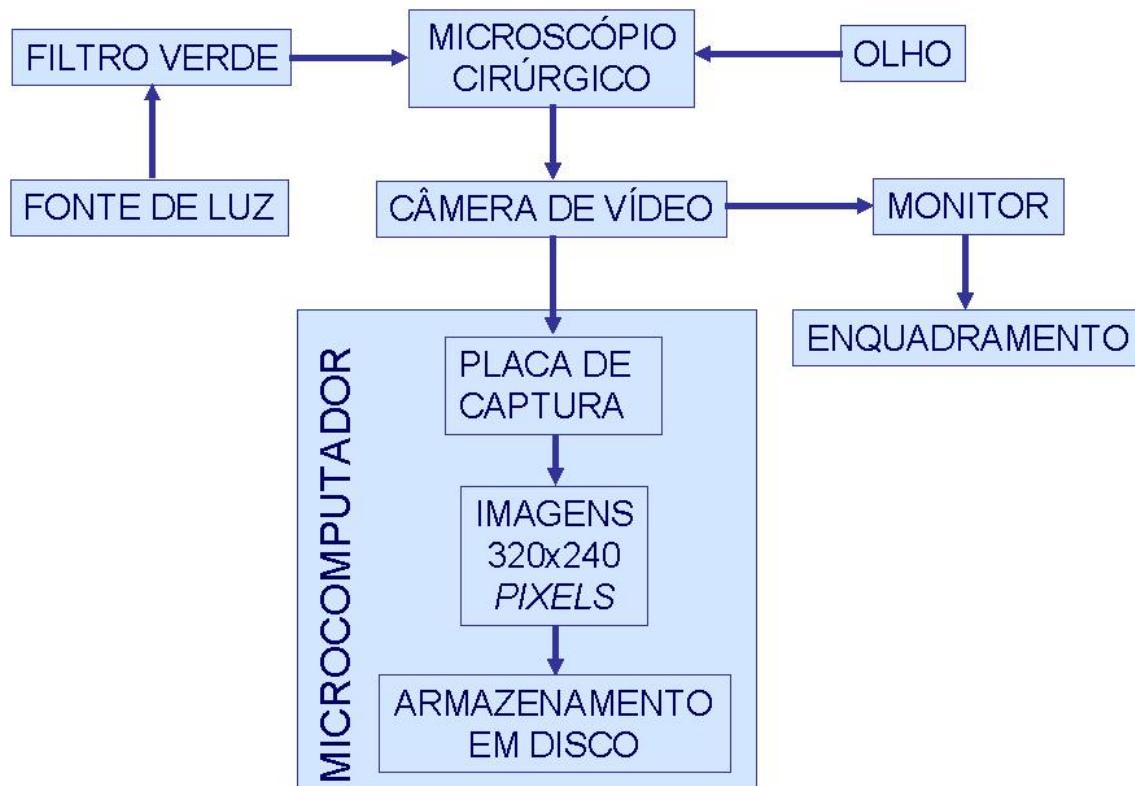
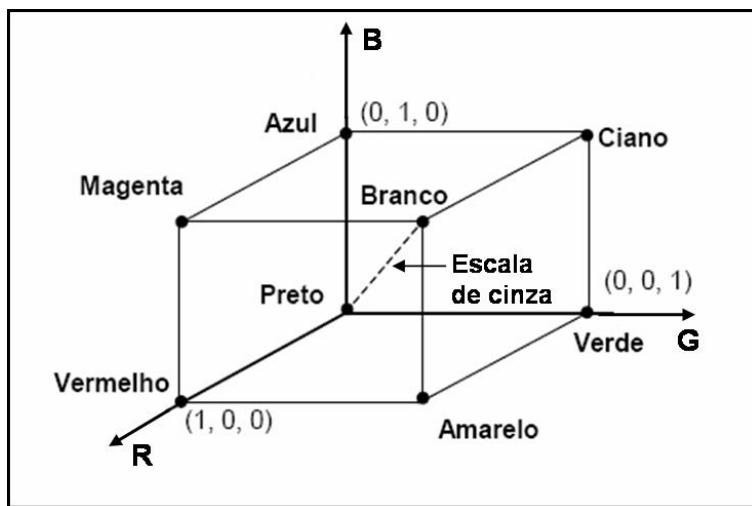


FIGURA 12 – Etapas do procedimento de aquisição das imagens.

O modelo de cores RGB representa cada cor como uma combinação ou uma mistura aditiva das 3 cores primárias: vermelho, verde e azul. Baseia-se, portanto, na natureza aditiva das cores (Figura 13). Esse modelo pode ser representado num sistema de coordenadas tridimensionais como um subespaço de cores na forma de um cubo, onde cada componente de cor corresponde a um eixo ortogonal. As cores são definidas por vetores que partem da origem e se estendem até pontos localizados sobre ou dentro do cubo (Figura 14). Assim, o preto está na origem; o branco está no canto mais distante da origem; as cores primárias vermelho, verde e azul estão nos cantos que coincidem com os eixos; as cores secundárias ciano, magenta e amarelo estão nos outros 3 cantos; e a linha que une os pontos referentes ao preto e branco contém todas as combinações de valores iguais nos 3 componentes e representa a escala de cinza (UMBAUGH; MOSS; STOECKER, 1992; GONZALEZ; WOODS, 2000c; PEREZ, 2001).



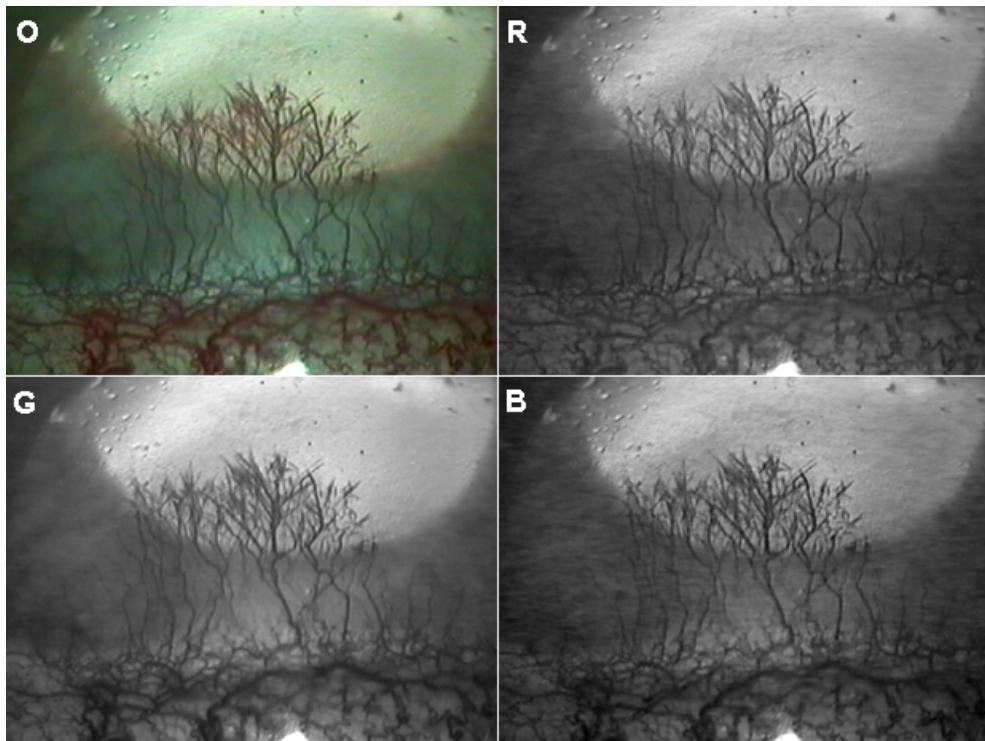
**FIGURA 13** – Mistura das cores primárias (vermelho, verde e azul) produzindo as cores secundárias (magenta, ciano e amarelo) e a luz branca.



**FIGURA 14** – Cubo de cores do modelo RGB. Os valores de  $R$ ,  $G$ , e  $B$  foram normalizados para o intervalo  $[0, 1]$ , portanto trata-se de um cubo unitário. Os pontos pertencentes à diagonal principal representam os níveis de cinza, desde o preto na origem, vetor  $(0,0,0)$ , até o branco, vetor  $(1,1,1)$ .

O modelo RGB utiliza 24 *bits* para especificar uma dada cor (1 *pixel*), sendo 8 *bits* (1 *byte*) para cada um dos seus componentes:  $R$  (vermelho),  $G$  (verde) e  $B$  (azul); de modo que pode representar até  $2^8 \times 2^8 \times 2^8 = 2^{24}$  cores. Dessa forma, uma imagem colorida pode ser decomposta em 3 imagens independentes em tons ou níveis de cinza, correspondendo aos canais  $R$ ,  $G$  e  $B$  (Figura 15). O termo nível de cinza refere-se a uma medida de intensidade que varia do preto, passando pelos diversos tons de cinza, até o branco. Em imagens em tons de cinza ou monocromáticas de 8 *bits*, cada *pixel* é representado por 8 *bits*, de modo que pode assumir  $2^8$  (256) valores de intensidade, resultando numa escala de 256 tons (escala de cinza), que varia de 0 a 255, onde 0 representa o preto e 255, o branco. Quando

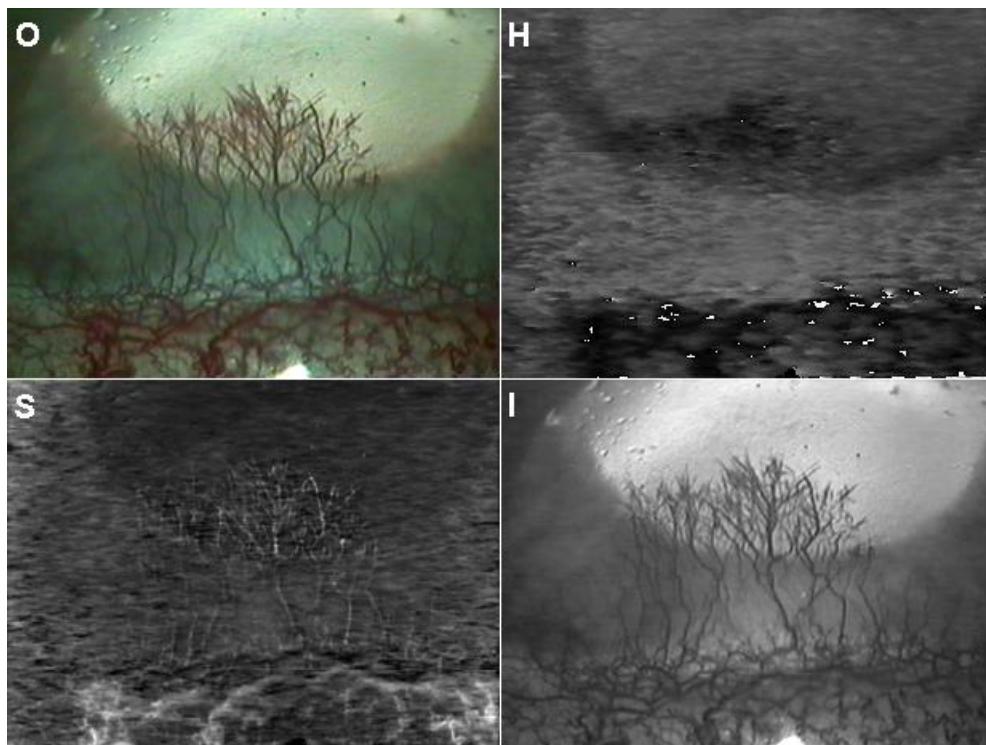
cada *pixel* é representado por apenas 1 *bit*, a imagem é dita binária, de modo que pode conter apenas  $2^1$  tons: o preto e o branco. Assim, a resolução espectral de uma imagem digital pode variar entre 1 (imagem binária) e 24 *bits* (imagem colorida) por *pixel* (PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000a).



**FIGURA 15** – Decomposição de uma imagem colorida nos 3 componentes do modelo RGB. O: imagem original; R: componente *R* (*Red*); G: componente *G* (*Green*); B: componente *B* (*Blue*). Magnificação de 25 vezes.

O modelo RGB juntamente com o modelo HSI (*Hue*, *Saturation*, *Intensity*) são os mais utilizados em processamento de imagens. O modelo de cores HSI utiliza os atributos matiz, saturação e intensidade para especificar uma cor. A intensidade está associada ao brilho; o matiz relaciona-se com o comprimento de onda dominante em uma mistura de ondas de luz, ou seja, representa a cor dominante que é percebida (cor pura); a saturação refere-se ao grau de diluição de uma cor pura pela luz branca, ou seja, a quantidade desta misturada com o matiz. Saturação e matiz estão intimamente relacionados com o processo de percepção de cor pelo ser humano. Quando tomados conjuntamente são chamados de cromaticidade. Desse modo, uma cor pode ser caracterizada pelo seu brilho e cromaticidade (UMBAUGH; MOSS; STOECKER, 1992; GONZALEZ; WOODS, 2000c). Nesse modelo, o componente *I* (intensidade) é desacoplado da informação de cor da

imagem ou cromaticidade (matiz e saturação). Assim, ele pode ser processado separadamente sem afetar a percepção de cores (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000c). A Figura 16 mostra a decomposição de uma imagem digital nos componentes *H*, *S* e *I* do modelo HSI.



**FIGURA 16** – Decomposição de uma imagem colorida nos 3 componentes do modelo HSI. O: imagem original; H: componente *H* (*Hue*); S: componente *S* (*Saturation*); I: componente *I* (*Intensity*). Magnificação de 25 vezes.

O sistema RGB pode ser convertido para HSI e vice-versa. No software desenvolvido neste estudo, foi implementado um algoritmo para efetuar essas conversões. Dessa forma, o componente *I* do padrão HSI, juntamente com os canais *R*, *G* e *B* do modelo RGB, puderam ser utilizados pelo procedimento de escolha do canal mais adequado para o processo de conversão das imagens coloridas em monocromáticas.

### 3.4 Método automático de quantificação de angiogênese

Um programa de computador específico para a segmentação e quantificação de angiogênese em córnea de coelho foi desenvolvido, utilizando, para tanto, a linguagem de programação Object Pascal, dentro do ambiente de

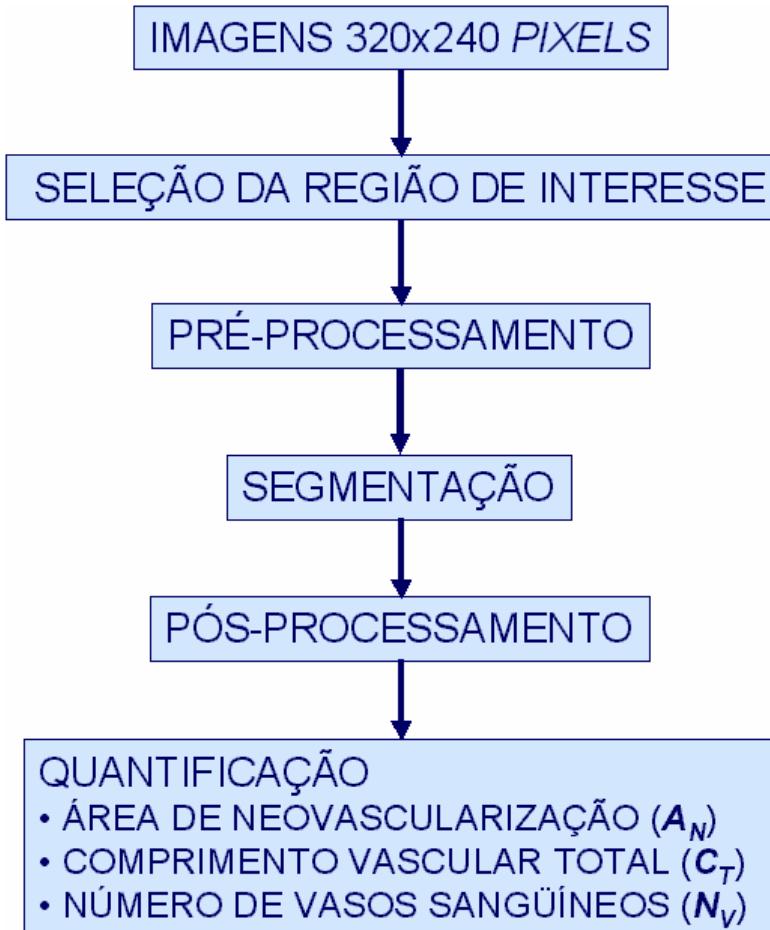
desenvolvimento de sistemas Borland® Delphi™ Personal versão 6.0 (Borland Software Corporation, U.S.A., 2001). O software foi chamado de SQAN – Sistema de Quantificação de Angiogênese.

Procurou-se elaborar uma ferramenta de fácil manuseio, onde a interferência do operador fosse mínima. Nesse sentido, o software interage com o operador através de botões na tela que, quando acionados, promovem a execução da tarefa a eles relacionada (Figura 17).



**FIGURA 17** – Tela inicial. O operador interage com o sistema ativando os botões apropriados.

O sistema é composto de 5 módulos principais, quais sejam: seleção, na imagem original, da região de interesse; pré-processamento; segmentação; pós-processamento; quantificação da angiogênese. Assim, após a seleção da região de interesse, a qualidade da nova imagem contendo a região a ser processada é, inicialmente, melhorada; seguida da segmentação da neovascularização e posterior eliminação de inconsistências; por fim, é efetuado o cálculo dos parâmetros de quantificação de angiogênese: área de neovascularização, comprimento vascular total e número de vasos sanguíneos (Figura 18).



**FIGURA 18** – Módulos que compõem o sistema.

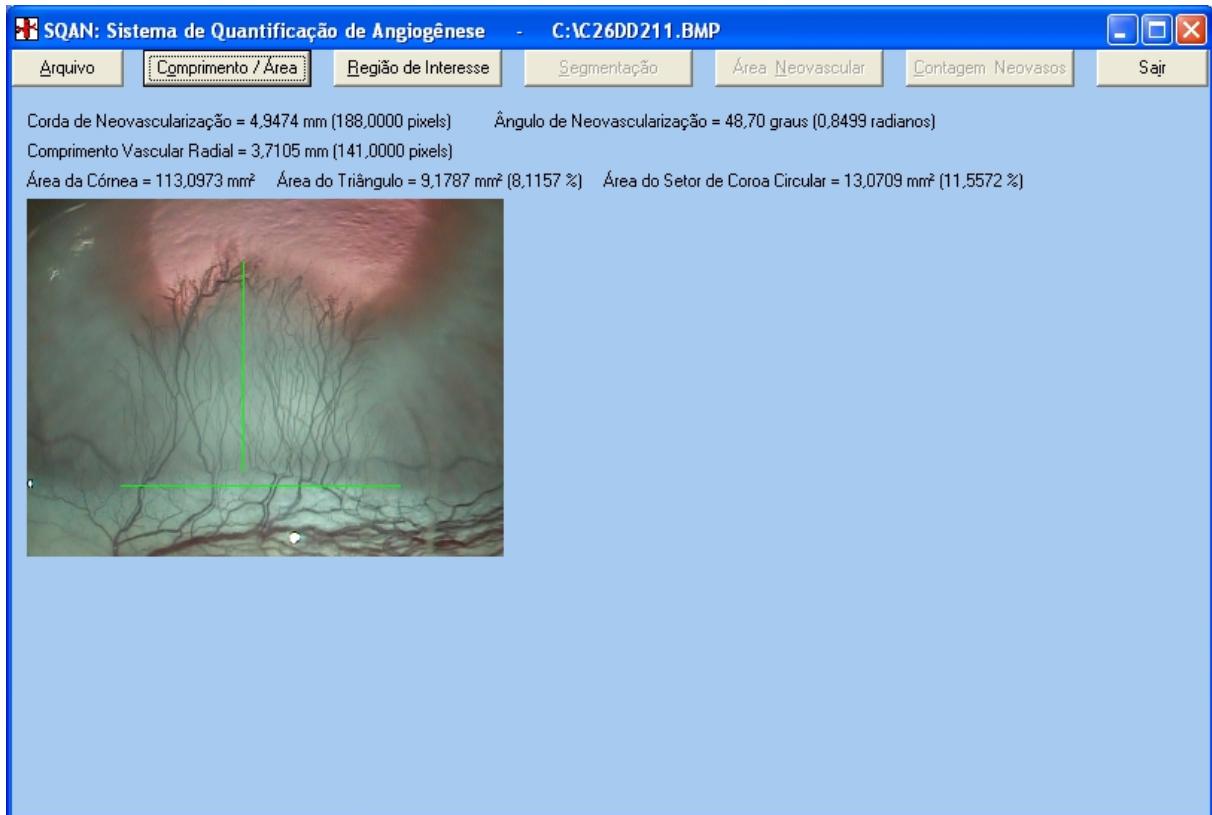
O software disponibiliza ainda uma rotina para medir distâncias entre 2 pontos na imagem, solicitando ao operador que delimita com o *mouse*, ativando uma de suas teclas, o segmento de reta que os une. Para facilitar o processo de medição, uma linha elástica acompanha o movimento do cursor do *mouse*, desde o ponto inicial até o final. Então, considerando que os 2 pontos estejam localizados nas posições  $(x_1, y_1)$  e  $(x_2, y_2)$  na imagem, a distância euclidiana ( $D$ ) entre eles, em *pixels*, é dada por (ANDRADE, 1993; ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, 2003; GONZALEZ; WOODS, 2000a):

$$D = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} . \quad (3.7)$$

Essa rotina possibilitou a determinação do fator de escala, ou seja, o número de *pixels* por milímetro (CONRAD *et al.*, 1994, SANDERS *et al.*, 1999) para a magnificação (25 vezes) e dimensões (320 x 240 *pixels*) utilizadas, necessário para expressar os valores de comprimentos e áreas em mm e mm<sup>2</sup>, respectivamente. O fator de escala está relacionado, pois, com a resolução espacial, ou seja, o espaço

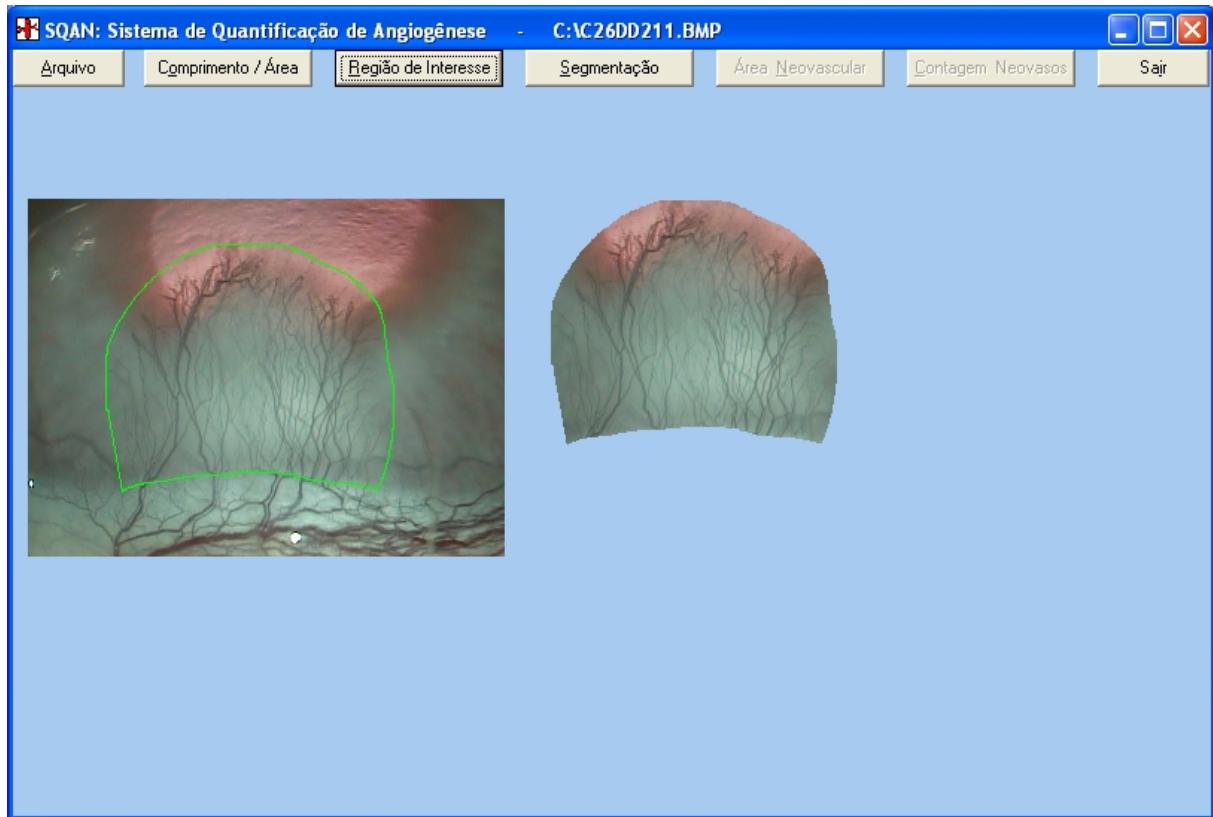
físico ocupado por cada *pixel* (PINTO, 1996). Para tanto, uma pequena régua milimetrada foi posicionada no mesmo plano de focalização da córnea, nas direções horizontal e vertical, e as imagens correspondentes, em seguida, capturadas. Três operadores delimitaram, por 3 vezes, um segmento horizontal e outro vertical, ambos correspondentes a 1 mm. A média foi então calculada nas duas direções, sendo igual a 38, após arredondamento. Dessa forma, estabeleceu-se um fator de escala igual a 38 *pixels/mm* ou 0,0263 mm/*pixel*, tanto na direção horizontal como na vertical, de modo que a resolução espacial das imagens foi definida em 1444 *pixels*<sup>2</sup> por mm<sup>2</sup>, ou ainda que a dimensão de 1 *pixel*<sup>2</sup> foi fixada em 0,0007 mm<sup>2</sup>. A rotina foi então melhorada para possibilitar a medição da corda de neovascularização ( $C_N$ ) e do comprimento vascular radial ( $C_R$ ) na própria imagem, permitindo, assim, a determinação dos demais parâmetros manuais que são dependentes de  $C_N$  e  $C_R$ , quais sejam: o ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), a área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ) e a área do setor de coroa circular ( $A_S$ ) (Figura 19).

A seleção da região de interesse, ou seja, a região contendo a zona de angiogênese, é necessária uma vez que a imagem original representa um campo que contém vasos perilímbicos e vasos localizados na íris subjacente, os quais devem ser excluídos. A seleção é feita delineando-se, de forma grosseira, a região de interesse, com o auxílio do *mouse*, mantendo-se pressionado o seu botão esquerdo. No entanto, na transição córneo-escleral, o delineamento deve seguir rigorosamente a linha de transição, que delimita a borda da córnea e que é facilmente identificada, a fim de excluir os vasos do limbo. Não é necessário finalizar a delimitação exatamente no ponto onde esta começou, pois o sistema liga automaticamente os pontos inicial e final. O programa também permite a seleção de uma região retangular, bastando, para tanto, deslocar o cursor do *mouse* do ponto que define o início ao ponto que corresponde ao fim de uma de suas diagonais, mantendo-se ativado o botão direito. Um retângulo dinâmico acompanha o movimento do cursor, desde o ponto inicial até o final. Alternativamente, a imagem inteira pode ser selecionada, necessitando apenas pressionar e imediatamente soltar qualquer tecla do *mouse*, sem movimentá-lo. Após a seleção, o *software* recorta automaticamente a região selecionada da imagem original, gerando uma nova imagem. A partir de agora, todo o processamento será feito na imagem que representa a região de interesse, bem como nas que dela derivam (Figura 20).



**FIGURA 19** – Determinação de distâncias entre 2 pontos. Considerando que os segmentos delimitados são a corda de neovascularização ( $C_N$ ) e o comprimento vascular radial ( $C_R$ ), então o sistema calcula automaticamente os demais parâmetros manuais que são dependentes de  $C_N$  e  $C_R$ , quais sejam: o ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), a área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ) e a área do setor de coroa circular ( $A_S$ ).

O pré-processamento promove o melhoramento da imagem visando aumentar o desempenho dos processos seguintes (GONZALEZ; WOODS, 2000a). Neste sistema, o pré-processamento objetiva melhorar a qualidade das imagens, eliminando ruídos introduzidos no processo de aquisição e realçando o contraste entre os vasos sanguíneos e as demais estruturas da cena, ou seja, o fundo. Contraste este que era deveras baixo, apesar da utilização do filtro verde, uma vez que não foi injetada nenhuma substância para evidenciar os vasos sanguíneos. O primeiro passo do módulo de pré-processamento é a conversão da imagem originalmente colorida para uma imagem monocromática de 8 bits (256 tons de cinza). Isto é necessário tendo em vista que os algoritmos implementados neste sistema operam em imagens com resolução espectral de 256 tons de cinza. Estes são mais simples e mais rápidos (PEREZ, 2001), razões pelas quais foram adotados. Além disso, não se constatou perda significativa da informação original nas imagens em escala de cinza utilizadas neste estudo.



**FIGURA 20** – Seleção da região de interesse na imagem original (esquerda). A região selecionada é automaticamente recortada, gerando uma nova imagem (direita).

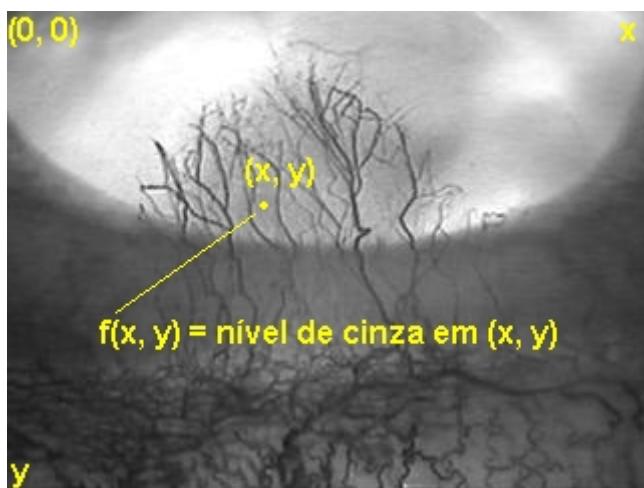
Uma imagem digital monocromática é definida como uma função bidimensional de intensidade luminosa  $f(x, y)$ , que atribui um nível de cinza ou brilho (intensidade) a cada ponto  $(x, y)$ , onde tanto as coordenadas espaciais  $x$  e  $y$  como  $f$  assumem valores discretos (PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000a). Assim, uma imagem digital é uma função  $f(x, y)$  discretizada tanto espacialmente quanto em amplitude (intensidade ou brilho). Em imagens digitais em tons de cinza de 8 bits,  $f(x, y)$  assume valores discretos no intervalo  $[0, 255]$ , enquanto os valores das coordenadas  $x$  e  $y$  dependem das dimensões da imagem. Uma imagem digital monocromática pode ainda ser considerada uma matriz bidimensional, cujos índices de linhas e colunas identificam um ponto na imagem ou um *pixel*, e o correspondente valor do elemento da matriz equivale ao nível de cinza no ponto (PINTO, 1996; BANON, 1998; GONZALEZ; WOODS, 2000a; SOUZA, 2002) (Figura 21).

Algumas propriedades de uma imagem em tons de cinza podem ser descritas a partir da análise do seu histograma. Considere uma imagem digital com

níveis de cinza no intervalo [0, 255], o histograma dessa imagem é uma função discreta definida por:

$$h(z_k) = \frac{n_k}{n}, \quad (3.8)$$

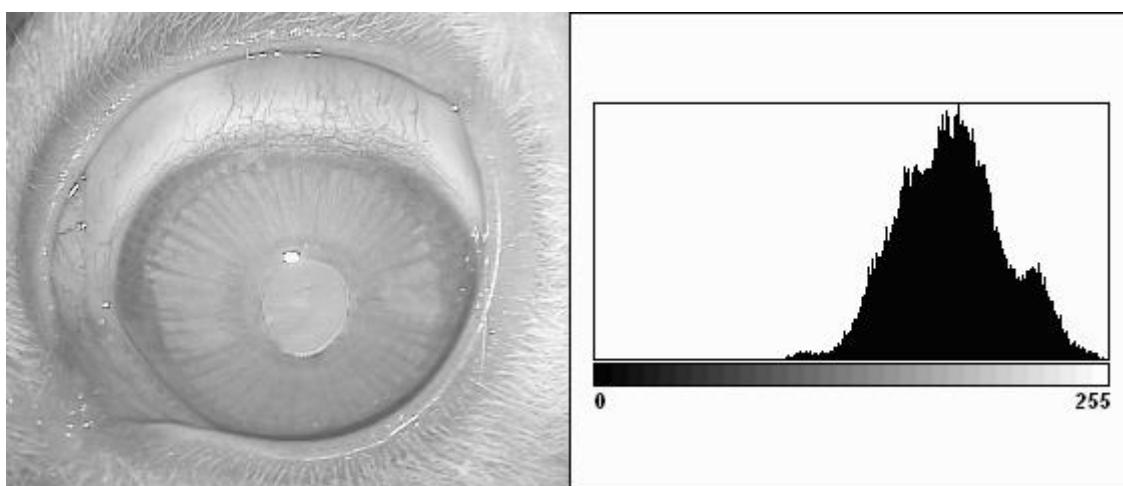
onde  $z_k$  é o  $k$ -ésimo nível de cinza,  $n_k$  é o número de *pixels* na imagem com esse nível de cinza,  $n$  é o número total de *pixels* na imagem e  $k = 0, 1, 2, \dots, 255$  (BANON, 1998; GONZALEZ; WOODS, 2000c; FACON, 2002). O histograma dá uma estimativa da probabilidade de ocorrência dos níveis de cinza e seu gráfico fornece uma descrição global da aparência de uma imagem (PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000c) (Figura 22). Quando os níveis de cinza estão mais concentrados próximo ao preto (0) na escala de cinza, a imagem é escura, com pouco brilho. Quando se distribuem mais nas proximidades do branco (255) na escala de cinza, a imagem é clara, com muito brilho. Quando os níveis de cinza estão densamente localizados num intervalo estreito da escala de cinza, a imagem revela um baixo contraste. Por fim, quando os níveis de cinza estão uniformemente distribuídos na escala de cinza, a imagem apresenta um alto contraste (GONZALEZ; WOODS, 2000c).



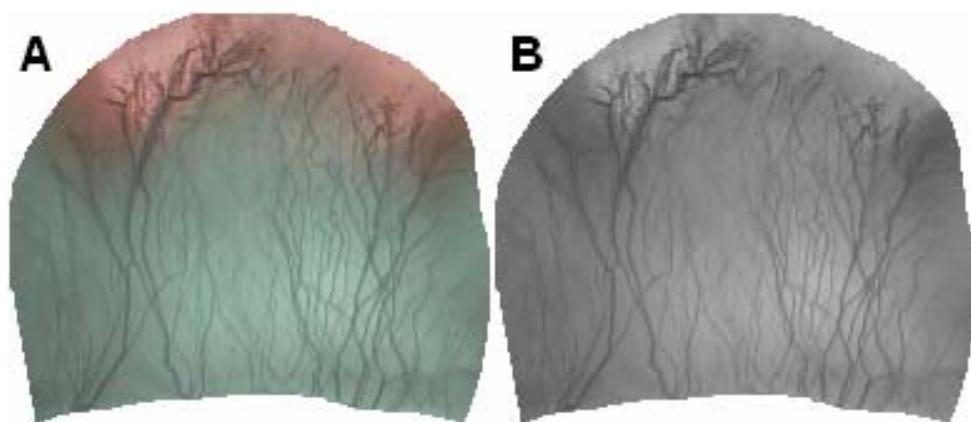
**FIGURA 21** – Representação de imagens digitais.

O procedimento de conversão da imagem colorida para a imagem em tons de cinza gera, inicialmente, uma nova imagem no padrão HSI, mediante a transformação dos componentes RGB para HSI. O sistema então analisa os componentes *R* (vermelho), *G* (verde), *B* (azul) do modelo RGB e o componente *I* (intensidade) do modelo HSI — que são, de fato, imagens em tons de cinza, como

relatado anteriormente — para determinar o mais adequado, ou seja, aquele que apresenta o melhor contraste. A escolha se baseia nas propriedades estatísticas da imagem, considerando que a média dos níveis de cinza é uma medida do brilho e o desvio padrão é uma medida do contraste. Assim, a média e o desvio padrão dos níveis de cinza das 4 imagens (componentes *R*, *G*, *B* e *I*) são calculados. A imagem ideal, ou seja, com o melhor contraste, é aquela que apresenta o maior desvio padrão e será, portanto, a escolhida (SANTOS, 1995; BANON, 1998; GONZALEZ; WOODS, 2000c) (Figura 23).



**FIGURA 22** – Imagem com 256 tons de cinza (esquerda) e o seu histograma (direita).

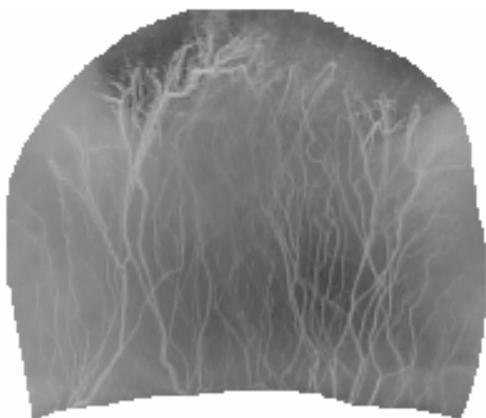


**FIGURA 23** – Imagem original (A) e sua análoga em 256 tons de cinza (B), correspondente ao componente *G* do modelo RGB: o escolhido pelo sistema. Magnificação de 25 vezes.

Em seguida, obtém-se o negativo da imagem, através da seguinte função de transformação:

$$g(x,y) = 255 - f(x,y), \quad (3.9)$$

onde  $f(x, y)$  e  $g(x, y)$  são funções discretas que associam um nível de cinza ao ponto  $(x, y)$  nas imagens original e transformada, respectivamente. A operação é realizada em todos os *pixels* pertencentes a  $f(x, y)$ . As transformações são funções que implicam numa modificação da imagem original e são classificadas em pontuais e locais. Neste caso, trata-se de uma transformação pontual, onde o nível de cinza de um dado ponto na imagem de saída (transformada) depende apenas do nível de cinza do ponto correspondente na imagem de entrada (original). O objetivo é reverter a ordem do preto para o branco, de modo que a intensidade da imagem de saída diminua à medida que a intensidade da imagem de entrada aumente (PINTO, 1996; BANON, 1998; GONZALEZ; WOODS, 2000c). Assim, os vasos agora aparecem mais claros e o fundo mais escuro (Figura 24).



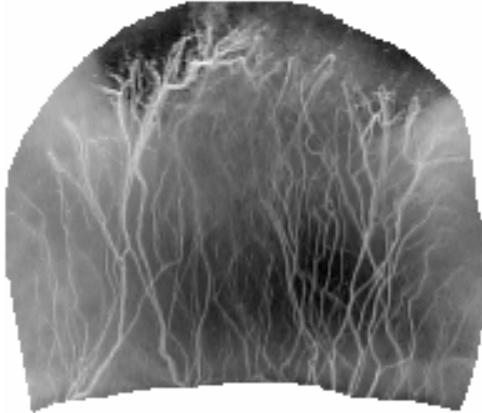
**FIGURA 24** – Negativo da imagem B da Figura 23. Magnificação de 25 vezes.

O próximo passo é a execução do algoritmo de alargamento de contraste, que consiste em aumentar a escala dinâmica dos níveis de cinza da imagem, isto é, promover o espalhamento dos níveis de cinza ao longo do intervalo [0, 255]. Para tanto, usa a seguinte função linear de transformação pontual:

$$g(x,y) = 255 \cdot \frac{f(x,y) - Min}{Max - Min}, \quad (3.10)$$

onde  $f(x, y)$  é a imagem de entrada,  $x$  e  $y$  são as coordenadas espaciais,  $Min$  e  $Max$  são os valores mínimo e máximo, respectivamente, dos níveis de cinza dessa imagem e  $g(x, y)$  é a imagem de saída (resultante). Assim,  $Min$  e  $Max$  corresponderão a 0 e 255, respectivamente, na imagem resultante. A operação é aplicada em todos os *pixels*. O algoritmo aumenta o contraste, porém preserva a ordem dos níveis de cinza, impedindo, assim, a criação de artefatos (COMELLI et

*al.*, 1995; PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000c; TUBIC *et al.*, 2001) (Figura 25).



**FIGURA 25** – Resultado da aplicação do algoritmo de alargamento do contraste na imagem da Figura 24. Magnificação de 25 vezes.

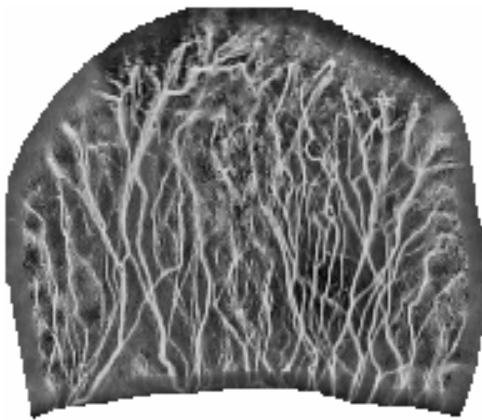
A etapa seguinte consiste na aplicação de um algoritmo para intensificar o contraste que usa uma função de transformação localmente adaptativa. Numa transformação local, o nível de cinza de um dado ponto na imagem transformada depende não apenas do nível de cinza do ponto correspondente na imagem original, mas também dos níveis de cinza de uma vizinhança centrada nesse ponto. Vizinhança ou janela é, pois, o conjunto de *pixels* imediatamente adjacentes àquele que está sendo processado (PINTO, 1996; BANON, 1998). Assim, considere uma imagem  $f(x, y)$ , onde  $x$  e  $y$  denotam as suas coordenadas espaciais. Seja ainda  $v(x, y)$  uma vizinhança ou janela quadrada de  $f(x, y)$ , de tamanho  $15 \times 15$  *pixels*, centrada no ponto  $(x, y)$ . Denotemos por  $Min_f$  e  $Max_f$  os níveis de cinza mínimo e máximo, respectivamente, em  $f(x, y)$  e por  $\mu_v$  e  $\sigma_v$  a média e o desvio padrão, respectivamente, dos níveis de cinza da vizinhança  $v(x, y)$ , centrada no ponto  $(x, y)$ . Definamos ainda a seguinte função sigmoidal:

$$s(z) = \left[ 1 + \exp\left( \frac{\mu_v - z}{\sigma_v} \right) \right]^{-1}. \quad (3.11)$$

Então, pode-se obter uma nova imagem  $g(x, y)$  a partir de  $f(x, y)$ , aplicando uma transformação adaptativa local definida por (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999; BARMAN *et al.*, 2000; SINTHANAYOTHIN *et al.*, 2002):

$$g(x, y) = 255 \cdot \frac{s(f(x, y)) - s(Min_f)}{s(Max_f) - s(Min_f)}. \quad (3.12)$$

A função analisa as propriedades estatísticas da vizinhança, promovendo um maior aumento do contraste para pequenos valores de  $\sigma_v$  (vizinhança com baixo contraste) e um menor aumento para valores de  $\sigma_v$  grandes (vizinhança com alto contraste) (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999). O procedimento melhora significativamente o contraste entre os vasos e o fundo (Figura 26), porém introduz ruídos, que são eliminados pelos processos subseqüentes.



**FIGURA 26** – Resultado do algoritmo de intensificação do contraste, que utiliza uma transformação adaptativa local, na imagem da Figura 25. Magnificação de 25 vezes.

A imagem resultante do procedimento anterior apresenta um fundo heterogêneo, granulado. É necessário torná-lo mais homogêneo. O algoritmo de remoção do fundo é então aplicado (LI; LIU; LO, 1997). Ele calcula, inicialmente, a média dos níveis de cinza para cada linha da imagem. Em seguida, a média da linha é subtraída do valor da intensidade de cada ponto ou *pixel* da linha processada (BENSEBAA; SUZIM, 2003). Assim, sejam  $x$  e  $y$  as coordenadas espaciais que representam as linhas e colunas, respectivamente, da imagem de entrada  $f(x, y)$  e  $n$  o número de *pixels* em cada linha, então a média  $m(x)$  dos níveis de cinza de uma dada linha é definida por:

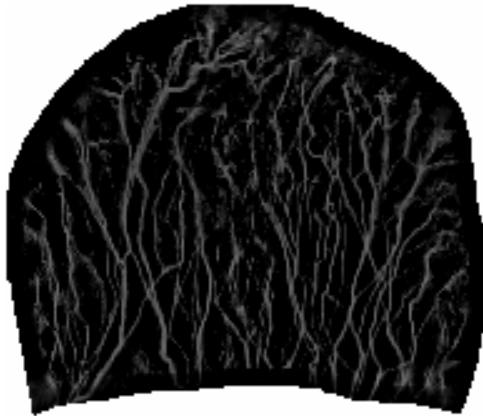
$$m(x) = \frac{1}{n} \sum_{y=0}^{n-1} f(x, y). \quad (3.13)$$

O algoritmo de remoção do fundo gera, assim, uma imagem de saída  $g(x, y)$  conforme a seguinte transformação:

$$g(x, y) = f(x, y) - m(x). \quad (3.14)$$

O resultado é uma imagem com melhor contraste entre a vasculatura e o fundo, em virtude da remoção do ruído, porém o procedimento torna a imagem mais escura, ou

seja, com os níveis de cinza concentrados nas proximidades do preto (0), na escala de cinza (Figura 27).



**FIGURA 27** – Resultado da aplicação do algoritmo de remoção do fundo na imagem da Figura 26. Magnificação de 25 vezes.

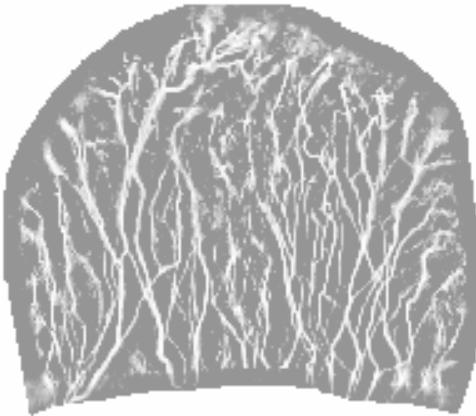
A equalização do histograma promove uma distribuição mais uniforme dos níveis de cinza de uma imagem, realçando, assim, o seu contraste. Esta técnica é então aplicada à imagem resultante do procedimento de remoção do fundo — que torna o histograma estreito e deslocado em direção ao preto, deixando a imagem escura — para obter uma uniformização do histograma, aumentar a escala dinâmica dos níveis de cinza e, consequentemente, melhorar o contraste. Considere uma imagem com  $n$  pixels e 256 tons de cinza, variando entre 0 e 255, onde  $z_k$  denota o  $k$ -ésimo nível de cinza e  $n_k$  o número de vezes que  $z_k$  aparece na imagem, sendo  $k = 0, 1, \dots, 255$ . O histograma dessa imagem, definido anteriormente, corresponde à probabilidade de ocorrência do nível  $z_k$ , sendo dado por:

$$h(z_k) = \frac{n_k}{n}. \quad (3.15)$$

A equalização do histograma é obtida então por uma função de transformação discreta  $T(z_k)$  aplicada a todos os pixels da imagem original, gerando assim uma imagem transformada, cujo  $k$ -ésimo nível de cinza,  $z'_k$ , é dado por (PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000c; FACON, 2002):

$$T(z_k) = z'_k = 255 \sum_{i=0}^k h(z_i) = 255 \sum_{i=0}^k \frac{n_i}{n}. \quad (3.16)$$

Dessa forma, se o nível de cinza de um dado pixel na imagem original é  $z$ , ele será substituído por  $z'$  na imagem transformada. O resultado do procedimento é mostrado na Figura 28.



**FIGURA 28** – Resultado da aplicação do procedimento de equalização do histograma na imagem da Figura 27. Magnificação de 25 vezes.

A próxima etapa consiste na aplicação de técnicas de morfologia matemática em imagens em tons de cinza. A morfologia matemática compreende duas operações básicas: dilatação e erosão. Considere uma imagem de entrada em tons de cinza  $f(x, y)$  e um elemento estruturante em forma de cruz (Figura 29C) definido como uma pequena imagem  $e(i, j)$ , de tamanho  $3 \times 3$  pixels, onde os pixels  $(2, 1), (1, 2), (2, 2), (3, 2)$  e  $(2, 3)$  são iguais a 255 (branco) e os demais iguais a 0 (preto). A forma do elemento estruturante é determinada pelos pixels iguais a 255 (branco). A dilatação em níveis de cinza de  $f(x, y)$  por  $e(i, j)$ , denotada por  $Dil(f, e)$ , é definida por:

$$Dil(f, e) = \text{Max}\{f(x - i, y - j) + e(i, j) \mid (x - i, y - j) \in D_f; (i, j) \in D_e\}, \quad (3.17)$$

sendo que  $\text{Max}$  é uma função que retorna o valor máximo do seu argumento,  $D_f$  e  $D_e$  são os domínios de  $f(x, y)$  e  $e(i, j)$ , respectivamente. Assim, a operação dilatação de  $f(x, y)$  por  $e(i, j)$  consiste em substituir o valor de cada pixel da imagem de entrada pelo maior valor (mais claro) dentre os pixels pertencentes a uma vizinhança definida pela forma do elemento estruturante e centrada no pixel em operação. Por outro lado, a erosão em tons de cinza de  $f(x, y)$  por  $e(i, j)$ , denotada por  $Ero(f, e)$ , é definida por:

$$Ero(f, e) = \text{Min}\{f(x + i, y + j) - e(i, j) \mid (x + i, y + j) \in D_f; (i, j) \in D_e\}, \quad (3.18)$$

onde  $\text{Min}$  é uma função que retorna o valor mínimo do seu argumento,  $D_f$  e  $D_e$  são os domínios de  $f(x, y)$  e  $e(i, j)$ , respectivamente. Assim, a erosão de  $f(x, y)$  por  $e(i, j)$  é a operação dual da dilatação e consiste em substituir o valor de cada pixel da imagem de entrada pelo menor valor (mais escuro) dentre os pixels pertencentes a uma vizinhança centrada no pixel em operação e definida pela forma do elemento

estruturante (ANDRADE, 1993; LI; LIU; LO, 1997, MATTA, 1998; SCHMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000e; SBEH *et al.*, 2001; TUBIC *et al.*, 2001).

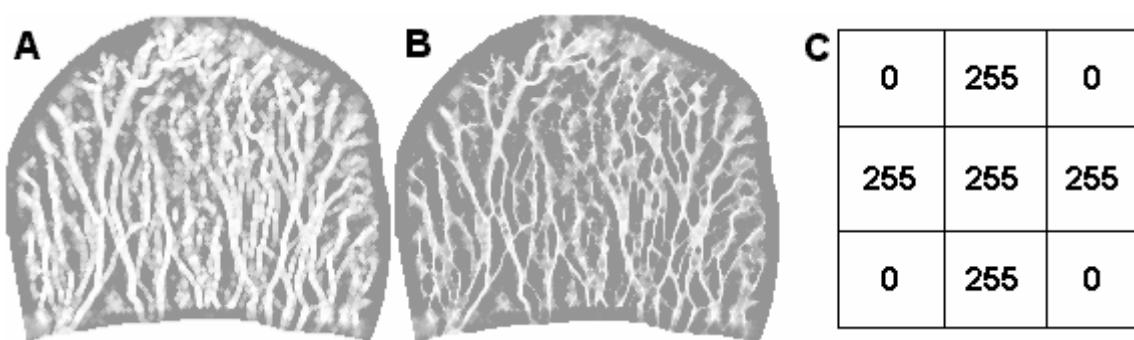
A partir das duas operações morfológicas básicas, definem-se outras adicionais, como o fechamento e a abertura de imagens em tons de cinza. O fechamento de uma imagem  $f(x, y)$  por um elemento estruturante  $e(i, j)$ , denotada por  $Fec(f, e)$ , é definida por:

$$Fec(f, e) = Ero(Dil(f, e), e), \quad (3.19)$$

ou seja, o fechamento é a dilatação de  $f(x, y)$  por  $e(i, j)$ , seguida da erosão do resultado por  $e(i, j)$ . Contrariamente, a abertura de  $f(x, y)$  por  $e(i, j)$ , denotada por  $Abe(f, e)$ , é definida por:

$$Abe(f, e) = Dil(Ero(f, e), e), \quad (3.20)$$

Isto é, a abertura consiste na aplicação de uma erosão seguida de uma dilatação (LI; LIU; LO, 1997, MATTA, 1998; SCHIMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000e; TUBIC *et al.*, 2001). O sistema executa então as operações dilatação (Figura 29A) e erosão (Figura 29B) em seqüência, usando o mesmo elemento estruturante, configurando, assim, o fechamento morfológico. A operação fechamento, por sua vez, separa regiões escuras próximas, conserva regiões claras afastadas e conecta regiões claras próximas, remove detalhes escuros preservando os elementos claros, de acordo com a forma do elemento estruturante, deixando a imagem mais regular (MATTA, 1998; SCHMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000e). Especificamente para esta aplicação, o objetivo da operação fechamento é corrigir pequenas desconexões decorrentes dos processos anteriores e da aquisição de imagem, bem como enfatizar pequenos vasos obscurecidos na imagem original (Figura 29).



**FIGURA 29** – Operações morfológicas em imagens em tons de cinza. A imagem A mostra o resultado da operação dilatação aplicada à imagem da Figura 28 e a imagem B o resultado da aplicação da operação erosão na imagem A, utilizando, em ambos os casos, um elemento estruturante (C) em forma de cruz (valores iguais a 255). Assim, a imagem B corresponde ao resultado da operação fechamento (dilatação seguida da erosão). Magnificação de 25 vezes.

O passo seguinte, o último do módulo de pré-processamento, é a aplicação de um algoritmo para a detecção das bordas dos objetos da cena, ou seja, os vasos sangüíneos. A determinação dos contornos dos vasos é importante para delinear e realçar os seus trajetos, destacando-os do fundo. Borda ou contorno corresponde a transições abruptas ou descontinuidades nos níveis de cinza. Assim, um operador que seja sensível a essas mudanças nos níveis de cinza funcionará exatamente como um detector de bordas. Um operador de diferenciação é comumente usado com essa finalidade. A derivada pode ser interpretada como a taxa de mudança de uma função. Ora, numa imagem  $f(x, y)$ , a taxa de mudança nos níveis de cinza é maior justamente nas proximidades das bordas e menor nas áreas constantes, correspondendo aos objetos, o que justifica a aplicação de operadores diferenciais como detectores de bordas. Para a diferenciação de uma imagem  $f(x, y)$ , empregam-se operadores diferenciais de primeira ordem, comumente o gradiente,  $\nabla f(x, y)$ , nos quais as bordas correspondem aos valores máximos; e de segunda ordem, como o laplaciano  $\nabla^2 f(x, y)$ , onde as bordas correspondem aos cruzamentos por zero (SCHMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000d; FACON, 2002).

Este sistema utiliza o laplaciano de uma função gaussiana bidimensional com a finalidade de realçar as bordas. O laplaciano de uma função bidimensional  $f(x, y)$  é uma derivada de segunda ordem definida por:

$$\nabla^2 f = \frac{\partial^2 f}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 f}{\partial y^2}. \quad (3.21)$$

O laplaciano é um operador diferencial que, aplicado à imagem, detecta transições na intensidade dos níveis de cinza, isto é, as bordas, porém é bastante sensível a ruídos — pontos que destoam dos seus vizinhos imediatos. Pode ser implementado na forma digital (discreta) mediante o emprego de máscaras espaciais, como a de tamanho 3 x 3 mostrada na Figura 30A — uma aproximação digital do laplaciano (SANTOS, 1995; SCHMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000d; FACON, 2002).

Máscara, janela ou filtro é uma pequena matriz bidimensional cujos coeficientes determinam a natureza da operação a ser realizada. O laplaciano pode então ser aplicado a uma imagem mediante a convolução dessa imagem com a máscara mostrada na Figura 30A. Considere uma imagem  $f(x, y)$  e uma máscara  $m(i, j)$  de tamanho 3 x 3. A convolução de  $f(x, y)$  por  $m(i, j)$  é uma função  $g(x, y)$  dada pelo duplo somatório:

$$g(x, y) = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 f(x+i-2, y+j-2) \cdot m(i, j). \quad (3.22)$$

Assim, a convolução de  $f(x, y)$  por  $m(i, j)$  é uma transformação local que gera uma nova imagem  $g(x, y)$ , onde o valor de um determinado *pixel* localizado em  $(x, y)$  é dado pela soma dos produtos dos *pixels* pertencentes a uma vizinhança de tamanho  $3 \times 3$  e centrada em  $(x, y)$ , na imagem original, pelos coeficientes correspondentes na máscara  $m(i, j)$ . A convolução de imagens com máscaras ou filtros espaciais é também denominada filtragem espacial (PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000b; FACON, 2002).

A	0	-1	0	B	0,25	0,43	0,25
-1	4	-1		0,43	0,73	0,43	
0	-1	0		0,25	0,43	0,25	

**FIGURA 30** – Máscaras usadas na implementação digital do operador laplaciano (A) e do filtro gaussiano (B).

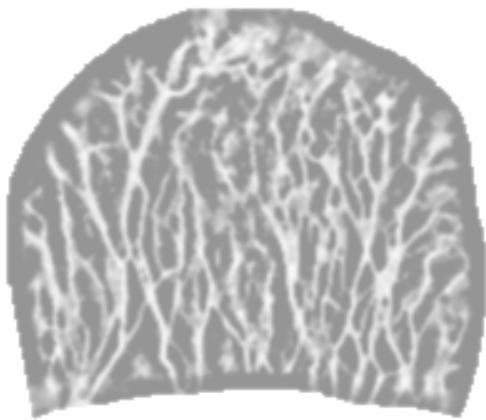
O laplaciano é um tipo de filtro passa-altas. Esses filtros atenuam ou removem os componentes de baixa freqüência, deixando as altas freqüências inalteradas. Dessa forma, os contornos e os detalhes finos são realçados ou aguçados, porém têm o efeito indesejado de enfatizar o ruído porventura existente (SANTOS, 1995; PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000c, FACON, 2002). A aplicação do laplaciano, neste sistema, objetiva realçar ou reforçar as bordas, delineando o trajeto dos vasos sanguíneos, facilitando, por conseguinte, o processo de segmentação.

A gaussiana, na sua forma bidimensional, é uma função definida por:

$$G(x, y) = \left( \frac{1}{2\pi\sigma^2} \right) \exp \left( -\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} \right), \quad (3.23)$$

onde  $\sigma$  é o desvio padrão (SANTOS, 1995; POLAKOWSKI *et al.*, 1997; FACON, 2002; SOUZA, 2002; GHOSH; SARKAR; BHAUMIK, 2005). Analogamente ao laplaciano, uma aproximação digital da gaussiana pode ser obtida pelo uso de máscaras espaciais, cujos coeficientes dependem do valor de  $\sigma$ . O filtro gaussiano pode ser aplicado a uma imagem mediante a convolução dessa imagem com uma

dessas máscaras. A Figura 30B mostra uma máscara para o cômputo da gaussiana onde  $\sigma = 0,3$  (SANTOS, 1995). A gaussiana é um tipo de filtro passa-baixas. Esses filtros atenuam ou removem os componentes de alta freqüência — como bordas e detalhes finos — não afetando as baixas freqüências. Assim, suavizam os contornos e removem ruídos, porém diminuem a nitidez. O efeito resultante é a suavização ou turvação da imagem. (SANTOS, 1995; PINTO, 1996; SCHMID, 1999, GONZALEZ; WOODS, 2000c, FACON, 2002) (Figura 31).



**FIGURA 31** – Resultado da aplicação do filtro gaussiano na imagem *B* da Figura 29. Magnificação de 25 vezes.

O laplaciano da gaussiana é a segunda derivada de uma função gaussiana bidimensional, sendo dado por (SANTOS, 1995; YAGI; OHSHIMA; FUNAHASHI, 1997; SOUZA, 2002; GHOSH; SARKAR; BHAUMIK, 2005):

$$\nabla^2 G(x, y) = -\frac{1}{\pi \sigma^4} \left( 1 - \frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2} \right) \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right). \quad (3.24)$$

É também denominado operador de Marr-Hildreth ou operador LoG (*laplacian of gaussian*). Em termos computacionais, consiste em computar o filtro gaussiano seguido do operador laplaciano, mediante a convolução da imagem com as suas respectivas máscaras, como as da Figura 30. A combinação do laplaciano com a gaussiana é uma estratégia para contornar um efeito inconveniente do laplaciano. Este operador é extremamente sensível a ruídos, de modo que pode detectar contornos em locais indevidos. Assim, a execução prévia do filtro gaussiano, pelas suas propriedades suavizadoras, remove ruídos e suaviza pequenos objetos os quais não são detectados pelo laplaciano. Este operador, por sua vez, promove a detecção e o reforço das bordas dos objetos (vasos sanguíneos), delineando os

seus trajetos, cujo reconhecimento torna-se então facilitado (SANTOS, 1995; SCHMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000d; SOUZA, 2002). O resultado é uma imagem que, apesar de escura, revela vasos bem definidos e realçados contra um fundo homogêneo (Figura 32). Esses atributos aumentam sobremaneira o desempenho do algoritmo de segmentação; o próximo a ser executado. Antes, porém, o sistema exibe o histograma da imagem.



**FIGURA 32** – Resultado do operador laplaciano da gaussiana. Magnificação de 25 vezes.

Segmentação é o processo que subdivide uma imagem em seus objetos ou partes constituintes (GONZALEZ; WOODS, 2000d). Os objetos de interesse apresentam uma constância ou continuidade nos níveis de cinza, constituindo, pois, regiões homogêneas. As regiões ou objetos de interesse são então extraídos da imagem para subsequente processamento, como reconhecimento ou descrição. A definição do objeto ou objetos é, pois, fundamental e depende de cada aplicação. Neste sistema, segmentação significa separar vasos sanguíneos (objetos ou regiões de interesse) dos demais componentes da cena (fundo). A segmentação automática é uma das tarefas mais importantes, e também uma das mais difíceis, em processamento de imagens. Daí a importância do pré-processamento. Existem várias técnicas de segmentação. A mais utilizada, e uma das mais importantes, é a binarização ou limiarização (SANTOS, 1995; GONZALEZ; WOODS, 2000d; FACON, 2002; SOUZA, 2002).

A binarização ou limiarização consiste em converter uma imagem com vários níveis de cinza em outra com apenas 2 níveis, preto (0) e branco (1), onde branco representa o objeto e preto, o fundo, ou vice-versa. Uma imagem com apenas 2 tons de cinza é dita binária. Imagens em tons de cinza de 8 bits, quando

binarizada, o preto é denotado por 0 e o branco por 255. A limiarização pode ser global ou adaptativa. A primeira consiste em estabelecer um nível de cinza, o limiar, tal que os *pixels* da imagem original com níveis de cinza menores que o limiar são considerados como pertencentes ao fundo e igualados a 0 (preto) na imagem binária, e os *pixels* cujos níveis de cinza sejam maiores ou iguais ao limiar são considerados como pertencentes ao objeto e assim igualados a 255 na imagem binária. Assim, a limiarização de uma imagem em tons de cinza  $f(x, y)$  é uma operação que gera uma imagem binária  $g(x, y)$ , tal que:

$$g(x, y) = \begin{cases} 255, & \text{se } f(x, y) \geq L \text{ (objeto)} \\ 0, & \text{se } f(x, y) < L \text{ (fundo)}, \end{cases} \quad (3.25)$$

onde  $L$  é o limiar. Este conceito pode ser generalizado para determinar um intervalo de tons de cinza, definido por um limiar mínimo e um limiar máximo  $[L_{\min}, L_{\max}]$ , que contém a região ou regiões de interesse. A imagem binária  $g(x, y)$  é agora obtida pela seguinte transformação:

$$g(x, y) = \begin{cases} 255, & \text{se } L_{\min} \leq f(x, y) \leq L_{\max} \\ 0, & \text{se } f(x, y) < L_{\min} \text{ ou } f(x, y) > L_{\max}. \end{cases} \quad (3.26)$$

A escolha do limiar ou da faixa de limiares é, portanto, um processo crítico (SANTOS, 1995; GONZALEZ; WOODS, 2000d; FACON, 2002; SOUZA, 2002).

Na binarização adaptativa, por outro lado, um limiar é calculado para cada *pixel* baseado nos níveis de cinza de uma vizinhança de tamanho  $m \times m$ , centrada nesse *pixel*. O método de Niblack é, dentre os que utilizam essa abordagem local, um dos melhores (TRIER; TAXT, 1995). Este método computa um limiar para cada *pixel* baseado na média e no desvio padrão de uma janela ou vizinhança  $m \times m$  centrada nesse *pixel*. Assim, para um *pixel* localizado em  $(x, y)$ , o limiar  $L(x, y)$  é dado por:

$$L(x, y) = \mu(x, y) + k \cdot \sigma(x, y), \quad (3.27)$$

onde  $\mu(x, y)$  e  $\sigma(x, y)$  são a média e o desvio padrão, respectivamente, dos níveis de cinza da vizinhança centrada em  $(x, y)$  e  $k$  é uma constante (TRIER; JAIN, 1995; PEREZ, 2001). O valor de  $k$  controla a influência do desvio padrão sobre a média da janela, sendo usado para ajustar o quanto da borda do objeto é considerado como sendo parte do mesmo.

Entretanto, para as imagens processadas por este sistema, a limiarização local não mostrou bons resultados. Sendo assim, optou-se por uma modificação do

método de Niblack, calculando-se um limiar global ( $L$ ) baseado na média ( $\mu$ ) e no desvio padrão ( $\sigma$ ) dos níveis de cinza de toda a imagem (SANTOS, 1995; PEREZ, 2001), conforme a seguinte equação:

$$L = \mu + k.\sigma , \quad (3.28)$$

onde  $k = 0,15$  mostrou os melhores resultados. É interessante notar que o valor de  $L$  é uma função do brilho e do contraste da imagem, uma vez que este está associado ao desvio padrão e aquele à média dos níveis de cinza. Uma vez estabelecido o valor do limiar, a binarização é então efetivada, de modo que os *pixels* da imagem original com níveis de cinza menores que o limiar são classificados como fundo e igualados a 0 (preto) na imagem binária, e os *pixels* cujos níveis de cinza sejam maiores ou iguais ao limiar são classificados como pertencentes aos vasos sanguíneos e igualados a 255 na imagem binária. O resultado da binarização é mostrado na Figura 33.



**FIGURA 33** – Resultado da aplicação do algoritmo de binarização na imagem da Figura 32. Magnificação de 25 vezes.

A fase seguinte é a de pós-processamento, necessária para a remoção de pequenas regiões na imagem binarizada, que foram classificadas como vasos pelo processo de binarização, mas que decerto não os são. Para tanto, o sistema realiza a parametrização das regiões (vasos) segmentadas, isto é, a determinação de parâmetros que caracterizam essas regiões (descritores regionais), considerando que vasos sanguíneos são estruturas filamentares que se dispõem em forma de rede ou árvore. Dois descritores que naturalmente identificam um objeto ou região são a área ( $A$ ) e o perímetro ( $P$ ). A área é, de fato, a mais elementar propriedade de uma região, sendo útil para distinguir os vasos das partículas pertencentes ao compartimento não vascular (NISSANOV *et al.*, 1995; SINTHANAYOTHIN *et al.*,

1999). Em imagens digitais, a área é dada pelo número de *pixels* que pertencem à região e o perímetro corresponde ao número de *pixels* que pertencem à sua borda (ALBUQUERQUE; ALBUQUERQUE, 2003; GONZALEZ; WOODS, 2000e). Esses dois atributos podem ser associados, definindo, assim, um outro parâmetro denominado compacidade ( $C$ ), um descritor de forma, que é dada por (BAE *et al.*, 1993; RANGAYYAN, 1997; SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000e; SHARMA; SHARMA; SARKAR, 2005):

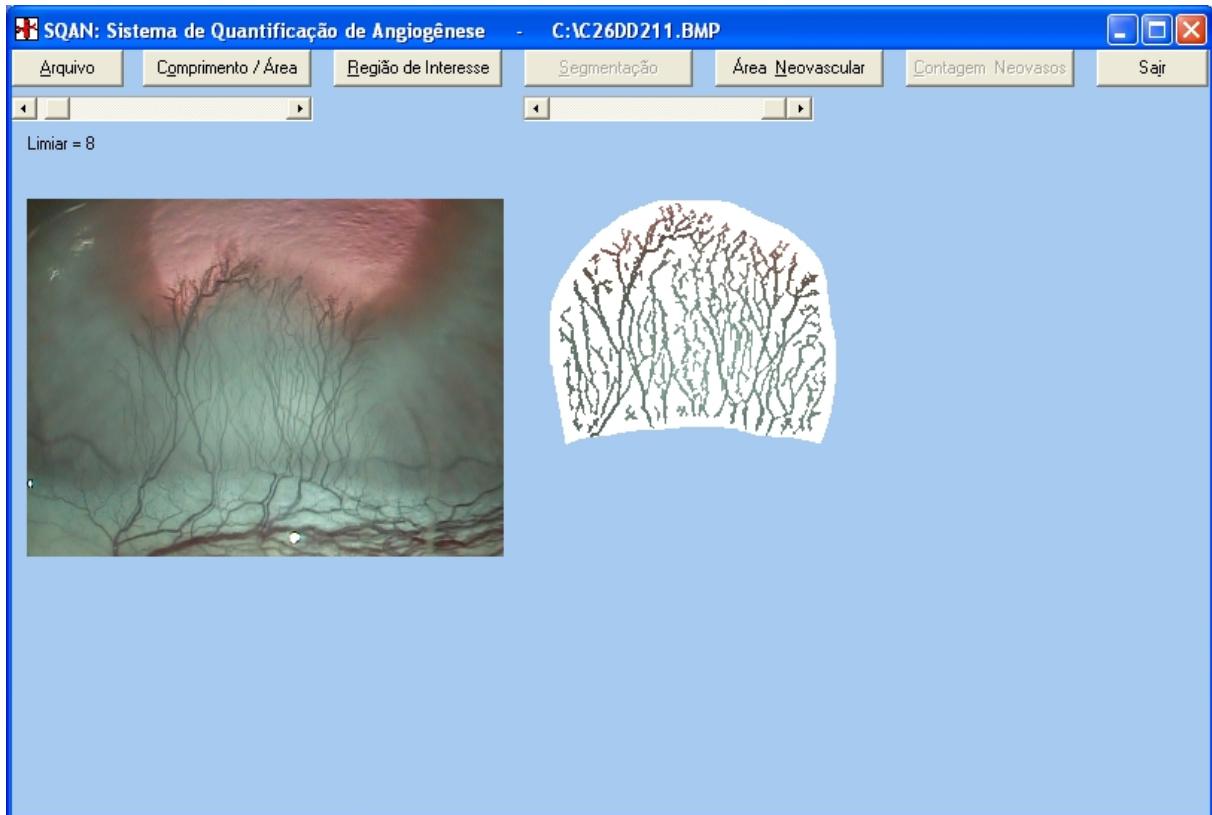
$$C = \frac{P^2}{A}. \quad (3.29)$$

A compacidade é uma quantidade sem dimensão, não variando a mudanças de escala ou orientação, sendo mínima quando a região tiver a forma de um círculo ( $C = 4\pi$ ). O sistema então calcula esses 3 parâmetros para regiões que possam ser contidas numa janela quadrada de  $11 \times 11$  *pixels* ( $121 \text{ pixels}^2$  de área). São removidas aquelas regiões cujas áreas são menores do que  $10 \text{ pixels}^2$ , bem como aquelas cujas compacidades são menores do que 30. O resultado da aplicação do algoritmo na imagem da Figura 33 é mostrado na Figura 34. Notar que as pequenas regiões, erroneamente classificadas como vasos, vistas na imagem da Figura 33 foram eliminadas na imagem resultante.



**FIGURA 34** – Resultado da etapa de pós-processamento. Observar que as regiões inconsistentes foram eliminadas. Magnificação de 25 vezes.

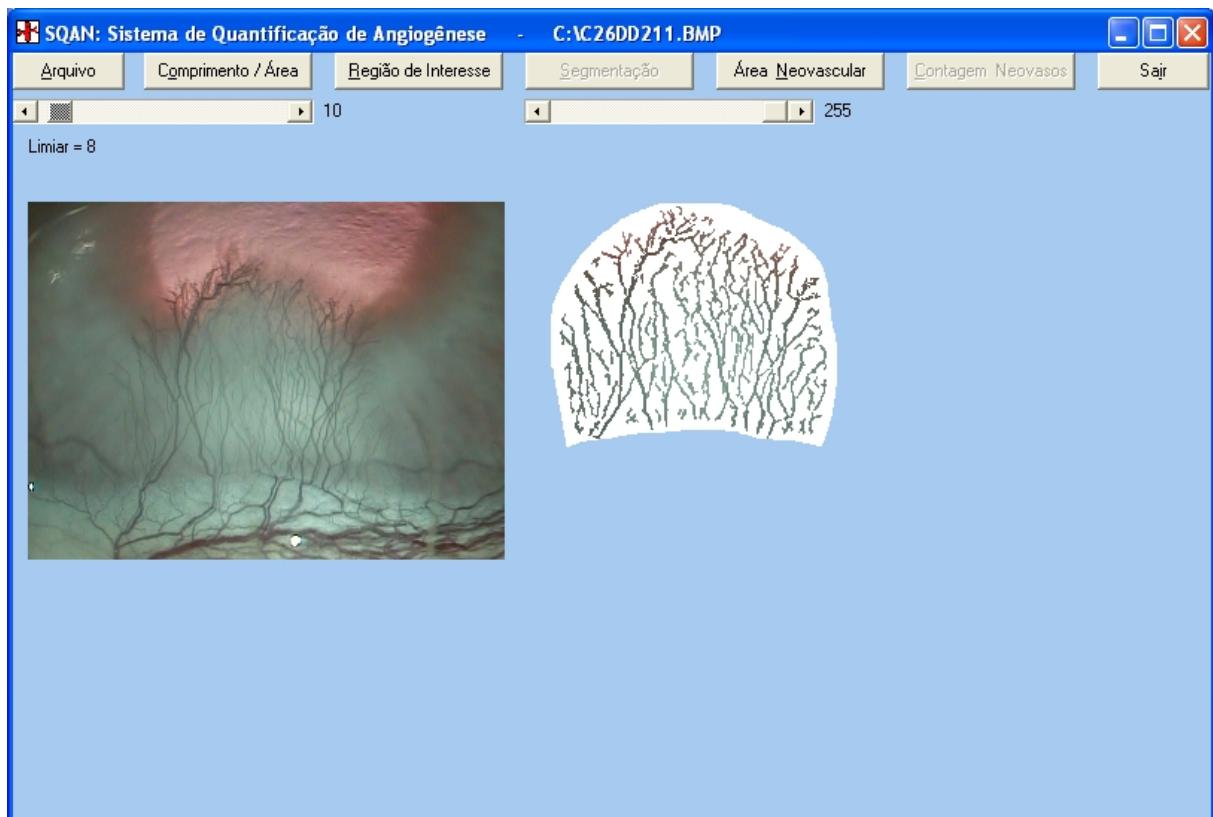
O software mostra, em seguida, a imagem binarizada e o valor do limiar para que o usuário avalie se a segmentação automática dos vasos foi adequada (Figura 35). Apesar de binária, com os vasos rotulados de branco (255) e o fundo de preto (0), a imagem é mostrada na tela com as regiões correspondentes aos vasos nas suas cores originais e o fundo na cor branca.



**FIGURA 35** – Após as fases de pré-processamento, segmentação e pós-processamento, o sistema mostra a imagem resultante, com os vasos nas suas cores originais e o fundo na cor branca, assim como o valor do limiar de segmentação.

O sistema disponibiliza também duas barras de rolagem, cujas posições variam de 0 a 255, correspondendo aos níveis de cinza, que possibilitam o ajuste interativo do limiar, caso o operador julgue necessário. As duas barras permitem estabelecer um novo limiar global, mantendo-se uma delas no nível de cinza máximo (255) e movendo a outra para o limiar desejado, bem como estabelecer uma faixa de limiares, posicionando-se uma das barras no nível de cinza correspondente ao limiar inferior e a outra no nível de cinza correspondente ao limiar superior (Figura 36). Neste caso, serão classificados como pertencentes aos vasos os *pixels* cujos níveis de cinza estejam no intervalo estabelecido; caso contrário, serão rotulados como pertencentes ao fundo. A estratégia de utilizar duas barras de rolagem para estabelecer uma faixa de limiares também possibilita outras opções, como a inversão entre objeto e fundo, bastando, para tanto, fixar a posição de uma das barras e mover a outra para uma posição superior ou inferior, dependendo do posicionamento relativo prévio da barra movida em relação à fixada. Isto permite que o usuário avalie o desempenho da segmentação de outro ponto de vista, porém é necessário que, antes de realizar a quantificação, a inversão seja desfeita. A

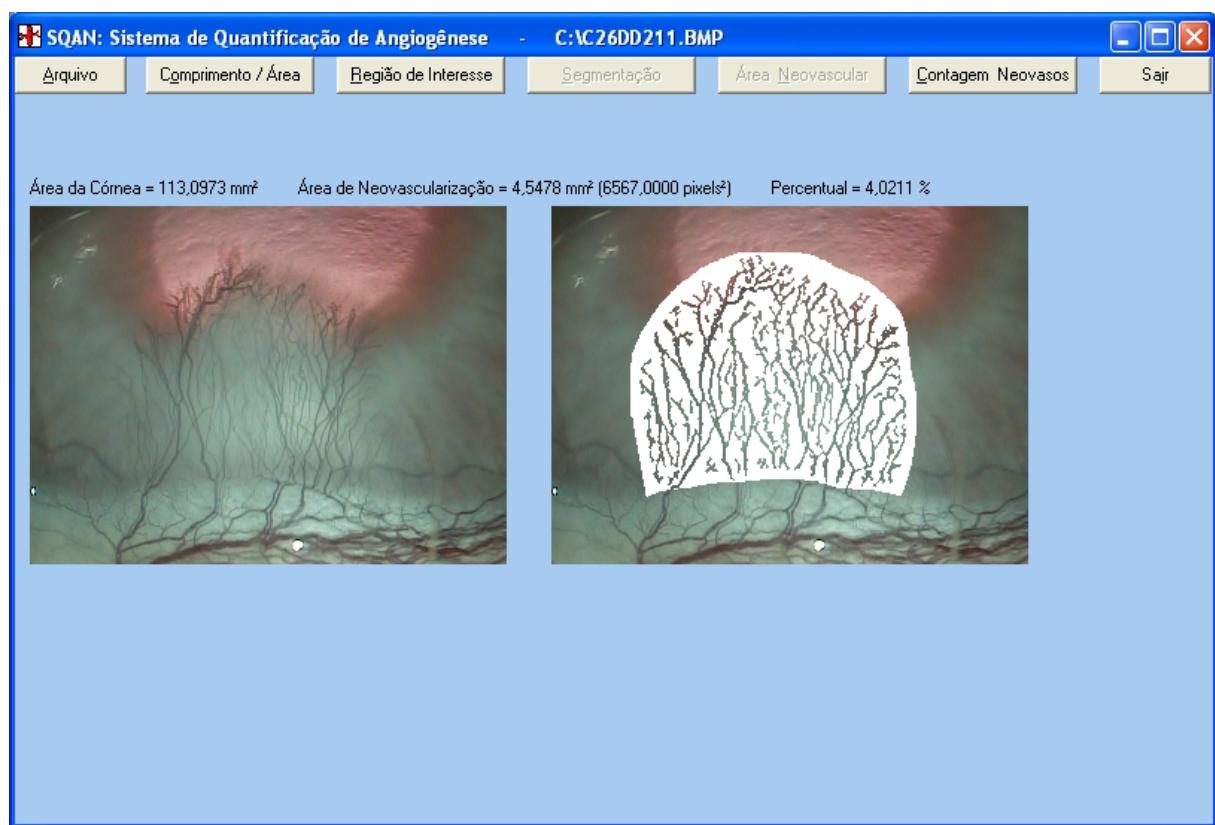
imagem é então novamente binarizada e pós-processada sempre que o limiar for alterado, sendo, em seguida, mostrada na tela como anteriormente descrito. A operação de escolha do novo limiar ou da faixa de limiares é facilitada pela exibição prévia do histograma da imagem resultante da fase de pré-processamento, a partir do qual o usuário pode analisar os níveis de cinza que correspondem aos vasos.



**FIGURA 36** – O software também disponibiliza duas barras de rolagem para que o operador ajuste interativamente uma faixa de limiares, caso julgue necessário.

Uma vez binarizada e pós-processada para eliminação de inconsistências, a imagem está pronta para ser analisada pelo módulo de quantificação, pois contém apenas duas informações, vasos sanguíneos e fundo; este corresponde aos *pixels* com valor 0 (preto) e aqueles aos *pixels* com valor 255 (branco). O objetivo do módulo de quantificação é determinar a área correspondente à região de neovascularização, o comprimento vascular total e o número de neovasos, os quais constituem os parâmetros de quantificação de angiogênese. O sistema, inicialmente, computa a área de neovascularização ( $A_N$ ). Para tanto, basta contar o número de *pixels* iguais a 255 (branco), ou seja, aqueles correspondentes aos vasos sanguíneos. O valor da área de neovascularização em  $\text{pixels}^2$  é, em

seguida, convertido para  $\text{mm}^2$ , de acordo com o fator de escala previamente estabelecido. O percentual da área de neovascularização em relação à área total da córnea é também calculado, considerando que, no plano, a córnea corresponde a um círculo cujo raio é, no coelho, aproximadamente 6 mm (D'AMATO *et al.*, 1994), de modo que sua área é igual a  $36\pi \text{ mm}^2$ . Os valores da área de neovascularização, em  $\text{pixels}^2$  e  $\text{mm}^2$ , bem como o percentual desta em relação à área da córnea são então exibidos, juntamente com a região de interesse, contendo os vasos sanguíneos, reinserida na imagem original (Figura 37).



**FIGURA 37** – Área de neovascularização segmentada e reinserida na imagem original. Os valores da área de neovascularização, em  $\text{mm}^2$  e  $\text{pixels}^2$ , da área total da córnea, em  $\text{mm}^2$ , e o percentual daquela em relação a esta são mostrados.

A determinação dos demais parâmetros requer que a imagem binarizada seja processada pelo algoritmo de esqueletização ou afinamento. A esqueletização consiste em reduzir uma região a uma forma simplificada (afinada), que corresponda a uma representação estrutural da forma original, preservando, assim, as suas características essenciais. A forma afinada de uma região é denominada esqueleto e representa o eixo médio dessa região (GONZALEZ; WOODS, 2000e). O algoritmo para esqueletização de imagens binárias implementado neste sistema baseia-se no

proposto por Zhang e Suen (1984), com algumas modificações para melhorar o seu desempenho. Considere uma imagem binária onde os *pixels* pertencentes a regiões têm valor 1, enquanto os do fundo têm valor 0. Considere ainda um *pixel*  $P_1(i, j)$  localizado no ponto  $(i, j)$ , e uma vizinhança de 8 (Figura 38), em relação a  $P_1$ , composta por:  $P_2(i-1, j)$ ,  $P_3(i-1, j+1)$ ,  $P_4(i, j+1)$ ,  $P_5(i+1, j+1)$ ,  $P_6(i+1, j)$ ,  $P_7(i+1, j-1)$ ,  $P_8(i, j+1)$  e  $P_9(i-1, j-1)$ . O método consiste na execução sucessiva de duas iterações. Na primeira iteração, um *pixel*  $P_1$  é removido se as seguintes condições forem satisfeitas:

- 1)  $2 \leq N(P_1) \leq 6$ ;
  - 2)  $T(P_1) = 1$ ;
  - 3)  $P_2 \cdot P_4 \cdot P_6 = 0$ ;
  - 4)  $P_4 \cdot P_6 \cdot P_8 = 0$ ;
- (3.30)

onde  $N(P_1)$  é o número de vizinhos não-nulos de  $P_1$  e  $T(P_1)$  é o número de transições 0-1 na seqüência ordenada  $P_2, P_3, \dots, P_8, P_9, P_2$ . Na segunda iteração, as condições para a remoção de um *pixel*  $P_1$  são:

- 1)  $2 \leq N(P_1) \leq 6$ ;
  - 2)  $T(P_1) = 1$ ;
  - 3)  $P_2 \cdot P_4 \cdot P_8 = 0$ ;
  - 4)  $P_2 \cdot P_6 \cdot P_8 = 0$ .
- (3.31)

Os dois procedimentos são repetidos enquanto existirem *pixels* a serem removidos (ZHANG; SUEN, 1984; GONZALEZ; WOODS, 2000e).

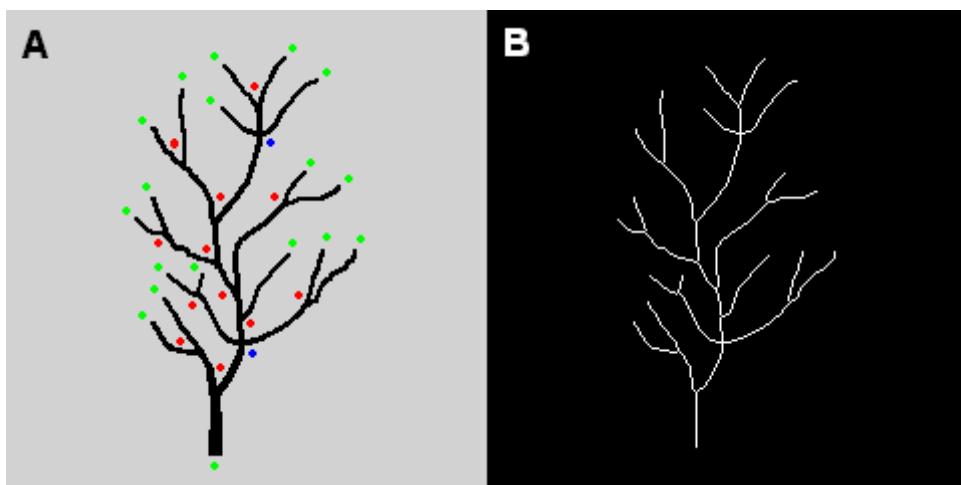
$P_9$	$P_2$	$P_3$
$P_8$	$P_1$	$P_4$
$P_7$	$P_6$	$P_5$

**FIGURA 38** – Vizinhança de 8 do *pixel*  $P_1$  usada pelo algoritmo de afinamento.

Assim, para obter o esqueleto, o algoritmo realiza um mapeamento da imagem ponto a ponto, onde identifica os *pixels* pertencentes aos contornos das regiões e decide se esses *pixels* devem ou não ser removidos, a partir da análise da conectividade destes com os seus 8 vizinhos. Os critérios de remoção são tais que não eliminam pontos terminais, não causam desconexões de segmentos nem

erosão excessiva, ao mesmo tempo que não permitem a ocorrência de *pixels* redundantes. O procedimento é executado de forma iterativa, promovendo uma erosão das bordas a cada iteração, preservando, porém, os *pixels* pertencentes ao esqueleto, sendo o algoritmo encerrado quando não mais houver pontos a serem removidos. Ao final do processo, as regiões são reduzidas a linhas com a espessura de um único *pixel* (ZHANG; SUEN, 1984; RIEDER; O'DROBINAK; GREENE, 1995; GONZALEZ; WOODS, 2000e).

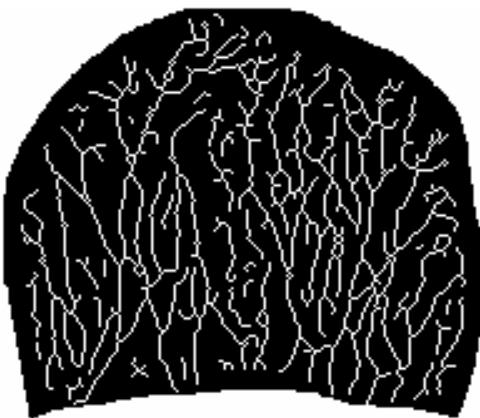
Na Figura 39, pode-se avaliar o desempenho do algoritmo de esqueletização ao processar uma imagem de uma árvore vascular hipotética (Figura 39A), reduzindo-a à forma afinada (Figura 39B). Notar a perfeita correspondência estrutural entre a árvore original e a sua análoga afinada, assim como a inexistência de desconexões ou de *pixels* redundantes. O resultado da aplicação do algoritmo na imagem da Figura 34 é mostrado na Figura 40. No esqueleto resultante, os vasos foram reduzidos a linhas com a espessura de um único *pixel*.



**FIGURA 39** – Árvore vascular esquemática (A) e sua análoga esqueletizada (B). Notar a perfeita correspondência estrutural e a inexistência de desconexões ou de *pixels* redundantes no esqueleto. Os pontos verdes na imagem A identificam os pontos terminais (um total de 18), os pontos vermelhos rotulam as bifurcações (que somam 12) e os azuis, os nós (em número de 2). Assim, de acordo com a Equação (3.32), existem 31 vasos.

A obtenção do esqueleto de uma árvore vascular é uma abordagem interessante para analisar as ramificações presentes nessa árvore, tendo em vista que preserva a distribuição espacial dos vasos (VICO *et al.*, 1998). Além disso, o esqueleto de uma árvore vascular provê uma medida direta do comprimento vascular total (LOZONSCHI *et al.*, 1999; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a;

PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b; WILD *et al.*, 2000). Por outro lado, com a esqueletização, a noção de calibre do vaso é perdida.

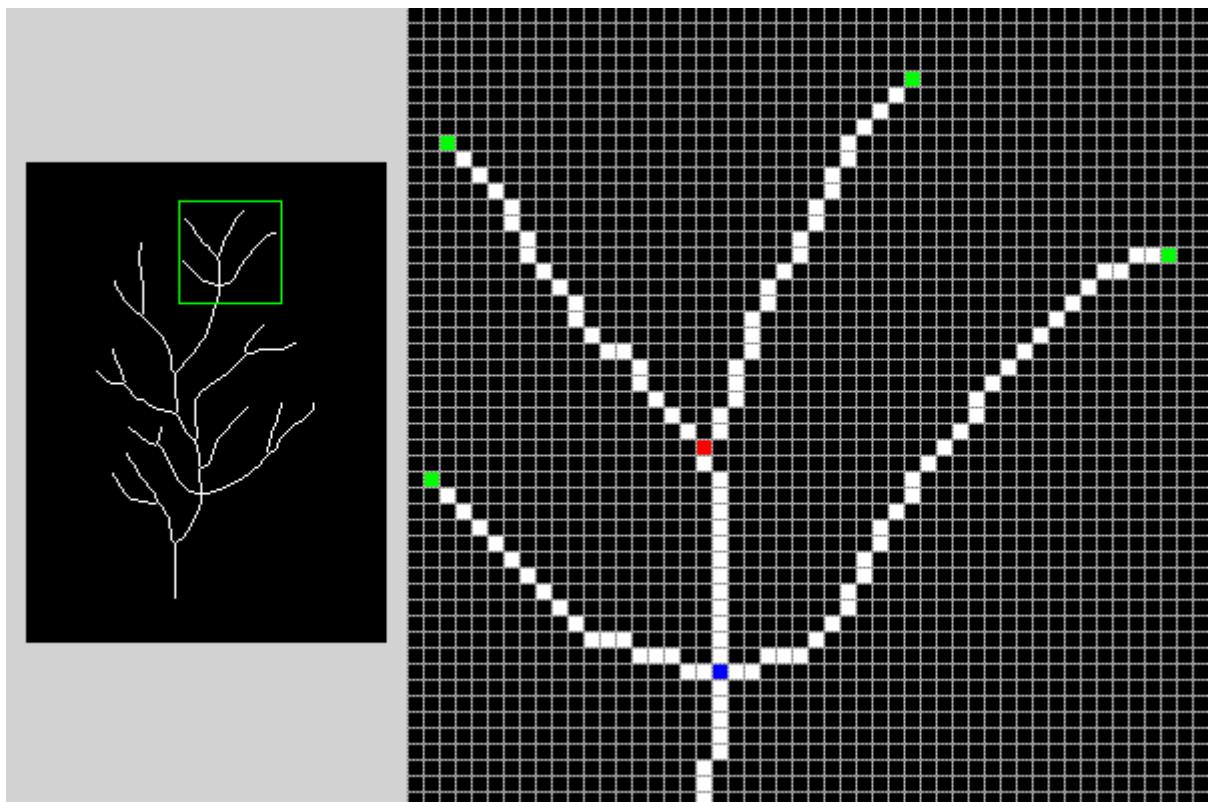


**FIGURA 40** – Resultado da aplicação do algoritmo de esqueletização na imagem da Figura 34. Magnificação de 25 vezes.

A partir da imagem esqueletizada, o sistema determina o comprimento vascular total, o número de vasos sanguíneos e o número de pontos terminais, bifurcações e nós. As três últimas medidas constituem parâmetros da arquitetura vascular, necessários para o cálculo do número de vasos sanguíneos, sendo que, neste estudo, nó significa um ponto em que um vaso se divide em 3 ou mais ramos. A Figura 39A mostra uma árvore vascular esquemática, onde estão identificados os pontos terminais, as bifurcações e os nós. Assim, inicialmente, o software calcula o valor do comprimento vascular total ( $C_T$ ), em pixels, mediante a contagem dos pixels que pertencem ao esqueleto e converte subsequentemente esse valor para milímetros, conforme o fator de escala. Em seguida, o algoritmo analisa cada pixel pertencente ao esqueleto, verificando a conectividade desse pixel com os seus 8 vizinhos, ou seja, os componentes de uma janela 3 x 3, centrada no pixel em operação (Figura 38). Dessa forma, se o pixel estiver conectado a apenas um dos vizinhos, ele será considerado um ponto terminal; se a conexão for com exatos 2 vizinhos, então o pixel pertence a um segmento do vaso; se o pixel estiver conectado a exatamente 3 vizinhos, ele será rotulado de bifurcação; se a conexão for com quatro ou mais vizinhos, o pixel será considerado um nó (Figura 41). Uma vez encerrada a rotulação, o sistema realiza então a contagem do número de terminais ( $T$ ), bifurcação ( $B$ ) e nós ( $N$ ). Logo após, calcula o número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ), a partir desses três parâmetros, de acordo com a seguinte equação:

$$N_V = \frac{T + 3B + \sum_{i=1}^N Z_i}{2}, \quad (3.32)$$

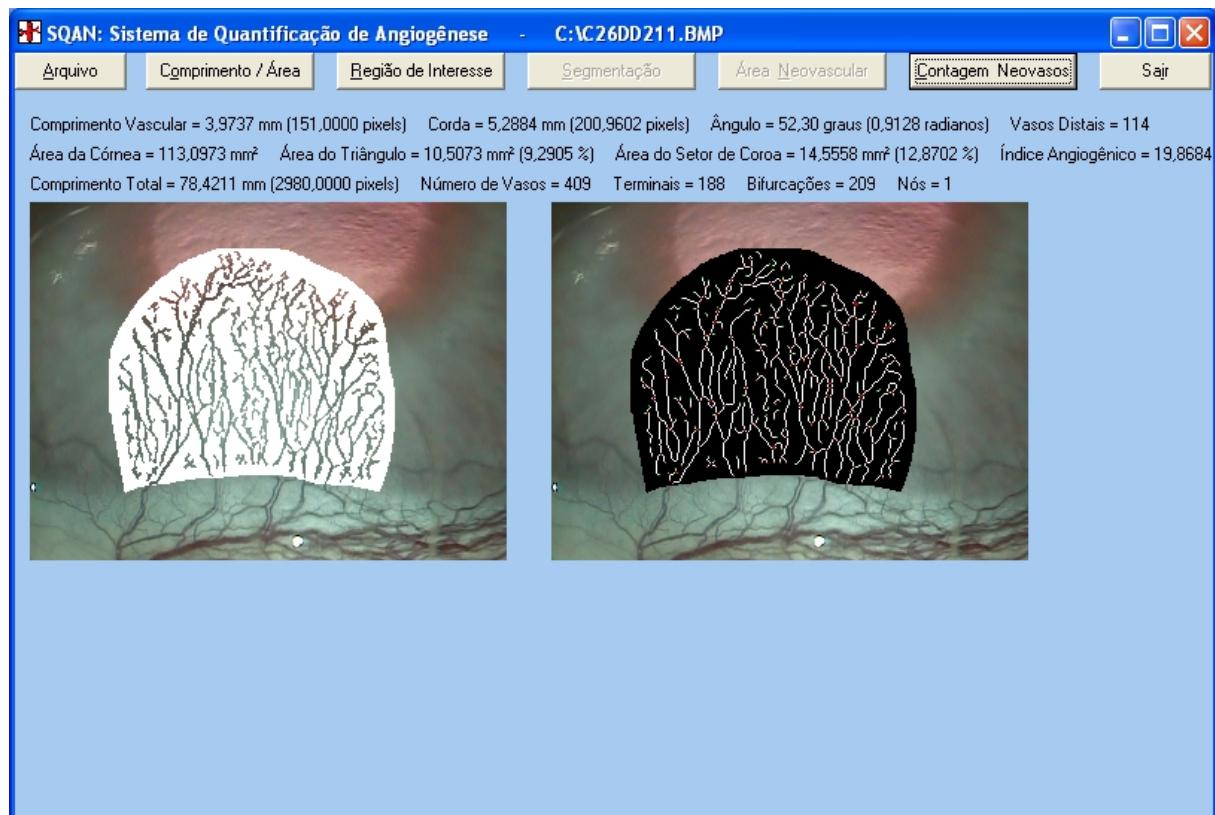
onde  $Z_i$  é o número de vizinhos conectados ao *pixel* que corresponde ao nó  $i$ . Como o número de vasos é uma quantidade inteira, valores fracionários de  $N_V$  são truncados, ou seja, apenas a parte inteira é considerada. Na seqüência, o sistema exibe o valor de  $C_T$  em *pixels* e mm, assim como os valores de  $N_V$ ,  $T$ ,  $B$  e  $N$ , conforme mostra a Figura 42.



**FIGURA 41** – Rotulação dos *pixels* do esqueleto como ponto terminal, bifurcação ou nó. A imagem da direita é uma ampliação do segmento do esqueleto delimitado pelo retângulo verde, onde cada quadrado corresponde a 1 *pixel* na imagem original. Notar que os *pixels* rotulados de verde estão conectados a apenas 1 vizinho, de modo que são considerados pontos terminais; o *pixel* em vermelho está conectado a 3 vizinhos, sendo, pois, uma bifurcação; o *pixel* em azul constitui um nó, uma vez que está conectado a 4 vizinhos; os demais *pixels* em branco estão conectados a 2 vizinhos, portanto pertencem ao corpo dos vasos.

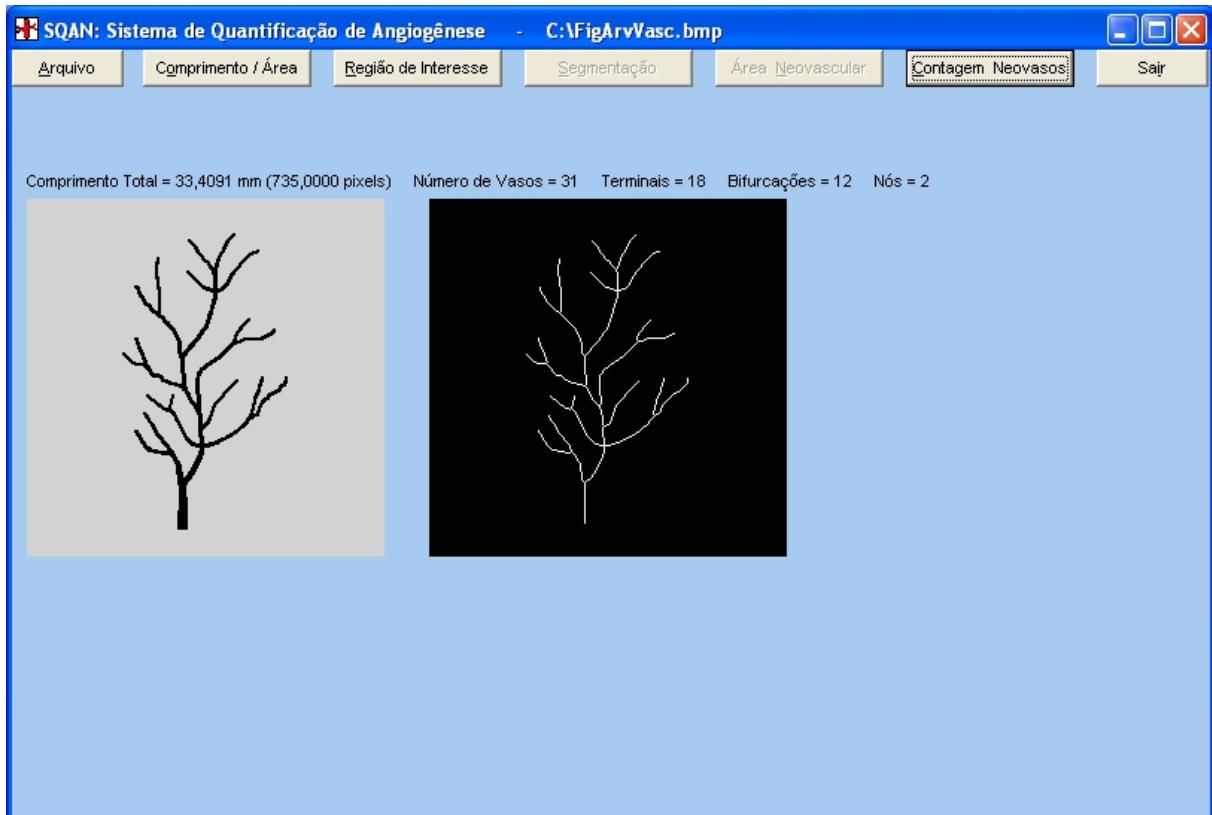
A Equação (3.32) determina que, se um vaso se divide em um dado ponto, os seus ramos constituem novos vasos e como tal são contados, pois o esqueleto preserva as ramificações, porém não fornece informação sobre o calibre dos vasos. Assim, um segmento vascular em forma de “Y” teria 3 vasos; outro em forma de “ψ”, teria 4 vasos; e um outro em forma de “ρ”, correspondendo a uma anastomose, teria 2 vasos. De acordo com tais critérios, pode-se concluir que a

árvore vascular esquemática da Figura 39A, à inspeção visual, tem 31 vasos, além de 18 pontos terminais, 12 bifurcações e 2 nós. De fato, quando essa mesma imagem é processada pelo *software*, valores idênticos a estes são obtidos (Figura 43).



**FIGURA 42** – Exibição do valor do comprimento vascular total, em mm e *pixels*, do número de vasos sanguíneos e do número de pontos terminais, bifurcações e nós. A imagem esqueletizada é reinserida na original. Os valores dos parâmetros de quantificação manual de angiogênese, calculados a partir do esqueleto, também são exibidos.

A imagem esqueletizada possibilita ainda que o *software* determine automaticamente o comprimento vascular radial ( $C_R$ ), a corda de neovascularização ( $C_N$ ) e o número de vasos distais. A partir desses dados, o sistema calcula, além do próprio comprimento vascular radial, os seguintes quantificadores de angiogênese: ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), área do setor de coroa circular ( $A_S$ ) e índice angiogênico ( $I_A$ ) (Figura 42). Tais parâmetros constituem uma medida indireta da resposta angiogênica e, como descrito anteriormente, foram utilizados, neste estudo, para quantificação da neovascularização pelo método manual.

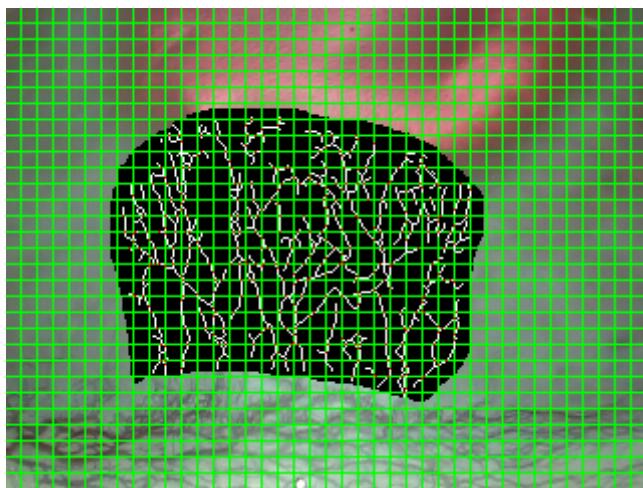


**FIGURA 43** – Determinação do comprimento vascular total, do número de vasos sangüíneos e do número de pontos terminais, bifurcações e nós na árvore vascular esquemática da Figura 39A.

Um outro método para estimar o número de vasos sangüíneos, tradicionalmente usado em análise estereológica, também foi implementado. O método consiste em superpor à imagem do tecido analisado, um sistema-teste desenhado com linhas retas arranjadas em forma de grade, composta por quadrados ou retângulos de dimensões padronizadas, e determinar o número de intersecções entre as linhas da grade e as estruturas que deseja quantificar (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994). Quando tais estruturas são vasos sangüíneos, o número de intersecções constitui uma medida da densidade vascular (RIEDER; O'DROBINAK; GREENE, 1995; KIRCHNER; SCHMIDT; GRUBER, 1996; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998). Em sistemas digitais, a grade é gerada por software e automaticamente superposta à imagem do tecido de interesse, que, por sua vez, pode ser oriundo dos diversos modelos de angiogênese. Assim, a mensuração da densidade vascular pode ser realizada de forma manual, contando-se o número de vezes que as linhas tocam os vasos durante uma inspeção visual (GREENE *et al.*, 1990; KIRCHNER; SCHMIDT; GRUBER, 1996; PAPAS, 2000), ou automática (RIEDER; O'DROBINAK; GREENE, 1995; PARSONS-WINGERTER *et*

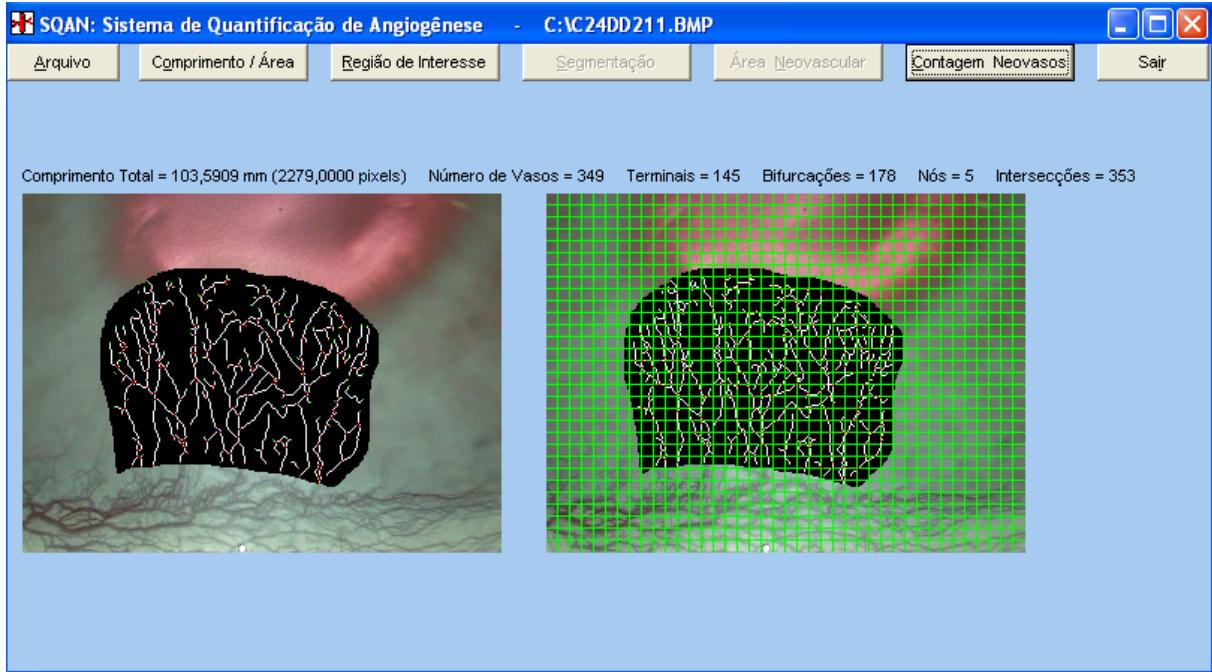
*al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b). A mensuração automática requer, porém, que a imagem seja esqueletizada, pois, com os vasos reduzidos à espessura de um *pixel*, os pontos de intersecção entre estes e as linhas da grade são facilmente identificados.

Neste sistema, o método foi implementado empregando-se um sistema-teste constituído por uma grade formada por quadrados de lado igual a 8 *pixels* (PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998) ou 0,2105 mm, cujas linhas têm a espessura de um único *pixel*. O *software*, inicialmente, reinsere a imagem esqueletizada na imagem original. Em seguida, gera automaticamente a grade, que é então superposta à imagem resultante do passo anterior (Figura 44). Na seqüência, determina o número de intersecções ( $N_i$ ) entre os vasos esqueletizados e as linhas da grade, sendo que apenas uma intersecção é computada quando *pixels* contíguos de um segmento de vaso tocam uma mesma linha. Ao final do processo, o resultado é exibido (Figura 45).



**FIGURA 44** – Sistema-teste constituído por uma grade de quadrados de lado igual a 8 *pixels* (0,2105 mm) superposta à imagem dos vasos esqueletizados, previamente reinserida na imagem original. Magnificação de 25 vezes.

Neste ponto, o *software* conclui o processamento da imagem avaliada — isto é, aquela correspondente à região de interesse inicialmente selecionada — e permite que o operador execute uma das seguintes ações: selecionar uma nova região de interesse ainda na imagem atual, iniciar a análise de uma outra imagem ou encerrar a execução do sistema.



**FIGURA 45** – Resultado do cômputo do número de intersecções entre os vasos esqueletizados e as linhas de uma grade de quadrados.

As imagens representativas da resposta neovascular, obtidas de forma padronizada, conforme anteriormente descrito, nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 após a cauterização, foram então analisadas pelo software, que quantificou a angiogênese de acordo com as seguintes variáveis: área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). De forma análoga à descrita para a variável manual comprimento vascular radial ( $C_R$ ), usando análise de regressão não linear, determinaram-se as funções de regressão  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$ , que estabeleciam o relacionamento funcional entre essas variáveis e o tempo ( $t$ ). Também de forma similar à descrita para  $C_R$ , tomou-se como base a variável automática  $A_N$  para definir a taxa de angiogênese superficial (TAS), isto é, a taxa de variação de  $A_N$  por unidade de variação de  $t$ . Dessa forma, calculou-se a taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) para um intervalo de tempo  $t_1$  a  $t_2$ , sendo dada pela equação:

$$TAS_M = \frac{A_N(t_2) - A_N(t_1)}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta A_N}{\Delta t}, \quad (3.33)$$

como também a taxa instantânea de angiogênese superficial ( $TAS_I$ ) no instante  $t_1$ , sendo definida por:

$$TAS_I(t_1) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{A_N(t_1 + \Delta t) - A_N(t_1)}{\Delta t} = \frac{dA_N}{dt}. \quad (3.34)$$

A taxa média de angiogênese superficial foi calculada para os intervalos de 3 dias entre as avaliações, para o período entre 3 e 12 dias, para o intervalo entre o 12º e o 21º dia, assim como entre o 3º e o 21º dia do período de observação. Para tanto, utilizaram-se os valores de  $A_N$  fornecidos pelo método automático, após mensurações efetuadas nas imagens relativas aos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. A taxa instantânea de angiogênese superficial para cada instante  $t_i$  pertencente ao intervalo de 3 a 21 dias foi calculada derivando-se a função de regressão  $A_N(t)$  em relação a  $t$  ( $dA_N/dt$ ).

### **3.5 Validação do método automático de quantificação de angiogênese**

A qualidade de um instrumento de medida pode ser comprovada avaliando-se duas propriedades essenciais: validade e confiabilidade (LATOUR *et al.*, 1997). O termo validade se refere à capacidade de um instrumento medir realmente o fenômeno de interesse, ou seja, ao grau de exatidão ou de acurácia do resultado de uma medição, ou ainda ao grau de concordância entre o resultado de uma medição e o seu real valor (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; LATOUR, *et al.*, 1997; BLAND; ALTMAN, 2002; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006). A avaliação da validade de um instrumento de medida é feita mediante a comparação dos seus resultados com os obtidos por uma prova de referência (padrão-ouro), sabidamente válida e confiável (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; LATOUR, *et al.*, 1997; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006). Entretanto, quando não existe uma prova de referência aceitável, utilizam-se outras formas de validação que empregam critérios subjetivos ou empíricos (LATOUR, *et al.*, 1997).

O termo confiabilidade, por outro lado, refere-se à reproduzibilidade de uma medida, ou seja, à capacidade de um instrumento fornecer os mesmos valores ao se efetuar a medição repetidas vezes em circunstâncias similares, ou ainda à estabilidade de uma medida quando esta é repetida várias vezes (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; LATOUR, *et al.*, 1997; HOPKINS, 2000; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006). A confiabilidade diz respeito à precisão de uma medida. Assim, o fato de uma medida ser precisa (valores repetidos aproximadamente iguais) não implica que ela seja necessariamente válida (os valores podem ser inexatos) (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006). A avaliação da confiabilidade de um instrumento requer que ele seja aplicado

repetidas vezes para verificar a concordância entre as distintas medições. Nesse sentido, dois aspectos podem ser considerados. O primeiro é a concordância intra-examinador, cujo objetivo é avaliar o grau de consistência entre as medições de um mesmo fenômeno efetuadas por um mesmo examinador em momentos distintos. O segundo é a concordância interexaminadores, que avalia, por sua vez, o grau de concordância entre as medições de um mesmo fenômeno efetuadas por dois ou mais examinadores (LATOUR, et al., 1997; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006).

O método automático de quantificação de angiogênese proposto constitui um instrumento de medida e como tal foi avaliado no que se refere à sua validade e confiabilidade. A avaliação da validade do método automático compreendeu três etapas. Inicialmente, determinaram-se o grau e o sinal da correlação linear entre as variáveis área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ), todas obtidas pelo método automático, e cada uma das variáveis manuais comprimento vascular radial ( $C_R$ ), ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), área do setor de coroa circular ( $A_S$ ) e índice angiogênico ( $I_A$ ). Os diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em função de  $C_R$ ,  $A_C$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$  foram construídos com os pares ordenados formados pelos valores médios de uma variável manual e outra automática, nos tempos 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias, após a cauterização.

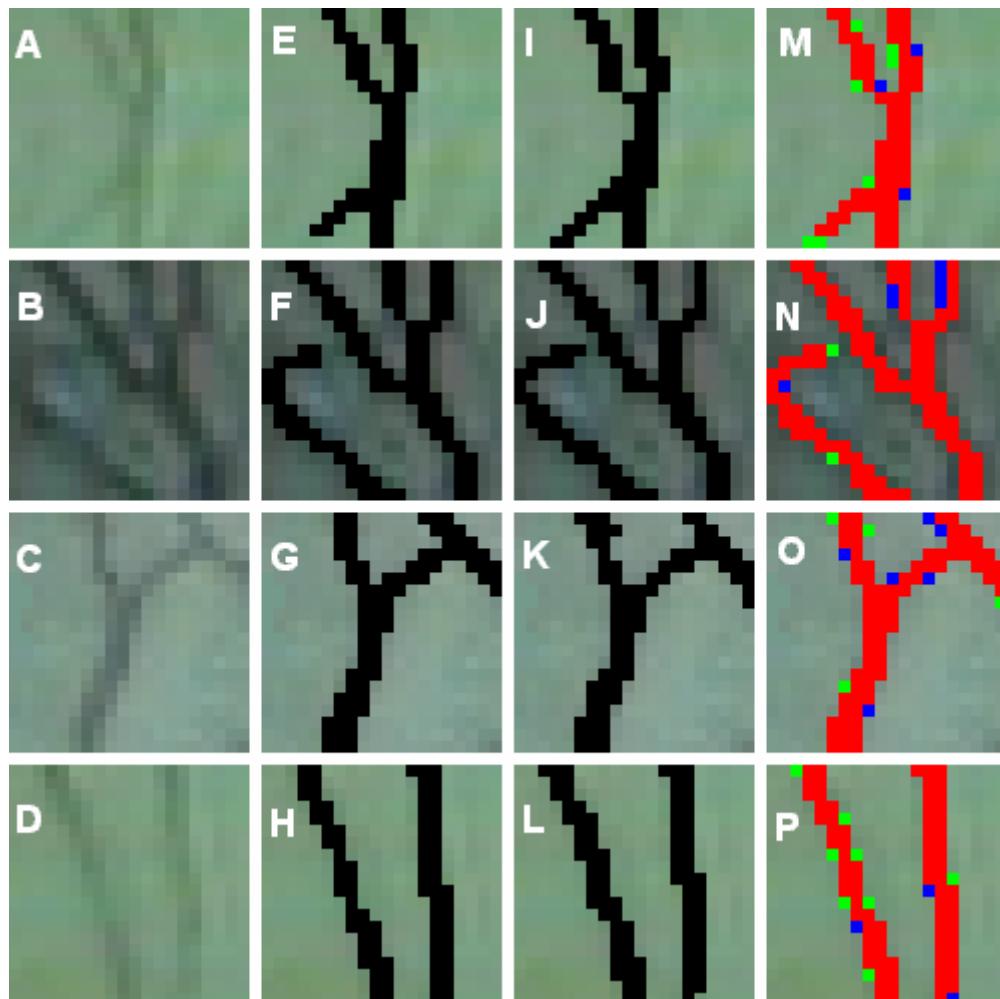
A segunda etapa da validação consistiu em comparar o desempenho do *software* com o de três examinadores independentes quanto à classificação dos *pixels* como pertencentes aos vasos sanguíneos ou ao fundo, assim como quanto à determinação das variáveis de quantificação de angiogênese  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ . Para tanto, selecionaram-se aleatoriamente 50 subimagens, de tamanho 20 x 20 *pixels*, nas áreas de angiogênese das imagens originais, as quais representavam as diversas fases da resposta angiogênica. As subimagens de 20 x 20 *pixels* constituíam, pois, subconjuntos das imagens originais. Em seguida, solicitou-se aos três examinadores que analisassem as 50 subimagens e, após chegarem a um consenso, demarcassem manualmente os vasos sanguíneos. Isto foi conseguido mediante a ampliação das subimagens em 4 vezes, de modo que os examinadores puderam analisar cada *pixel* e rotular de preto ( $R=0$ ,  $G=0$ ,  $B=0$ , no modelo RGB) apenas aqueles que julgassem, de forma consensual, como pertencentes aos vasos sanguíneos (classificação manual). Os examinadores realizaram ainda a contagem manual, também de forma consensual, dos vasos sanguíneos nas 50 subimagens,

conforme os critérios adotados neste estudo, descritos anteriormente. As operações realizadas conjuntamente pelos três examinadores serão tratadas a partir de agora como método manual, considerado então a prova de referência ou padrão-ouro.

Outras 50 subimagens, idênticas às analisadas pelo método manual, foram processadas pelo *software* (método automático), que gerou mais 5 séries de 50 subimagens rotuladas. Na série 1, o sistema rotulou de preto os *pixels* classificados como pertencentes aos vasos sanguíneos (classificação automática), de acordo com o limiar de segmentação ( $L$ ) calculado automaticamente pelo *software*. Nas outras 4 séries de 50 subimagens, o limiar de segmentação foi modificado. Assim, para a série 2, o novo limiar correspondeu ao limiar sugerido pelo *software* ( $L$ ) menos 1, ou seja,  $L - 1$ ;  $L - 2$  para a série 3;  $L + 1$  para a série 4; e  $L + 2$  para a série 5. O objetivo foi verificar se o limiar calculado automaticamente pelo *software* corresponde realmente ao ideal, ou seja, o que mais corretamente classifica os *pixels* como pertencentes aos vasos, quando comparado com o padrão-ouro. Além disso, o sistema também calculou  $A_N$ ,  $C_7$  e  $N_V$  para cada uma das 50 subimagens da série 1, cujos vasos foram rotulados de acordo com o limiar sugerido automaticamente.

Para comparar a classificação manual com a automática, elaborou-se um novo *software* que analisou as 50 subimagens cujos vasos foram classificados pelo método manual, bem como as 5 séries de 50 subimagens cujos vasos foram classificados pelo método automático. O *software* comparou cada *pixel* de uma dada subimagem classificada pelo método manual com o *pixel* correspondente da subimagem análoga, classificada pelo método automático, pertencente a cada uma das 5 séries anteriormente descritas. A operação foi realizada, portanto, em 5 conjuntos de 50 pares de subimagens: classificação manual *versus* cada uma das 5 séries da classificação automática. Dessa forma, determinaram-se, para os 5 conjuntos de 50 pares de subimagens, o número de *pixels* classificados como vaso por ambos os métodos (verdadeiro-positivos), o número de *pixels* classificados como fundo pelo método manual e como vaso pelo método automático (falso-positivos), o número de *pixels* classificados como vaso pelo método manual e como fundo pelo método automático (falso-negativos) e o número de *pixels* classificados como fundo por ambos os métodos (verdadeiro-negativos) (Figura 46). No cálculo dessas variáveis, o método manual foi considerado o padrão-ouro, enquanto o método automático, aquele a ser validado. A partir desses dados, foram determinados os

seguintes parâmetros de avaliação da validade do método automático: sensibilidade, especificidade e coeficiente de concordância.



**FIGURA 46** – Exemplos de subimagens de  $20 \times 20$  pixels analisadas pelos métodos manual (padrão-ouro) e automático; A, B, C e D: imagens originais; E, F, G e H: vasos rotulados de preto pelo método manual; I, J, K e L: vasos rotulados de preto pelo método automático; M, N, O e P: vermelho representa os verdadeiro-positivos, verde os falso-positivos, azul os falso-negativos e o fundo os verdadeiro-negativos.

Esse novo software também calculou a área de neovascularização ( $A_N$ ) em cada uma das 50 subimagens classificadas pelo método manual, mediante a contagem dos pixels rotulados como vasos por esse método, bem como o comprimento vascular total ( $C_T$ ) nas suas correspondentes esqueletizadas, contando-se os pixels pertencentes ao esqueleto.

Assim, os valores das variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , referentes à análise das 50 subimagens pelos métodos manual e automático, foram então comparados e o grau de concordância entre eles determinado. Como relatado anteriormente, as 50

subimagens da série 1 foram as utilizadas para a determinação de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  pelo método automático.

Considerando que, neste estudo, propõe-se uma equação para o cálculo do número de vasos sanguíneos pelo método automático (Equação (3.32)) conforme critérios próprios, então era imprescindível comparar o procedimento para o cômputo de  $N_V$  com uma prova de referência, que, como anteriormente descrito, envolveu o uso de um sistema-teste comumente empregado em estereologia para estimar a densidade vascular. Para tanto, selecionaram-se 60 imagens representativas da progressão temporal da resposta angiogênica. Para cada uma dessas 60 imagens, o sistema calculou  $N_V$  e o número de intersecções ( $N_I$ ) entre os vasos esqueletizados e as linhas de uma grade de quadrados superposta à imagem (sistema-teste). A última etapa da avaliação da validade do método automático consistiu, portanto, em determinar a intensidade e o sinal da correlação linear entre  $N_V$  e  $N_I$ .

A avaliação da confiabilidade do método automático compreendeu a determinação da concordância intra-examinador e da concordância interexaminadores, considerando-se que existe uma etapa da operação do software que é dependente do operador, qual seja, a seleção da região de interesse. Assim, selecionaram-se 50 imagens que representavam as diversas fases da resposta angiogênica. Três examinadores utilizaram o método automático para calcular  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  nas 50 imagens, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. Avaliou-se então o grau de concordância entre os valores obtidos por um mesmo examinador nos momentos 1 e 2, para cada uma das 3 variáveis (concordância intra-examinador). Determinou-se ainda o grau de concordância entre os valores obtidos pelos 3 examinadores num mesmo momento, para cada uma das 3 variáveis (concordância interexaminadores).

### **3.6 Avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático**

Avaliou-se o efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho, utilizando-se o método automático para quantificar a resposta neovascular. Foram selecionadas drogas com atividade antiangiogênica demonstrada em estudos prévios: talidomida (D'AMATO *et al.*, 1994; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999), ácido acetilsalicílico (YOSHIDA *et al.*,

2003a) e celecoxib (MARFERRER *et al.*, 2000; LEAHY *et al.*, 2002); ou pertencentes a classes de fármacos com ação antiangiogênica já estabelecida por estudos envolvendo outros membros: prednisona (CONRAD *et al.*, 1994; BENEZRA *et al.*, 1997; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999) e etoricoxib (RIENDEAU *et al.*, 2001).

Assim sendo, delineou-se um ensaio que utilizou 32 coelhos distribuídos aleatoriamente em seis grupos de tratamento:

- Grupo controle: constituído por 6 coelhos que receberam amido de milho;
- Grupo prednisona: composto por 5 coelhos, tratados com prednisona (Meticorten®, Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro – RJ), 2 mg/kg de peso corporal por dia;
- Grupo talidomida: formado por 5 coelhos, tratados com talidomida (FUNED – Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte – MG), 200 mg/kg de peso por dia;
- Grupo AAS: constituído por 6 coelhos, tratados com ácido acetilsalicílico (AAS) (Aspirina®, Bayer S.A., São Paulo – SP), 100 mg/kg de peso por dia;
- Grupo etoricoxib: composto por 5 coelhos, tratados com etoricoxib (Arcoxia™, Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda., Campinas – SP), 20 mg/kg de peso por dia;
- Grupo celecoxib: constituído por 5 coelhos, tratados com celecoxib (Celebra®, Pharmacia Brasil Ltda., Jandira – SP), 70 mg/kg de peso por dia.

Todos os coelhos foram submetidos a uma cauterização pontual com NaOH 1M na periferia superior da córnea direita, de acordo com o procedimento descrito no Item 3.1. O dia da cauterização foi considerado o dia zero do experimento, que se estendeu até o 21º dia.

Os fármacos foram administrados por via oral, acondicionados em cápsulas gelatinosas Nº 2, opacas (Figura 47). Assim, aqueles que não estavam na forma de pó, foram triturados até adquirirem essa consistência. A quantidade colocada em cada cápsula foi pesada numa balança analítica de alta precisão e calculada de acordo com o peso do animal e a dose fixada para cada fármaco. Os animais do grupo controle receberam cápsulas contendo amido de milho. Os coelhos foram pesados no dia que antecedeu o procedimento cirúrgico e no 7º, 14º e 21º dia do experimento. Dessa forma, as doses administradas puderam ser ajustadas nos dias 7 e 14, de acordo com os pesos verificados nesses dias.

A administração das cápsulas por via oral envolveu o uso de uma cânula construída especificamente para esse fim. Trata-se de uma cânula metálica,

atraumática, curva em sua extremidade distal, com 9 mm de diâmetro e 9,5 cm de comprimento, dotada de um êmbolo que, ao ser acionado, expulsa a cápsula colocada na sua extremidade curva (Figura 47). Assim, após a imobilização do coelho, a cânula contendo a cápsula na sua extremidade curva era introduzida na cavidade oral até alcançar a base da língua. Nesse instante, o êmbolo era acionado, expulsando a cápsula na faringe, que era imediatamente deglutida pelo animal (Figura 48).

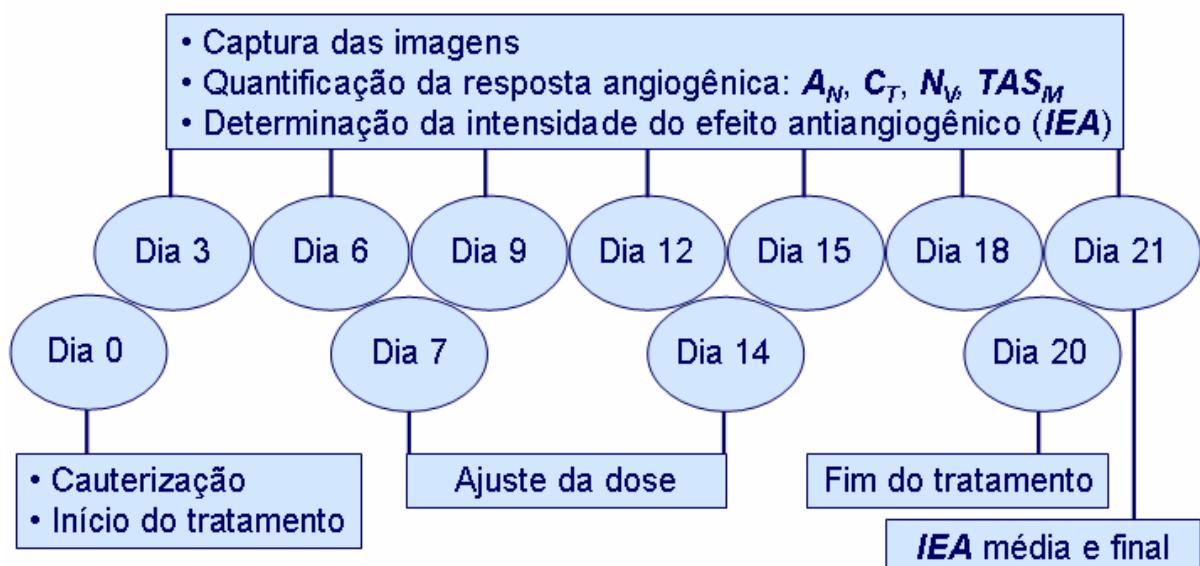


**FIGURA 47** – Cânula metálica, própria para a administração de cápsulas a coelhos, dotada de um dispositivo para expulsar a cápsula na faringe.



**FIGURA 48** – Administração das cápsulas aos coelhos. Após a imobilização do animal, a cânula contendo a cápsula é introduzida na cavidade oral até alcançar a base da língua, momento em que o êmbolo é acionado, expulsando a cápsula na faringe, que é então imediatamente deglutida.

O tratamento teve início no dia 0, antes da realização do procedimento cirúrgico, estendendo-se até o 20º dia do experimento. As drogas foram administradas diariamente, em dose única, às 8 horas da manhã. Realizaram-se avaliações nos dia 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização, ocasiões em que foram obtidas, de forma padronizada, as imagens da córnea contendo a região de angiogênese, conforme o procedimento descrito no Item 3.3, nas quais a resposta neovascular foi quantificada (Figura 49).



**FIGURA 49** – Delineamento do ensaio que avaliou o efeito de fármacos antiangiogênicos (prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib) no modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho.  $A_N$ : área de neovascularização;  $C_T$ : comprimento vascular total;  $N_V$ : número de vasos sanguíneos;  $TAS_M$ : taxa média de angiogênese superficial.

As imagens foram analisadas pelo método automático que quantificou a resposta angiogênica de acordo com as seguintes variáveis: área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). Os valores de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , referentes aos grupos experimentais prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib, foram então comparados com os correspondentes do grupo controle.

Deve ser salientado que houve o mascaramento do pesquisador que realizou o procedimento de cauterização, a aquisição e o processamento das imagens em relação à distribuição dos coelhos nos diversos grupos.

Tomando-se como base a variável  $A_N$  e conforme a Equação (3.33), calculou-se, para todos os grupos, a taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ )

para o período entre 3 e 12 dias, para o intervalo entre o 12º e o 21º dia, assim como para o período compreendido entre o 3º e o 21º dia. Assim, a  $TAS_M$  referente a cada um dos grupos experimentais foi comparada com a análoga do grupo controle. Além disso, num mesmo grupo, a  $TAS_M$  relativa ao intervalo de 3 a 12 dias foi comparada com a do período de 12 a 21 dias.

A variável  $A_N$  relativa aos grupos experimentais foi expressa em função de  $A_N$  do grupo controle, definindo assim a intensidade do efeito antiangiogênico referente a um dado fármaco  $F$  no dia  $d$ ,  $IEA(F_d)$ , que é dada, em termos percentuais, pela equação:

$$IEA(F_d) = \frac{A_N(C_d) - A_N(F_d)}{A_N(C_d)} \cdot 100, \quad (3.35)$$

onde  $A_N(C_d)$  e  $A_N(F_d)$  são as médias de  $A_N$  no dia  $d$  no grupo controle e no grupo relativo ao fármaco  $F$ , respectivamente. Definiu-se como intensidade média do efeito antiangiogênico ( $IEA$  média) a média aritmética dos valores da  $IEA$  referentes aos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, e como intensidade final do efeito antiangiogênico ( $IEA$  final) a  $IEA$  verificada no 21º dia,  $IEA(F_{21})$ . Os valores da  $IEA(F_d)$  referentes aos 5 fármacos estudados foram então comparados entre si.

Por fim, investigou-se a influência das drogas avaliadas, nas doses testadas, em relação ao peso corporal, mediante o cálculo da variação de peso. Assim, se  $P_{Ini}$  é o peso verificado no dia que antecedeu a cauterização e  $P_{Fim}$  o peso medido no 21º dia do experimento, então a variação de peso ( $VP$ ), em termos percentuais, é dada pelo quociente:

$$VP = \frac{P_{Fim} - P_{Ini}}{P_{Fim}} \cdot 100. \quad (3.36)$$

Os valores de  $VP$  referentes aos seis grupos foram então comparados entre si.

### 3.7 Análise estatística

Inicialmente, utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a aderência das variáveis quantitativas contínuas e discretas a uma distribuição normal (COSTA NETO, 1977; KIRKWOOD, 1988; MOTULSKY, 2003). Como a normalidade da distribuição foi observada para todas as variáveis, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão. Pelo mesmo motivo, aplicaram-se testes paramétricos para a análise dos dados. A homogeneidade das

variâncias ou homocedasticia, por sua vez, foi verificada pelo teste de Bartlett (ARMITAGE; BERRY, 1994; VIEIRA, 1999; MOTULSKY, 2003).

Assim, o teste *t* para variáveis independentes foi utilizado para comparar duas variáveis não emparelhadas. A comparação de duas variáveis emparelhadas, por sua vez, foi feita pelo teste *t* para dados emparelhados.

As associações entre os quantificadores manuais ( $C_R$ ,  $A_C$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$ ) entre si, bem como entre estes e as variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , obtidas pelo método automático, foram verificadas pela determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson (*r*) (COSTA NETO, 1977; KIRKWOOD, 1988; MOTULSKY, 2003). Os diagramas de dispersão foram construídos com os valores médios de cada variável nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21.

Para comparar os seis grupos de tratamento — controle, prednisona, talidomida, ácido acetilsalicílico (AAS), etoricoxib e celecoxib —, utilizou-se a análise de variância (ANOVA — *analysis of variance*), baseada em um fator (*one-way analysis of variance*), associada a um teste de comparações múltiplas: teste de Dunnett ou teste de Tukey-Kramer. O teste de Dunnett foi usado para comparar os grupos experimentais com o grupo controle (VIEIRA, 1999; MOTULSKY, 2003), enquanto o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer foi usado para verificar diferenças entre os vários grupos dois a dois (COSTA NETO, 1977; VIEIRA, 1999; MOTULSKY, 2003).

A avaliação da acurácia do método automático em classificar os *pixels* como pertencentes aos vasos ou ao fundo envolveu o cotejamento das 50 subimagens classificadas pelo método manual (padrão-ouro) com as correspondentes nas 5 séries de 50 subimagens classificadas pelo método automático. A operação propiciou a determinação do número de *pixels* verdadeiro-positivos (*VP*), falso-positivos (*FP*), falso-negativos (*FN*) e verdadeiro-negativos (*VN*), para os 5 conjuntos de 50 pares de subimagens. Esses dados foram dispostos numa tabela de contingência 2 x 2 e possibilitaram o cálculo da sensibilidade (*S*) e da especificidade (*E*) (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; LÓPEZ; RODRÍGUEZ, 1997; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2003; MOTULSKY, 2003), que são definidas, respectivamente, por:

$$S = \frac{VP}{VP + FN}, \quad (3.37)$$

$$E = \frac{VN}{FP + VN}. \quad (3.38)$$

Além disso, calculou-se o coeficiente de concordância *kappa* para mensurar o grau de concordância entre os métodos manual e automático. A estatística *kappa* mede o grau de concordância entre duas medições ou classificações de uma variável categórica (LANDIS; KOCH, 1977; ARMITAGE; BERRY, 1994; LÓPEZ; RODRÍGUEZ, 1997; GALPARSORO; FERNÁNDEZ, 1999) e pode ser interpretado conforme os critérios enumerados no Quadro 2.

Estatística <i>kappa</i>	Grau de concordância
< 0,00	Pobre
0,00 – 0,20	Fraco
0,21 – 0,40	Regular
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeito

**QUADRO 2** – Critérios para a interpretação do coeficiente de concordância *kappa* (LANDIS; KOCH, 1977).

As variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  foram mensuradas nas 50 subimagens pelos métodos manual e automático. Assim, o grau de concordância entre os valores de uma mesma variável, obtidos pelos métodos manual e automático, foi avaliado mediante o cálculo do coeficiente de correlação intraclasse e a análise do gráfico de Bland-Altman. O coeficiente de correlação intraclasse (CCI) mede o grau de concordância entre duas ou mais medições de uma variável numérica. É comumente empregado para quantificar a concordância intra e interexaminadores ou entre métodos e pode ser interpretado de acordo com os critérios listados no Quadro 3. Descrevem-se várias formas para o cálculo do CCI, dependendo do desenho do estudo, todas baseadas no modelo de análise de variância com medidas repetidas. Neste tipo de análise, devem ser consideradas duas fontes de variabilidade: uma devido a diferenças entre os objetos ou sujeitos examinados (fator dos objetos ou sujeitos) e outra devido a diferenças entre os examinadores ou métodos avaliados (fator dos examinadores ou métodos). Em todas as situações, os objetos ou sujeitos devem constituir uma amostra aleatória de uma população maior, de modo que são

sempre tratados como fator aleatório. Assim, quando diferentes objetos ou sujeitos são avaliados por diferentes examinadores ou métodos — de modo a não haver correspondência entre um dado conjunto de medições e um determinado examinador ou método —, então não se pode dissociar a variabilidade relativa aos objetos ou sujeitos daquela referente aos examinadores ou métodos, as quais são combinadas numa única fonte de variância (*one-way random effects model*). Por outro lado, quando todos os objetos ou sujeitos são avaliados por um número fixo de examinadores ou métodos, a variabilidade associada aos últimos também deve ser considerada. Nesse caso, o modelo de análise de variância deve ser baseado em dois fatores: um relativo aos objetos ou sujeitos (aleatório) e outro referente aos examinadores ou métodos. Este último pode ser tratado como fator aleatório, quando os examinadores ou métodos constituem uma amostra aleatória de uma população maior (*two-way random effects model*); ou como fator fixo, quando constituem a própria população (*two-way mixed effects model*) (ARMITAGE; BERRY, 1994; BLAND; ALTMAN, 1996; MCGRAW; WONG, 1996; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006).

Coeficiente de correlação intraclass	Grau de concordância
< 0,30	Mau ou nulo
0,31 – 0,50	Medíocre
0,51 – 0,70	Moderado
0,71 – 0,90	Bom
> 0,90	Excelente

**QUADRO 3** – Critérios para a interpretação do coeficiente de correlação intraclass (FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006).

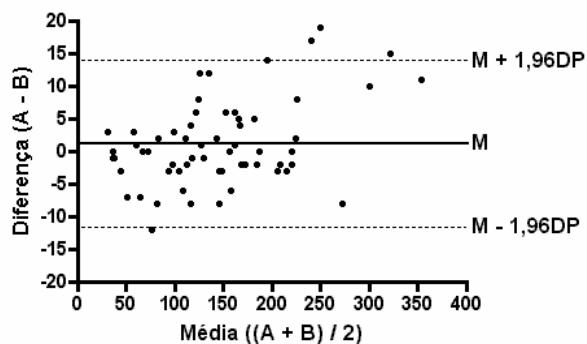
Neste estudo, o cálculo do CCI foi baseado num modelo com dois fatores: um aleatório, as 50 subimagens; e um fixo, os métodos manual e automático (*two-way mixed effects model*). Considerou-se ainda que a variabilidade entre os métodos era relevante, devendo, portanto, ser incluída no cálculo do CCI (*absolute agreement*), e que cada valor correspondia a uma única medida do fenômeno avaliado (*single measurement*).

Bland e Altman (1986) propuseram um simples e informativo procedimento gráfico para avaliar a concordância entre dois métodos, baseado na

análise das diferenças individuais. Consiste em representar graficamente a diferença entre duas medições em função de sua média, identificando, por linhas horizontais, a média das diferenças e os limites de concordância de 95% (Figura 50), que correspondem ao intervalo de confiança de 95% das diferenças entre as duas medições. Assim, os limites de concordância de 95% ( $LC$ ) podem ser calculados a partir da média ( $M_{Dif}$ ) e do desvio padrão ( $DP_{Dif}$ ) das diferenças conforme a seguinte expressão:

$$LC = M_{Dif} \pm 1,96DP_{Dif}. \quad (3.39)$$

Incluem, portanto, 95% das diferenças observadas, caso estas sejam normalmente distribuídas. O método permite examinar rapidamente a magnitude das diferenças e sua relação com a magnitude das medições e assim avaliar o grau de concordância entre os dois sistemas de medida. Além disso, quanto mais estreito for o intervalo definido pelos limites de concordância, mais preciso é o método, ao passo que quanto mais próximas de zero estiverem as diferenças, mais acurado é o método (BLAND; ALTMAN, 1986, 1995; LATOUR *et al.*, 1997; BREY *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006).



**FIGURA 50** – Método gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre dois métodos A e B.  $M$ : média das diferenças;  $DP$ : desvio padrão das diferenças. Os limites de concordância correspondem a  $M \pm 1,96DP$ .

A associação entre os valores de  $N_V$  e de  $N_I$  (número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema-teste), referentes à análise de 60 imagens, foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear de Pearson ( $r$ ), enquanto a equação da reta que denotava o relacionamento funcional entre essas variáveis foi determinada por regressão linear simples. Avaliou-se ainda o grau de concordância entre  $N_V$  e  $N_I$  pela determinação do coeficiente de correlação intraclass (two-way mixed effects

*model, absolute agreement, single measurement)*, bem como pela análise do gráfico de Bland-Altman.

O coeficiente de correlação intraclass também foi utilizado para quantificar o grau de concordância intra-examinador e interexaminadores, após a análise de 50 imagens por 3 examinadores em 2 momentos distintos, utilizando o método automático. Considerou-se, para o seu cálculo, um modelo com dois fatores: um aleatório, as 50 imagens; e um fixo, os 3 examinadores num mesmo momento ou um mesmo examinador nos momentos 1 e 2 (*two-way mixed effects model, absolute agreement, single measurement*). Foram analisadas as variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ .

Por fim, procurou-se estabelecer um modelo matemático para denotar o relacionamento funcional entre a resposta angiogênica e o tempo. Assim, para a variável manual  $C_R$  e para as variáveis automáticas  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , determinaram-se, por regressão não linear, as funções de regressão  $C_R(t)$ ,  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$ , que expressam essas variáveis em função do tempo ( $t$ ) (MOTULSKY, 2003; MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003). Após a análise de inúmeras equações, optou-se por combinar uma função linear com uma exponencial, gerando uma equação da forma:  $y = a + bx + c \cdot \exp(dx)$ . Tal equação não existia nas bibliotecas dos softwares estatísticos utilizados, sendo, portanto, uma equação definida pelo usuário. Esse tipo de equação foi o que melhor se ajustou aos dados, representados pelos valores médios dessas variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. Sendo assim, por regressão não linear, calcularam-se os coeficientes  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  para cada uma das variáveis, definindo, portanto, as funções horárias  $C_R(t)$ ,  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$ . Calculou-se também o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), que mede o quanto a curva de regressão se ajustou aos pontos e assume valores entre 0,0 e 1,0. Em seguida, obtiveram-se as derivadas de  $C_R$  e  $A_N$  em relação a  $t$ ,  $dC_R/dt$  e  $dA_N/dt$ , que representam, por sua vez, a taxa instantânea de angiogênese conforme uma variável manual ( $C_R$ ) — a taxa instantânea de angiogênese radial ( $TAR_I$ ); e uma variável automática ( $A_N$ ) — a taxa instantânea de angiogênese superficial ( $TAS_I$ ).

Em todas as análises, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade  $\alpha$  do erro tipo I (nível de significância do teste), considerando, pois, como estatisticamente significante um valor  $P$  bicaudal menor que 0,05.

O software de análise estatística GraphPad Prism® versão 4.03 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2005, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) foi utilizado para a realização de todos os procedimentos

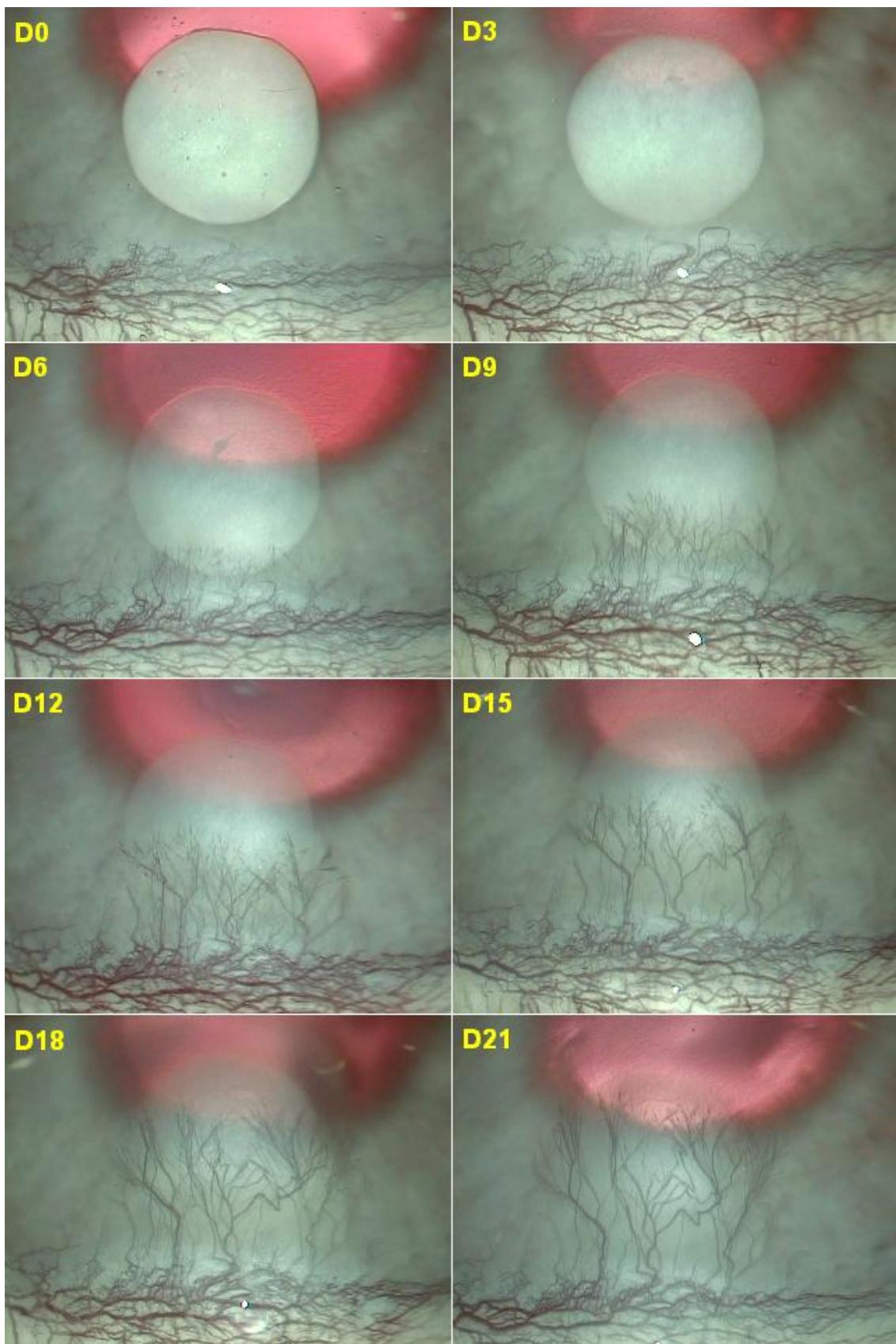
estatísticos, exceto para o cálculo do coeficiente de concordância *kappa* e do coeficiente de correlação intraclass. Para a determinação de tais coeficientes, usou-se o software SPSS® versão 13.0 para Windows® (*Statistical Package for the Social Sciences*, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA, 2004, [www.spss.com](http://www.spss.com)). Os gráficos foram construídos utilizando-se também o software GraphPad Prism®.

## 4 RESULTADOS

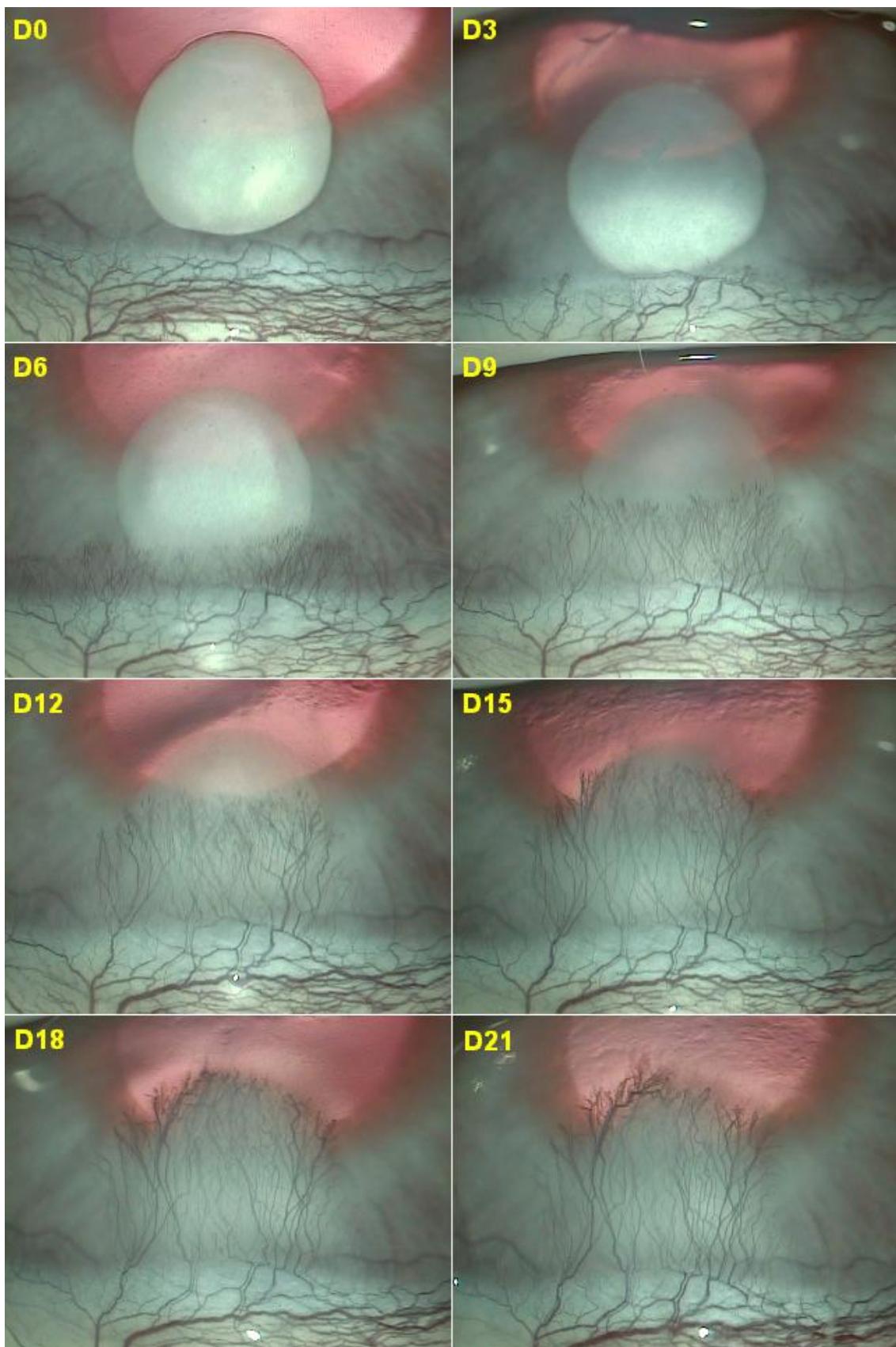
### 4.1 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho

Nos doze coelhos submetidos ao procedimento de cauterização com NaOH 1M, observou-se, já no 3º dia, o crescimento de brotos vasculares em direção ao sítio de cauterização, quase alcançando a sua borda límbica, associado a dilatação dos vasos perilímbicos. Observou-se ainda edema de córnea localizado, caracterizado pela diminuição da transparência corneana nas vizinhanças da lesão. Nos dias subseqüentes, os vasos proliferaram e avançaram em direção ao estímulo, à medida que a intensidade da reação inflamatória diminuía, evidenciada pela recuperação da transparência corneana nas proximidades da lesão. Na primeira metade do experimento, ou seja, durante os 12 primeiros dias, verificou-se intensa proliferação vascular, marcada pelo surgimento de inúmeros neovasos, de aspecto tortuoso, muitos aparentemente imaturos, às vezes formando tufo ou agregados com a aparência de chama de vela. Nessa fase, a zona de angiogênese se caracterizou pela tortuosidade vascular e pelo grande número de ramificações. Durante a segunda metade, entretanto, os neovasos amadureceram, perderam a tortuosidade e se alongaram. A árvore vascular se tornou menos tortuosa e menos ramificada, com a permanência daqueles neovasos realmente viáveis e a regressão daqueles imaturos. O envolvimento do limbo córneo-escleral pela neovascularização atingiu a máxima extensão já nos primeiros 9 dias, diminuiu nos dias subseqüentes em virtude da regressão dos neovasos localizados nas extremidades, possivelmente por insuficiência pontual de estímulo, e se estabilizou no terço final do período de observação. As Figuras 51 e 52 ilustram a progressão da resposta angiogênica desde o dia zero até o dia 21.

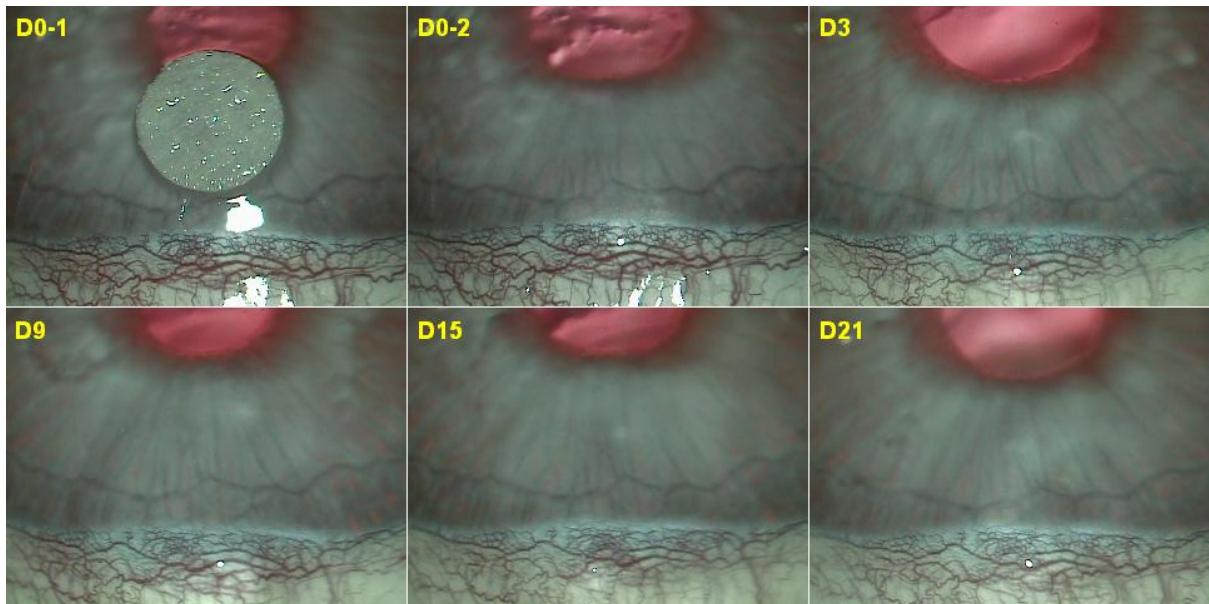
Por outro lado, nos seis coelhos em que a peça de papel filtro foi colocada na superfície da córnea periférica sem o agente alcalino, não se verificou lesão do epitélio, nem alteração no padrão da vasculatura perilímbica, nem tampouco indução de angiogênese corneana (Figura 53). Sendo assim, a resposta angiogênica não foi quantificada nesses animais, visto que, de fato, ela não existiu. Portanto, todos os dados a seguir apresentados são referentes à resposta angiogênica verificada nos doze coelhos que foram submetidos à cauterização com NaOH 1M.



**FIGURA 51** – Progressão da resposta angiogênica nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização (D0). Magnificação de 25 vezes.



**FIGURA 52** – Outro exemplo representativo da evolução temporal da resposta angiogênica. Magnificação de 25 vezes.



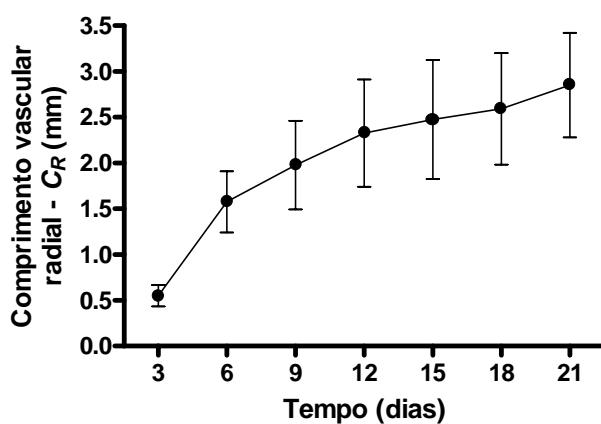
**FIGURA 53** – A peça de papel filtro sem o agente alcalino não causou lesão epitelial, não alterou o padrão da vasculatura perilímbica, nem induziu angiogênese corneana. Fotografias obtidas enquanto a peça de papel filtro estava na periferia superior da córnea (D0-1), logo após a sua retirada (D0-2) e, subsequentemente, nos dias 3, 9, 15 e 21. Magnificação de 25 vezes.

A resposta angiogênica foi quantificada pelo método convencional (manual) de acordo com 5 parâmetros: comprimento vascular radial ( $C_R$ ), ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), área do setor de coroa circular ( $A_S$ ) e índice angiogênico ( $I_A$ ), cujos valores foram expressos em função do tempo ( $t$ ). Analisando os gráficos de  $C_R$ ,  $A_T$  e  $A_S$  em função de  $t$  (Figuras 54, 55 e 56, respectivamente), observou-se que as curvas dessas variáveis assumiram um comportamento temporal semelhante: um crescimento exponencial até por volta do 12º dia, seguido de um padrão linear, quase constante, até o 21º dia. Os valores máximos de  $C_R$ ,  $A_T$  e  $A_S$  foram verificados no 21º dia, sendo iguais a  $2,8500 \pm 0,5713$  mm,  $8,8833 \pm 2,7482$  mm<sup>2</sup> e  $14,1760 \pm 4,1041$  mm<sup>2</sup>, respectivamente.

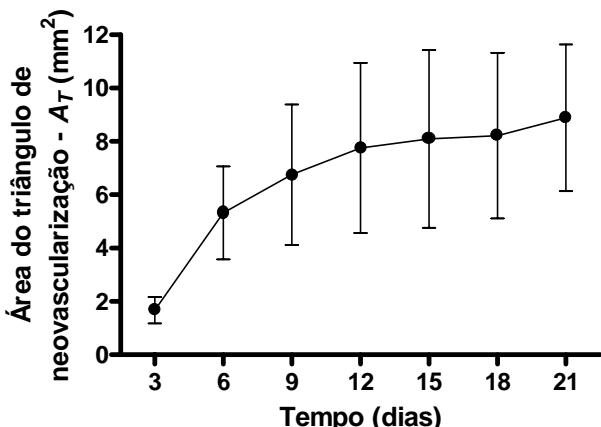
A curva da variável  $I_A$ , por sua vez, cresceu exponencialmente até o 15º dia, quando atingiu o seu valor máximo ( $13,7500 \pm 3,5461$ ), diminuiu ligeiramente no 18º dia e voltou a ascender no 21º dia, assumindo um padrão aproximadamente constante a partir do 12º dia (Figura 57). Os valores de  $I_A$  referem-se a medições efetuadas nas córneas de 6 coelhos, visto que a contagem dos vasos distais foi realizada apenas nesses 6 animais.

A variável  $A_C$ , entretanto, assumiu um comportamento temporal que divergiu sobremaneira daquele dos demais quantificadores. Sua curva ascendeu

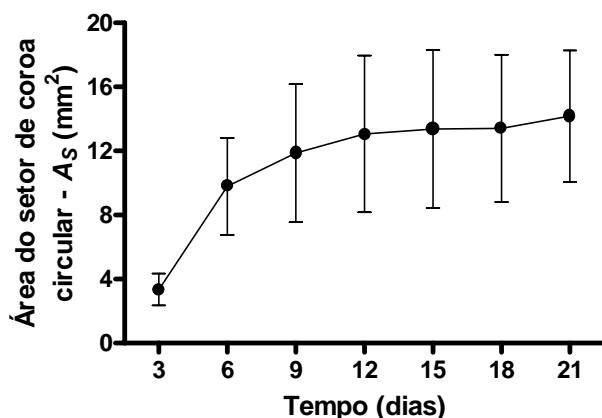
abruptamente do 3º para o 6º dia, quando alcançou o valor máximo ( $67,8708 \pm 11,7250$  graus), conservando praticamente este mesmo valor no 9º dia; a partir de então, diminuiu ligeiramente, de forma linear, até o 18º dia, mantendo-se constante até o dia 21 (Figura 58). Assim, o parâmetro  $A_C$  atingiu o seu valor máximo ainda na fase inicial do período de observação, evoluiu com uma pequena contração durante a fase intermediária e se estabilizou na fase final. Este fato pode ser observado nas Figuras 51 e 52, acompanhando-se, ao longo dos dias, a extensão do arco da circunferência corneana delimitado pela zona de neovascularização.



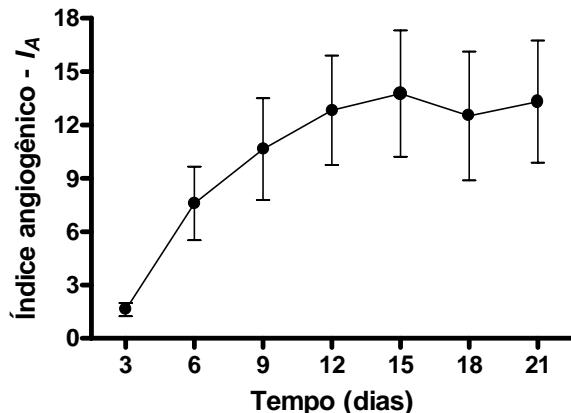
**FIGURA 54** – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o quantificador comprimento vascular radial ( $C_R$ ). Os dados, expressos em mm, correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.



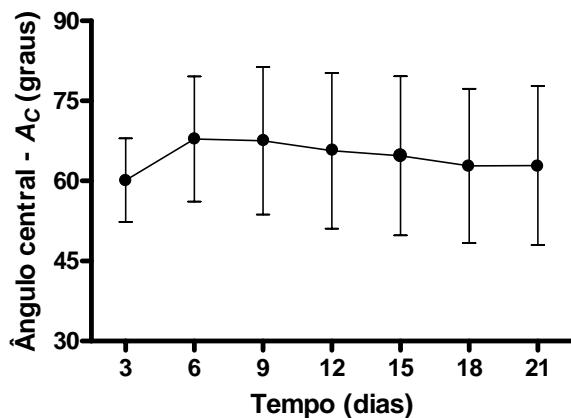
**FIGURA 55** – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o parâmetro área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ). Os dados, expressos em mm<sup>2</sup>, correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.



**FIGURA 56** – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo a variável área do setor de coroa circular ( $A_S$ ). Os dados, expressos em  $\text{mm}^2$ , correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.



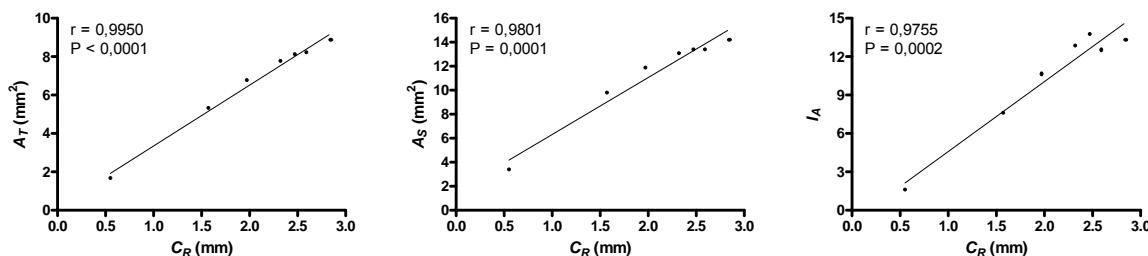
**FIGURA 57** – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o parâmetro índice angiogênico ( $I_A$ ). Os dados correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 6 córneas pelo método manual nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.



**FIGURA 58** – Progressão temporal da resposta angiogênica segundo o quantificador ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ). Os dados, expressos em graus, correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Em valores individuais, o máximo de  $C_R$  foi 3,9 mm, mensurado no 21º dia, correspondendo a uma distância que ultrapassou ligeiramente a área de cauterização. O valor individual máximo de  $A_C$  foi 83,62°, medido já no 6º dia, a partir do valor máximo da corda de neovascularização ( $C_N$ ), que foi 8 mm. Assim, o arco máximo da circunferência corneana envolvido pela neovascularização correspondeu ao valor máximo de  $A_C$ , ou seja, a um ângulo de 83,62°. Os valores máximos de  $C_R$  e  $A_C$  demonstram que o modelo induziu angiogênese localizada, restrita às vizinhanças da área de cauterização.

Para avaliar o comportamento de um dado quantificador em função do desempenho de outro, ao longo do experimento, ou seja, para verificar o grau e o sinal da dependência linear entre os parâmetros de quantificação de angiogênese, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Constatou-se uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante, entre  $C_R$  e  $A_T$  ( $r = 0,9950$ ;  $P < 0,0001$ ),  $C_R$  e  $A_S$  ( $r = 0,9801$ ;  $P = 0,0001$ ),  $C_R$  e  $I_A$  ( $r = 0,9755$ ;  $P = 0,0002$ ),  $A_T$  e  $A_S$  ( $r = 0,9946$ ;  $P < 0,0001$ ),  $A_T$  e  $I_A$  ( $r = 0,9891$ ;  $P < 0,0001$ ) e entre  $A_S$  e  $I_A$  ( $r = 0,9878$ ;  $P < 0,0001$ ), denotando que essas variáveis tendem a aumentar conjuntamente de forma linear (Figuras 59, 60, 61 e 62). Entretanto, não se constatou correlação linear significante entre  $A_C$  e os quantificadores  $C_R$  ( $r = 0,2226$ ;  $P = 0,6315$ ),  $A_T$  ( $r = 0,3087$ ;  $P = 0,5005$ ),  $A_S$  ( $r = 0,4049$ ;  $P = 0,3675$ ) e  $I_A$  ( $r = 0,3396$ ;  $P = 0,4561$ ), o que pode ser explicado pela peculiar evolução temporal de  $A_C$ , que destoou daquela dos demais parâmetros. Na realidade, entre  $A_C$  e as variáveis  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$  existiu uma correlação, mas do tipo não linear, como demonstram as curvas obtidas por regressão polinomial e mostradas na Figura 63. Fato esperado, tendo em vista que, até 6º dia,  $A_C$  e as demais variáveis aumentaram conjuntamente, porém, a partir daí,  $A_C$  diminuiu, ao passo que as outras variáveis aumentaram.



**FIGURA 59** – Diagramas de dispersão de  $C_R$  em função de  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $C_R$  e as demais variáveis.

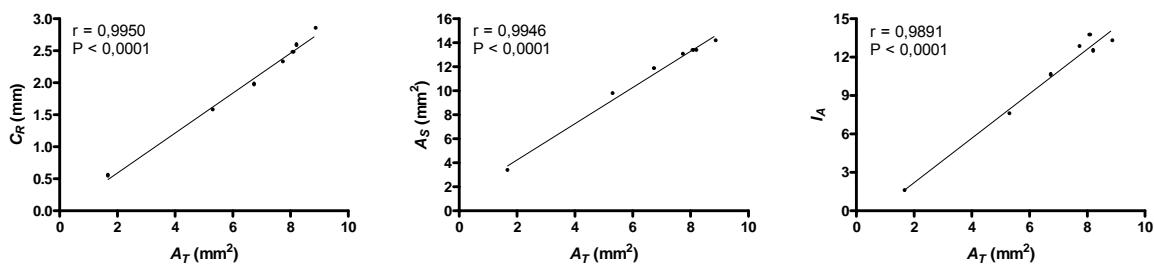


FIGURA 60 – Diagramas de dispersão de  $A_T$  em função de  $C_R$ ,  $A_S$  e  $I_A$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $A_T$  e as demais variáveis.

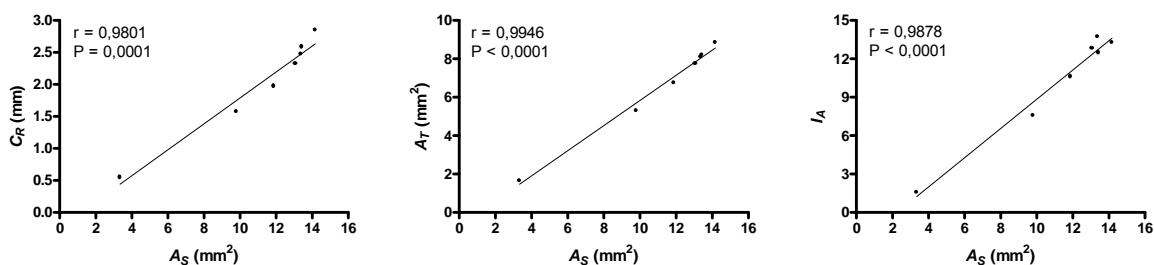


FIGURA 61 – Diagramas de dispersão de  $A_S$  em função de  $C_R$ ,  $A_T$  e  $I_A$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $A_S$  e as demais variáveis.

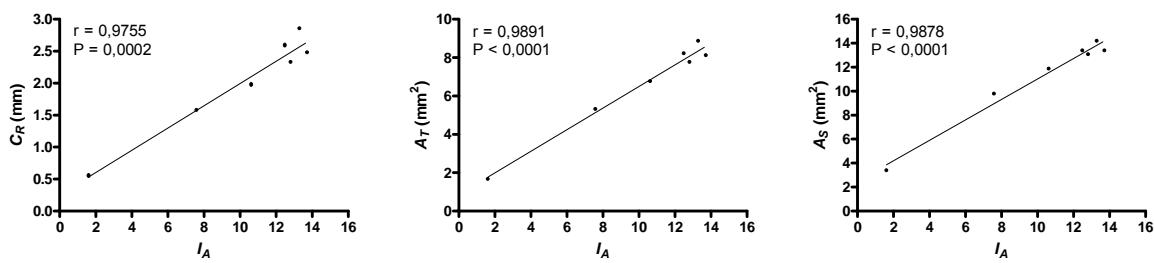


FIGURA 62 – Diagramas de dispersão de  $I_A$  em função de  $C_R$ ,  $A_T$  e  $A_S$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $I_A$  e as demais variáveis.

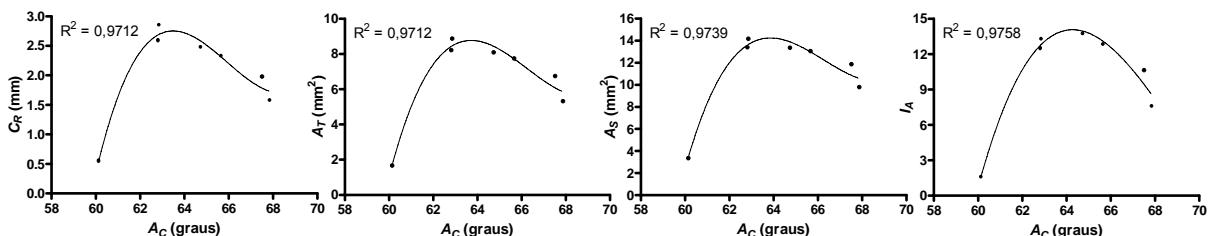
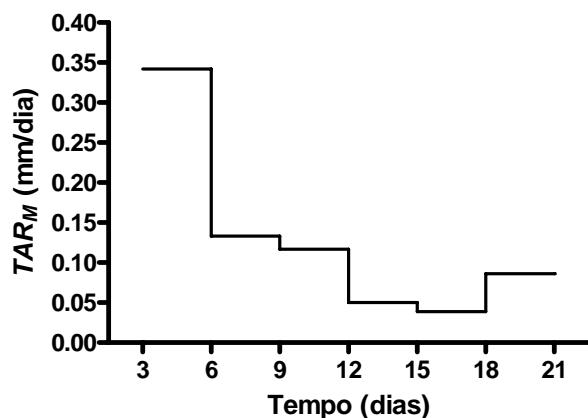


FIGURA 63 – Diagramas de dispersão de  $A_C$  em função de  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. A correlação existente entre  $A_C$  e as demais variáveis é do tipo não linear, como mostram as curvas obtidas por regressão polinomial. As equações das quatro curvas de regressão são do tipo:  $y = a + bx + cx^2 + dx^3$  (um polinômio do 3º grau).  $R^2$  é o coeficiente de determinação.

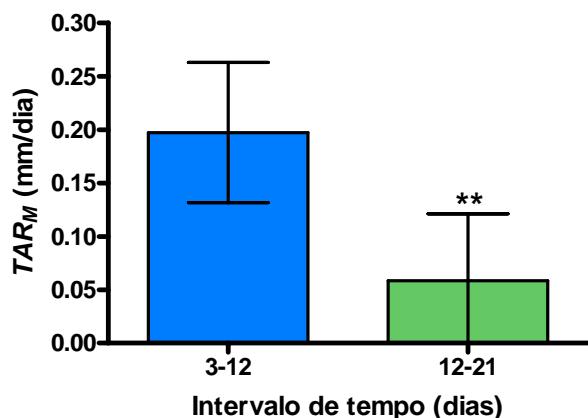
A taxa média de angiogênese calculada com base na variável  $C_R$ , conforme a Equação (3.4), foi denominada de taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ) e representa a velocidade média de crescimento vascular ao longo do raio da córnea, sendo, pois, uma medida linear expressa em mm/dia (Tabela 1). Os valores de  $TAR_M$  relativos aos intervalos de 3 dias foram acentuadamente maiores na primeira metade do período de observação, alcançando o máximo entre o 3º e o 6º dia ( $0,3417 \pm 0,1006$  mm/dia), quando comparados com os da segunda metade, durante a qual mantiveram-se praticamente constantes: entre 0,0389 e 0,0861 mm/dia (Figura 64). O valor de  $TAR_M$  referente ao período entre 3 e 12 dias,  $0,1972 \pm 0,0657$  mm/dia, também foi muito superior àquele relativo ao intervalo entre o 12º e o 21º dia,  $0,0583 \pm 0,0627$  mm/dia, uma diferença estatisticamente significante ( $P = 0,0011$ ), corroborando os dados acima descritos, sendo o primeiro valor 3,38 vezes maior que o segundo (Figura 65). Calculou-se ainda o valor de  $TAR_M$  para todo o período de observação, sendo igual a  $0,1278 \pm 0,0336$  mm/dia.

**TABELA 1** – Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, referente aos intervalos de 3 dias e aos períodos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 e 3 e 21. Os dados correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual.

Intervalo (dias)	Taxa média de angiogênese radial (mm/dia)
3 – 6	$0,3417 \pm 0,1006$
6 – 9	$0,1333 \pm 0,0995$
9 – 12	$0,1167 \pm 0,0502$
12 – 15	$0,0500 \pm 0,1096$
15 – 18	$0,0389 \pm 0,0789$
18 – 21	$0,0861 \pm 0,1096$
3 – 12	$0,1972 \pm 0,0657$
12 – 21	$0,0583 \pm 0,0627$
3 – 21	$0,1278 \pm 0,0336$



**FIGURA 64** – Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, referente aos intervalos de 3 dias entre as avaliações. As linhas horizontais correspondem à média das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual.



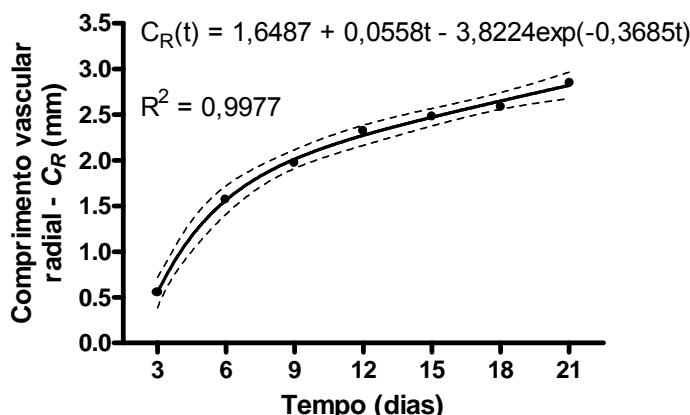
**FIGURA 65** – Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12º e o 21º dia. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método manual e foram analisados pelo teste  $t$  para variáveis emparelhadas. \*\*  $P = 0,0011$ .

Utilizando análise de regressão não linear, determinou-se a equação da curva de regressão que melhor se ajustou aos pontos do diagrama de dispersão de  $C_R$  em função de  $t$ , sendo  $3 \leq t \leq 21$ . O intuito foi estabelecer um modelo matemático para expressar o relacionamento funcional entre a resposta angiogênica, representada por  $C_R$ , e o tempo. A função de regressão encontrada representou uma combinação de uma função linear com uma exponencial (Figura 66) — de fato, uma associação lógica, tendo em vista a evolução temporal de  $C_R$  (Figura 54) —, sendo definida por:

$$C_R(t) = 1,6487 + 0,0558t - 3,8224 \exp(-0,3685t). \quad (4.1)$$

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) calculado para a operação foi  $R^2 = 0,9977$ . Um valor muito próximo de 1, indicando um quase perfeito ajuste da curva aos pontos.

Na Equação (4.1), o componente exponencial predomina quando  $t$  assume valores pequenos, ao passo que, para valores maiores de  $t$ , a predominância passa a ser do componente linear. Assim, examinando o gráfico da Figura 66, nota-se que  $C_R$  cresceu exponencialmente até por volta do dia 12, quando então assumiu um padrão linear que persistiu até o dia 21. A Equação (4.1) define a função horária de  $C_R$  e sua importância decorre do fato de possibilitar a previsão do valor de  $C_R$  para qualquer instante  $t$  pertencente ao intervalo de tempo compreendido entre 3 e 21 dias.



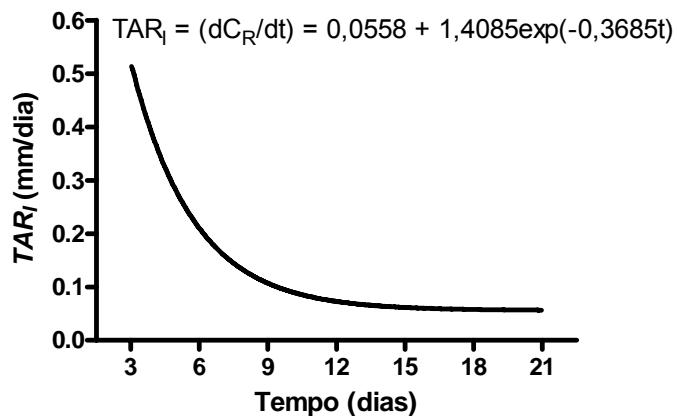
**FIGURA 66** – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária  $C_R(t)$ , obtida por regressão não linear. A linha contínua corresponde à curva de regressão. As linhas tracejadas definem o intervalo de confiança de 95% e delimitam uma região de confiança onde se encontra, com 95% de certeza, a real curva de regressão.  $R^2$  é o coeficiente de determinação.

A partir da equação (4.1), determinou-se a taxa instantânea de angiogênese radial ( $TAR_I$ ), definida como a derivada de  $C_R(t)$  em relação a  $t$  ( $dC_R/dt$ ), ou seja:

$$TAR_I = \frac{dC_R}{dt} = 0,0558 + 1,4085 \exp(-0,3685t). \quad (4.2)$$

A Figura 67 mostra o gráfico de  $dC_R/dt$ , onde a taxa de angiogênese pode ser avaliada em cada instante  $t$  dentro do intervalo de 3 a 21 dias, ou seja, a taxa instantânea. Difere, pois, da taxa média, que é relativa a um dado intervalo de tempo. Assim sendo, examinando a curva de  $dC_R/dt$ , observa-se que  $TAR_I$ , inicialmente alta no dia 3, diminuiu acentuadamente até o dia 6 e de forma paulatina nos dias subsequentes, até se tornar praticamente constante a partir do dia 12, permanecendo assim até o dia 21. Um padrão similar àquele de  $TAR_M$ , mostrado na Figura 64. O comportamento temporal de  $TAR_I$  mostra que o crescimento vascular

abrupto observado nos primeiros dias desacelerou lentamente, até se tornar linear por volta do 12º dia, persistindo assim até o dia 21.



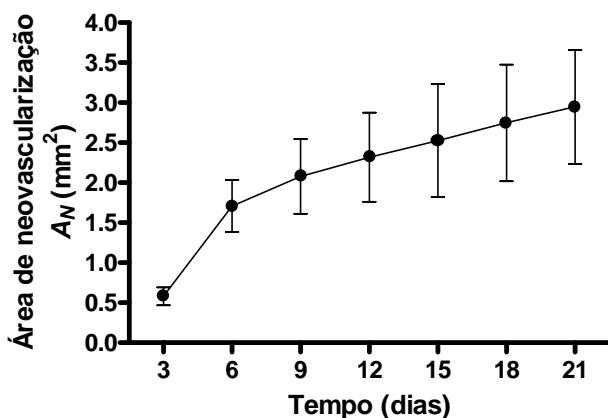
**FIGURA 67** – Derivada de  $C_R$  em relação a  $t$  ( $dC_R/dt$ ), que corresponde à taxa instantânea de angiogênese radial ( $TAR_i$ ).

Os gráficos de  $C_R(t)$ ,  $TAR_i$  e  $TAR_M$  mostram que, neste modelo, a resposta angiogênica progrediu em duas fases claramente distintas: uma fase de crescimento exponencial durante os 12 primeiros dias (fase de proliferação), onde a alta taxa de angiogênese dos primeiros dias decresceu paulatinamente até se estabilizar por volta do 12º dia; e uma fase de crescimento linear durante o período de 12 a 21 dias (fase de maturação), caracterizada por uma taxa de angiogênese baixa e praticamente constante.

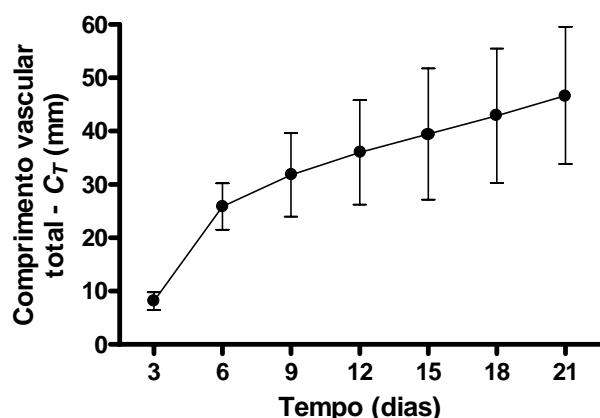
#### 4.2 Método automático de quantificação de angiogênese

O sistema de quantificação de angiogênese (método automático) desenvolvido neste estudo mensurou a resposta neovascular mediante o cálculo dos seguintes parâmetros: área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). A evolução temporal dessas três variáveis foi muito semelhante, conforme mostram os gráficos de  $A_N$  (Figura 68),  $C_T$  (Figura 69) e  $N_V$  (Figura 70) em função do tempo. Tal similaridade se estendeu também às variáveis manuais  $C_R$ ,  $A_T$  e  $A_S$ . As curvas de  $A_N$  e  $C_T$  apresentaram um crescimento abrupto entre os dias 3 e 6, que diminuiu paulatinamente de intensidade entre os dias 9 e 12, caracterizando assim um crescimento exponencial durante esse período; a partir do 12º dia assumiram um padrão de crescimento linear, que foi

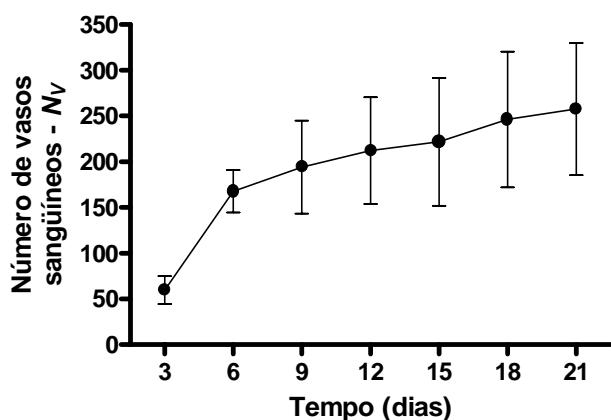
mantido até o dia 21. A curva de  $N_V$  revelou este mesmo perfil temporal, exceto por uma ascendência ainda mais abrupta entre os dias 3 e 6. Os valores máximos de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  foram verificados no dia 21, sendo iguais a  $2,9473 \pm 0,7117 \text{ mm}^2$ ,  $46,6952 \pm 12,8783 \text{ mm}$  e  $257,6667 \pm 72,2009$  vasos, respectivamente.



**FIGURA 68** – Progressão temporal da resposta angiogênica de acordo com a variável área de neovascularização ( $A_N$ ). Os dados, expressos em mm<sup>2</sup>, correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método automático nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.



**FIGURA 69** – Progressão temporal da resposta angiogênica de acordo com a variável comprimento vascular total ( $C_T$ ). Os dados, expressos em mm, correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método automático nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

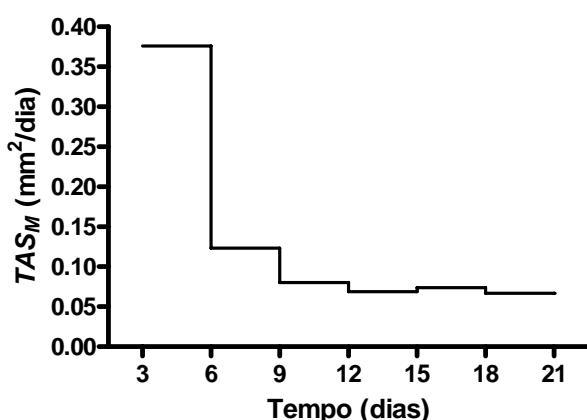


**FIGURA 70** – Progressão temporal da resposta angiogênica de acordo com a variável número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). Os dados correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método automático nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

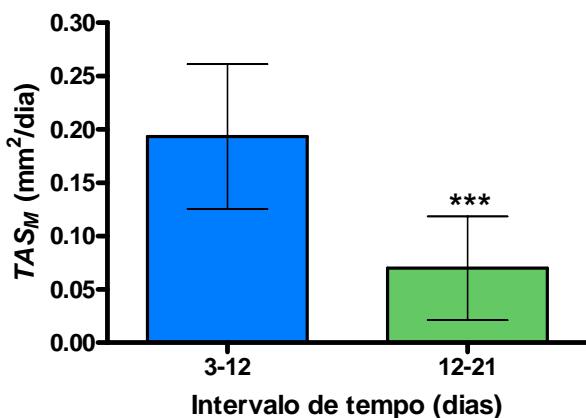
A taxa média de angiogênese também foi calculada tomando-se como base a variável automática  $A_N$ , conforme a Equação (3.33), sendo denominada de taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) (Tabela 2). Denota, neste caso, a taxa média de crescimento ou de expansão da árvore vascular em todas as direções do estroma corneano, constituindo, pois, uma medida quadrática expressa em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ . Analisando os valores de  $TAS_M$  referentes aos intervalos de 3 dias, constatou-se que o valor máximo foi observado no intervalo entre os dias 3 e 6 ( $0,3759 \pm 0,1205 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ). Na seqüência,  $TAS_M$  decresceu acentuadamente no intervalo entre os dias 6 e 9, diminuiu um pouco mais entre os dias 9 e 12 e se manteve praticamente constante nos intervalos subseqüentes (Figura 71). O valor de  $TAS_M$  referente ao período entre os dias 3 e 12 ( $0,1931 \pm 0,0677 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) foi 2,77 vezes maior que o relativo ao intervalo entre o 12º e 21º dia ( $0,0698 \pm 0,0487 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ), uma diferença estatisticamente significante ( $P = 0,0004$ ) (Figura 72). A progressão temporal de  $TAS_M$  foi, portanto, análoga à de  $TAR_M$ . O valor de  $TAS_M$  referente a todo o período de observação foi  $0,1315 \pm 0,0412 \text{ mm}^2/\text{dia}$ .

**TABELA 2** – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente aos intervalos de 3 dias e aos períodos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 e 3 e 21. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método automático.

Intervalo (dias)	Taxa média de angiogênese superficial ( $\text{mm}^2/\text{dia}$ )
3 – 6	$0,3759 \pm 0,1205$
6 – 9	$0,1233 \pm 0,0840$
9 – 12	$0,0801 \pm 0,0456$
12 – 15	$0,0688 \pm 0,0659$
15 – 18	$0,0738 \pm 0,0642$
18 – 21	$0,0668 \pm 0,0785$
3 – 12	$0,1931 \pm 0,0677$
12 – 21	$0,0698 \pm 0,0487$
3 – 21	$0,1315 \pm 0,0412$



**FIGURA 71** – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente aos intervalos de 3 dias entre as avaliações. As linhas horizontais correspondem à média das medições efetuadas em 12 córneas pelo método automático.



**FIGURA 72** – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12º e o 21º dia. Os dados correspondem à média  $\pm$  desvio padrão das medições efetuadas em 12 córneas pelo método automático e foram analisados pelo teste  $t$  para variáveis emparelhadas. \*\*\*  $P = 0,0004$ .

A análise de regressão não linear foi utilizada para determinar as funções de regressão  $A_N(t)$ ,  $C_R(t)$  e  $N_V(t)$ , que estabelecem a relação funcional entre essas variáveis e o tempo ( $t$ ). Analogamente a  $C_R(t)$ , as equações das curvas de regressão que melhor se ajustaram aos pontos dos diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_R$  e  $N_V$  em função de  $t$  representaram também uma combinação de uma função linear com uma exponencial. Assim, a relação entre  $A_N$  e  $t$  (Figura 73) foi definida pela função de regressão:

$$A_N(t) = 1,4872 + 0,0696t - 6,3296 \exp(-0,5787t). \quad (4.3)$$

A equação que definiu  $C_T$  em função de  $t$  (Figura 74) foi:

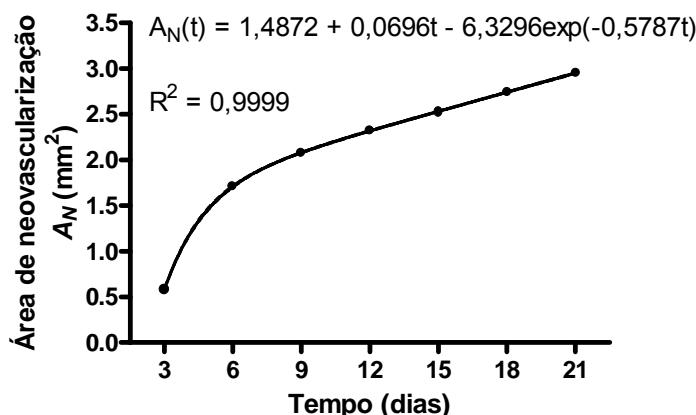
$$C_T(t) = 21,7360 + 1,1843t - 98,6018 \exp(-0,5827t). \quad (4.4)$$

O relacionamento funcional entre  $N_V$  e  $t$  (Figura 75), por sua vez, foi estabelecido pela seguinte equação:

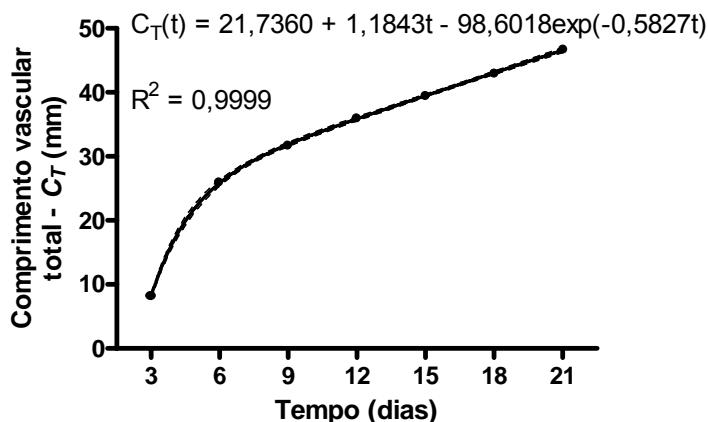
$$N_V(t) = 147,0357 + 5,3047t - 964,7379 \exp(-0,7448t). \quad (4.5)$$

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para  $A_N(t)$  e  $C_T(t)$  foi 0,9999, praticamente 1, significando um perfeito ajuste das respectivas curvas de regressão aos dados, como mostram as Figuras 73 e 74. Para  $N_V(t)$ , no entanto,  $R^2$  foi ligeiramente menor, 0,9984, designando ainda um quase perfeito ajuste da curva aos dados (Figura 75). Obviamente, as funções de regressão  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$  estão definidas apenas para  $t$  pertencente ao intervalo [3, 21]. Nessas funções, o componente exponencial predomina enquanto  $t$  assume valores pequenos. Para  $t > 12$ , os valores fornecidos por esse componente se aproximam de zero, de modo que a parte linear dessas funções passa a predominar. De fato, examinando os gráficos de  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$ ,

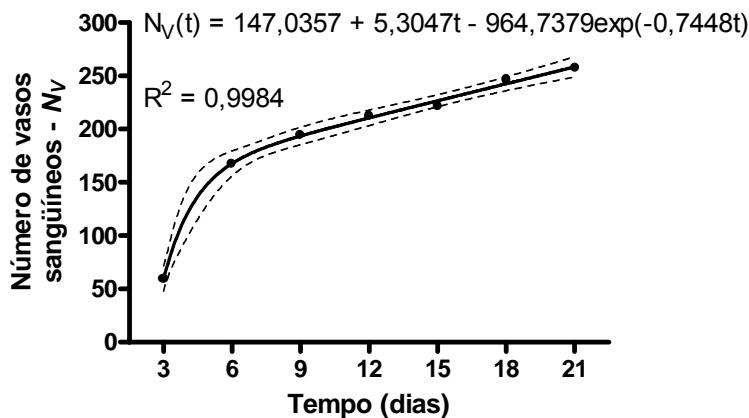
observa-se um crescimento súbito dessas variáveis até o dia 6, que se atenuou nos dias 9 e 12 (padrão exponencial); a partir do dia 12, assumiram um padrão de crescimento linear que se estendeu até o dia 21. As Equações (4.3), (4.4) e (4.5) definem as funções horárias de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , respectivamente, de maneira que permitem predizer os valores dessas variáveis em qualquer instante  $t$  pertencente ao intervalo entre os dias 3 e 21.



**FIGURA 73** – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária  $A_N(t)$ , obtida por regressão não linear. A linha contínua corresponde à curva de regressão. As linhas tracejadas definem o intervalo de confiança de 95% e delimitam uma região de confiança onde se encontra, com 95% de certeza, a real curva de regressão.  $R^2$  é o coeficiente de determinação.



**FIGURA 74** – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária  $C_T(t)$ , obtida por regressão não linear. A linha contínua corresponde à curva de regressão. As linhas tracejadas definem o intervalo de confiança de 95% e delimitam uma região de confiança onde se encontra, com 95% de certeza, a real curva de regressão.  $R^2$  é o coeficiente de determinação.

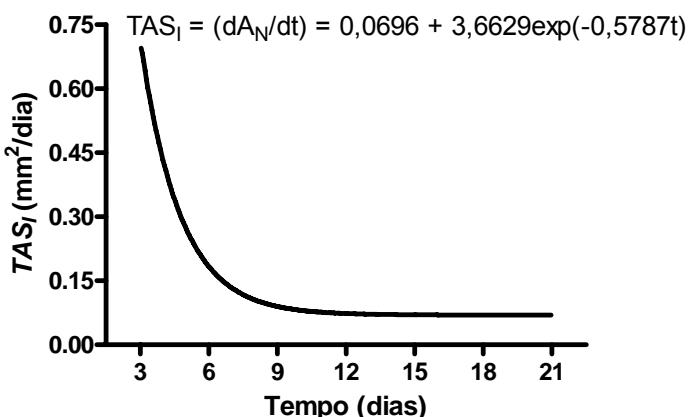


**FIGURA 75** – Progressão da resposta angiogênica de acordo com a função horária  $N_v(t)$ , obtida por regressão não linear. A linha contínua corresponde à curva de regressão. As linhas tracejadas definem o intervalo de confiança de 95% e delimitam uma região de confiança onde se encontra, com 95% de certeza, a real curva de regressão.  $R^2$  é o coeficiente de determinação.

A taxa instantânea de angiogênese superficial ( $TAS_I$ ) foi obtida a partir da Equação (4.3), derivando-se  $A_N$  em relação a  $t$ , ou seja:

$$TAS_I = \frac{dA_N}{dt} = 0,0696 + 3,6629 \exp(-0,5787t). \quad (4.6)$$

Confrontando os gráficos de  $TAS_I$  (Figura 76) e  $A_N$  (Figura 73), nota-se que os valores altos de  $TAS_I$  correspondem ao crescimento abrupto inicial de  $A_N$ . Na seqüência, os valores de  $TAS_I$  decaíram acentuadamente até o dia 6 e daí suavemente até o dia 12, correspondendo à desaceleração do crescimento de  $A_N$  observada entre os dias 6 e 12. A partir do dia 12,  $TAS_I$  se tornou praticamente constante, indicando que o crescimento de  $A_N$  passou a ser linear. Tal padrão temporal foi semelhante àquele apresentado por  $TAS_M$ , mostrado na Figura 64. Em se tratando de uma derivada,  $TAS_I$  calculada em  $t_1$  pode também ser interpretada como a declividade (coeficiente angular) da reta tangente ao gráfico de  $A_N(t)$  no ponto  $(t_1, A_N(t_1))$ . Sendo assim, à medida que o tempo avança, a declividade da reta tangente ao gráfico de  $A_N$  vai diminuindo, até se tornar constante por volta do dia 12, permanecendo assim até o dia 21.



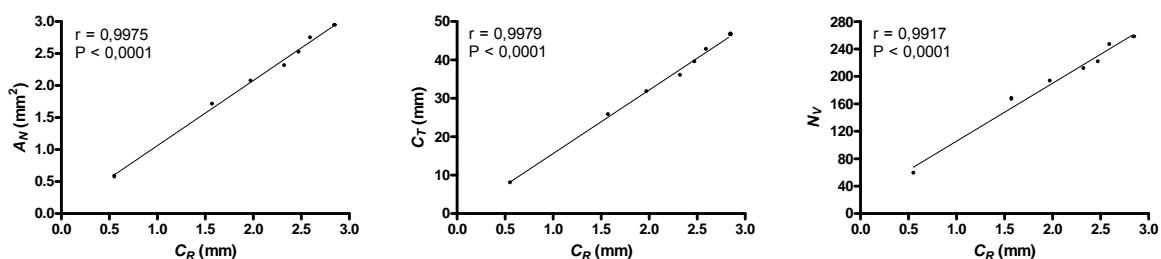
**FIGURA 76** – Derivada de  $A_N$  em relação a  $t$  ( $dA_N/dt$ ), que corresponde à taxa instantânea de angiogênese superficial ( $TAS_I$ ).

As informações obtidas a partir da análise dos gráficos dos quantificadores automáticos  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$ ,  $N_V(t)$ ,  $TAS_M$  e  $TAS_I$ , associadas àquelas fornecidas pelos gráficos dos quantificadores manuais  $C_R(t)$ ,  $TAR_M$  e  $TAR_I$ , corroboram a hipótese de que, neste modelo, a resposta angiogênica evolui em duas fases claramente distintas: uma fase de crescimento exponencial durante os primeiros 12 dias (fase de proliferação) e uma fase de crescimento linear entre os dias 12 e 21 (fase de maturação).

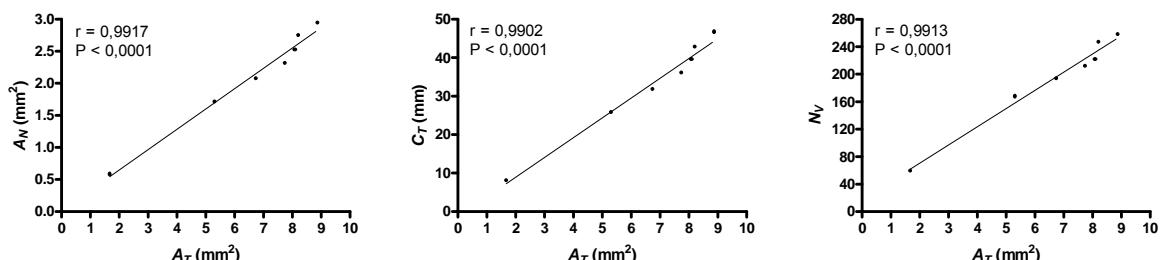
O método automático foi avaliado no que se refere à sua validade e confiabilidade. O processo de avaliação da validade compreendeu três etapas. A primeira delas consistiu em determinar o grau e sinal da dependência linear entre os quantificadores automáticos  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  e os parâmetros manuais  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$ ,  $I_A$  e  $A_C$  mediante o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Constatou-se uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante, entre  $C_R$  e  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  (Figura 77), bem como entre  $A_T$  e  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  (Figura 78), onde os valores de  $r$  variaram entre 0,9902 e 0,9979, portanto muito próximos da unidade, com  $P < 0,0001$ . Uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante, foi igualmente verificada entre  $A_S$  e  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  (Figura 79), assim como entre  $I_A$  e  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  (Figura 80), porém com valores de  $r$  ligeiramente menores, variando entre 0,9630 e 0,9855, e valores de  $P$  entre 0,0001 e 0,0005. Tais dados mostram que as variáveis manuais  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$  e as automáticas  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  tendem a aumentar conjuntamente de forma linear. Por outro lado, não se constatou correlação linear significante entre  $A_C$  e  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ . De fato, similarmente ao que aconteceu quando  $A_C$  foi correlacionada com os demais quantificadores manuais, existiu uma

correlação entre  $A_C$  e as variáveis automáticas  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , porém do tipo não linear, conforme demonstram as curvas obtidas por regressão polinomial mostradas na Figura 81.

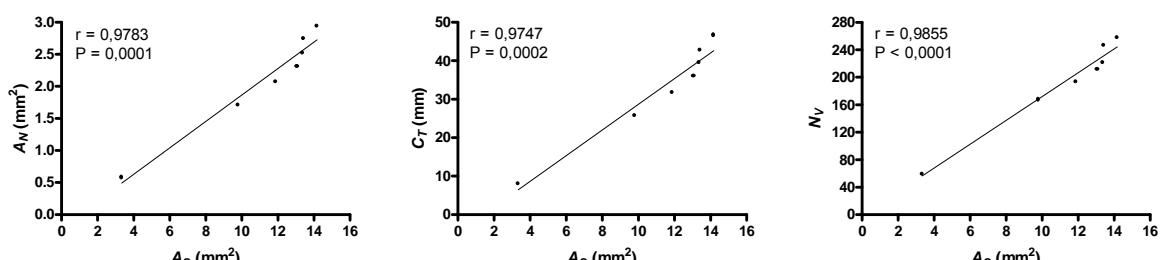
Investigou-se ainda a existência de associação entre as variáveis que mediram a taxa média de angiogênese pelo método manual e pelo método automático, ou seja, entre  $TAR_M$  e  $TAS_M$ . Verificou-se também uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante, entre essas duas variáveis ( $r = 0,9710$ ;  $P = 0,0013$ ) (Figura 82).



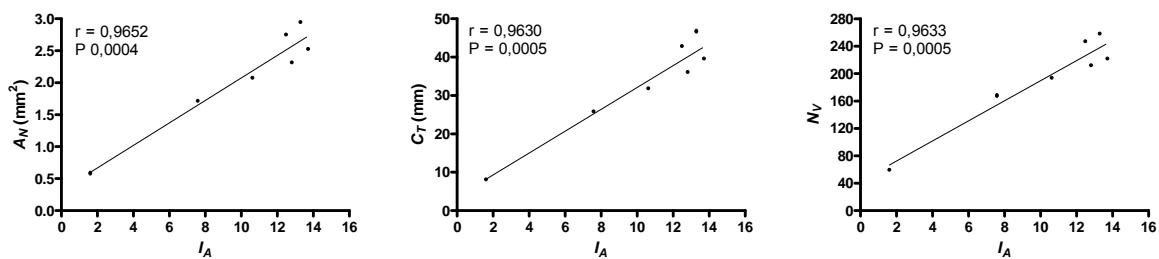
**FIGURA 77** – Diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em função de  $C_R$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $C_R$  e as demais variáveis.



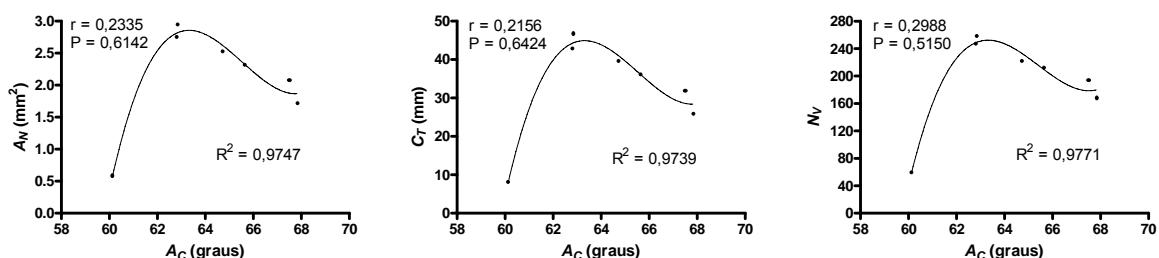
**FIGURA 78** – Diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em função de  $A_T$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $A_T$  e as demais variáveis.



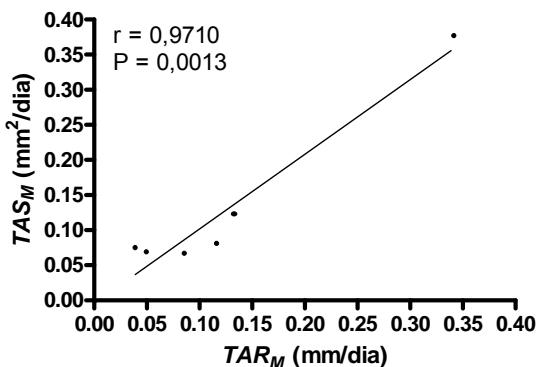
**FIGURA 79** – Diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em função de  $A_S$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $A_S$  e as demais variáveis.



**FIGURA 80** – Diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em função de  $I_A$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre  $I_A$  e as demais variáveis.



**FIGURA 81** – Diagramas de dispersão de  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em função de  $A_C$ . Os pontos representam os valores médios das variáveis nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. A correlação existente entre  $A_C$  e as demais variáveis é do tipo não linear, como mostram as curvas obtidas por regressão polinomial. As equações das três curvas de regressão são do tipo:  $y = a + bx + cx^2 + dx^3$  (um polinômio do 3º grau).  $R^2$  é o coeficiente de determinação e  $r$  é o coeficiente de correlação de Pearson.



**FIGURA 82** – Diagrama de dispersão da taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) em função da taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ). Os pontos representam os valores médios das variáveis referentes aos intervalos de 3 dias e a linha corresponde à reta de regressão. Notar a forte correlação linear positiva entre as duas variáveis.

Na segunda etapa, avaliou-se a acurácia do método automático em classificar os *pixels* como pertencentes aos vasos ou ao fundo em 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  *pixels* (classificação automática) mediante a comparação com a classificação realizada por 3 examinadores independentes (classificação manual), considerada o padrão-ouro. Como a escolha do limiar de segmentação é um processo crítico que determina a correta separação dos vasos do restante da cena

e, por conseguinte, a exatidão da quantificação, decidiu-se também verificar se o limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema era realmente o ideal. Para tanto, o método automático classificou 5 séries de 50 subimagens, cada uma baseada em um limiar diferente: o próprio limiar ( $L$ ) sugerido pelo *software* e os 2 níveis abaixo e acima de  $L$ , ou seja,  $L - 1$ ,  $L - 2$ ,  $L + 1$  e  $L + 2$ .

Assim sendo, as 5 séries da classificação automática, representando os 5 níveis de limiar, foram então comparadas com a classificação manual. Durante a operação, computaram-se o número de verdadeiro-positivos, falso-positivos, falso-negativos e verdadeiro-negativos (Tabelas 3, 5, 7, 9 e 11) para cada um dos 5 níveis de limiar, a partir dos quais foram calculados os seguintes parâmetros: sensibilidade, especificidade e coeficiente de concordância *kappa* (Tabelas 4, 6, 8, 10 e 12). Na Tabela 3, pode-se avaliar o desempenho da classificação automática, enquanto na Tabela 4, enumeram-se os respectivos valores da sensibilidade, especificidade e coeficiente *kappa*, considerando-se como limiar de segmentação o próprio limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema. Tomando-se como referência os dados da Tabela 4, observa-se que à medida que se diminuiu o limiar, a sensibilidade aumentou e a especificidade diminuiu, enquanto o coeficiente *kappa* também diminuiu (Tabelas 5, 6, 7 e 8). Contrariamente, à proporção que se incrementou o limiar, a sensibilidade diminuiu e a especificidade aumentou, enquanto o coeficiente *kappa* diminuiu mais ainda (Tabelas 9, 10, 11 e 12). Portanto, os valores dos parâmetros sensibilidade e especificidade referentes ao limiar  $L$  sugerido pelo *software* representaram o ponto de equilíbrio em relação àqueles relativos aos níveis de limiar menores ( $L - 1$  e  $L - 2$ ) e maiores ( $L + 1$  e  $L + 2$ ). Além disso, o valor do coeficiente *kappa* relativo ao limiar  $L$  foi o maior dentre os demais, denotando que o maior grau de concordância entre os métodos manual e automático foi proporcionado por este limiar. Esses dados sugerem que o limiar ( $L$ ) calculado automaticamente pelo sistema constituiu realmente aquele que propiciou uma classificação mais correta dos *pixels* como pertencentes aos vasos ou ao fundo.

Dessa forma, a acurácia do método automático pode agora ser avaliada através da análise dos parâmetros relativos à classificação baseada no limiar sugerido pelo sistema, cujos dados estão nas Tabelas 3 e 4. A sensibilidade foi de 0,8532 (3988/4674), ou seja, o método automático classificou corretamente, como pertencentes aos vasos, 85,32% dos *pixels* que, segundo o método manual, pertenciam realmente aos vasos. A especificidade, por sua vez, foi igual a 0,9637

(14770/15326), denotando que o método automático classificou corretamente, como pertencentes ao fundo, 96,37% dos *pixels* que, de acordo com método manual, pertenciam realmente ao fundo. Os intervalos de confiança para ambas as propriedades foram estreitos: 0,8428 a 0,8633 para a sensibilidade e 0,9606 a 0,9666 para a especificidade. Os altos valores da sensibilidade e da especificidade refletiram, pois, o baixo número de falso-negativos e falso-positivos, respectivamente. Além disso, os valores da sensibilidade e da especificidade não foram discrepantes. Na realidade, foram próximos, significando que a alta especificidade não foi obtida em detrimento da sensibilidade e vice-versa. A sensibilidade e especificidade do método automático estão associadas ao grau de concordância entre a classificação automática e a manual, que foi medida pelo coeficiente de concordância *kappa*. O valor deste coeficiente foi igual a 0,8250 ( $P < 0,0001$ ), o que significa uma concordância quase perfeita, conforme os critérios descritos no Quadro 2. Assim, os valores altos da sensibilidade e especificidade são reflexos da excelente concordância entre a classificação automática e a manual.

**TABELA 3** – Classificação dos *pixels* como pertencentes aos vasos sanguíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o próprio limiar (*L*) sugerido pelo sistema. Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 *pixels* por ambos os métodos.

Método automático	Método manual (padrão-ouro)		Total
	Vaso	Fundo	
Vaso	Verdadeiro-positivos 3988	Falso-positivos 556	4544
Fundo	Falso-negativos 686	Verdadeiro-negativos 14770	15456
Total	4674	15326	20000

**TABELA 4** – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o próprio limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema. Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  pixels por ambos os métodos.

Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
Sensibilidade	0,8532 (85,32%)	0,8428 – 0,8633	
Especificidade	0,9637 (96,37%)	0,9606 – 0,9666	
Coeficiente de concordância <i>kappa</i>	0,8250		$P < 0,0001$

**TABELA 5** – Classificação dos pixels como pertencentes aos vasos sanguíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema menos 1 ( $L - 1$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  pixels por ambos os métodos.

Método automático	Método manual (padrão-ouro)		Total
	Vaso	Fundo	
Vaso	Verdadeiro-positivos 4032	Falso-positivos 642	4674
Fundo	Falso-negativos 642	Verdadeiro-negativos 14684	15326
Total	4674	15326	20000

**TABELA 6** – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema menos 1 ( $L - 1$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  pixels por ambos os métodos.

Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
Sensibilidade	0,8626 (86,26%)	0,8524 – 0,8724	
Especificidade	0,9581 (95,81%)	0,9548 – 0,9612	
Coeficiente de concordância <i>kappa</i>	0,8210		$P < 0,0001$

**TABELA 7** – Classificação dos *pixels* como pertencentes aos vasos sangüíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema menos 2 ( $L - 2$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 *pixels* por ambos os métodos.

Método automático	Método manual (padrão-ouro)		Total
	Vaso	Fundo	
Vaso	Verdadeiro-positivos 4068	Falso-positivos 732	4800
Fundo	Falso-negativos 606	Verdadeiro-negativos 14594	15200
Total	4674	15326	20000

**TABELA 8** – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema menos 2 ( $L - 2$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 *pixels* por ambos os métodos.

Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor <i>P</i> )
Sensibilidade	0,8703 (87,03%)	0,8604 – 0,8798	
Especificidade	0,9522 (95,22%)	0,9487 – 0,9556	
Coeficiente de concordância <i>kappa</i>	0,8150		<i>P</i> < 0,0001

**TABELA 9** – Classificação dos *pixels* como pertencentes aos vasos sangüíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema mais 1 ( $L + 1$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 *pixels* por ambos os métodos.

Método automático	Método manual (padrão-ouro)		Total
	Vaso	Fundo	
Vaso	Verdadeiro-positivos 3862	Falso-positivos 503	4365
Fundo	Falso-negativos 812	Verdadeiro-negativos 14823	15635
Total	4674	15326	20000

**TABELA 10** – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema mais 1 ( $L + 1$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels por ambos os métodos.

Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
Sensibilidade	0,8263 (82,63%)	0,8151 – 0,8370	
Especificidade	0,9672 (96,72%)	0,9642 – 0,9699	
Coeficiente de concordância <i>kappa</i>	0,8120		$P < 0,0001$

**TABELA 11** – Classificação dos *pixels* como pertencentes aos vasos sanguíneos ou ao fundo de acordo com os métodos manual (padrão-ouro) e automático. O limiar de segmentação utilizado pelo método automático foi o limiar sugerido pelo sistema mais 2 ( $L + 2$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels por ambos os métodos.

Método automático	Método manual (padrão-ouro)		Total
	Vaso	Fundo	
Vaso	Verdadeiro-positivos 3794	Falso-positivos 457	4251
Fundo	Falso-negativos 880	Verdadeiro-negativos 14869	15749
Total	4674	15326	20000

**TABELA 12** – Parâmetros de avaliação da acurácia do método automático, tomando-se como padrão-ouro o método manual. O método automático considerou como limiar de segmentação o limiar sugerido pelo sistema mais 2 ( $L + 2$ ). Dados referentes à análise de 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels por ambos os métodos.

Parâmetro	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
Sensibilidade	0,8117 (81,17%)	0,8002 – 0,8228	
Especificidade	0,9702 (97,02%)	0,9674 – 0,9728	
Coeficiente de concordância <i>kappa</i>	0,8070		$P < 0,0001$

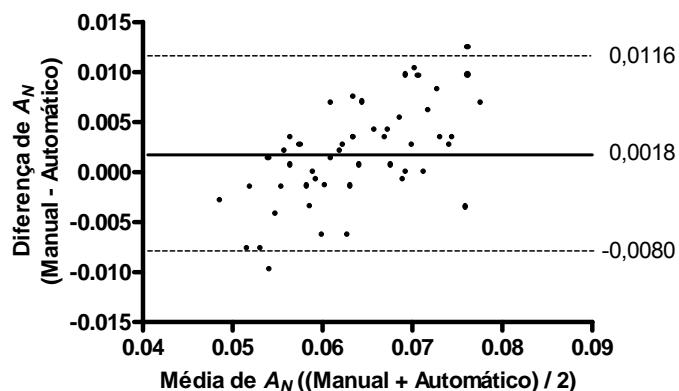
O grau de concordância entre os valores de uma mesma variável —  $A_N$ ,  $C_T$  ou  $N_V$  — obtidos pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens foi avaliado primeiramente pelo coeficiente de correlação intraclasse, sendo a classificação automática baseada no limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema. A Tabela 13 mostra os valores do coeficiente de correlação intraclasse (CCI) para as três variáveis. Para o quantificador  $A_N$ , o CCI foi igual a 0,7840 ( $P < 0,0001$ ), indicando, pois, uma boa concordância, de acordo com os critérios listados no Quadro 3, entre os métodos manual e automático. O CCI referente à variável  $C_T$  foi significativamente maior, 0,9140 ( $P < 0,0001$ ), denotando, conforme os critérios descritos no Quadro 3, uma excelente concordância entre os métodos manual e automático. Para a variável  $N_V$ , o CCI foi igual a 0,7300 ( $P < 0,0001$ ), o menor entre os três, significando ainda uma boa concordância entre os métodos manual e automático, conforme os critérios enumerados no Quadro 3.

**TABELA 13** – Concordância entre as medições das variáveis área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels, avaliada pelo coeficiente de correlação intraclasse (CCI).

Quantificador	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
$A_N$	0,7840	0,6330 – 0,8750	$P < 0,0001$
$C_T$	0,9140	0,8530 – 0,9500	$P < 0,0001$
$N_V$	0,7300	0,5700 – 0,8370	$P < 0,0001$

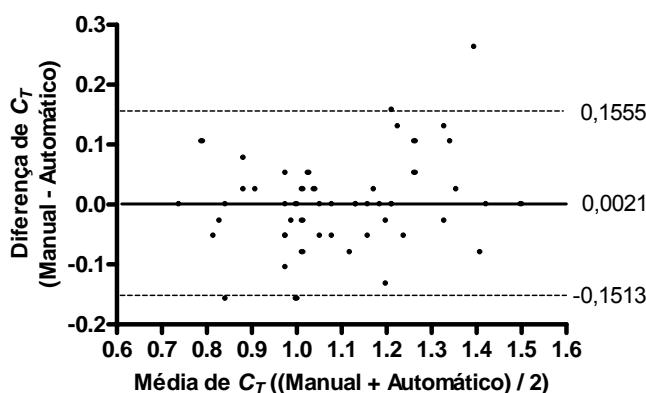
Avaliou-se também a concordância entre as medições das variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$ , efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens, através da análise do gráfico de Bland-Altman. A Figura 83 mostra o gráfico de Bland-Altman, que expressa a diferença entre as medições manuais e automáticas de  $A_N$  em função da média dessas medições. O valor da média das diferenças foi próximo de zero, sendo igual a 0,0018 mm<sup>2</sup>, com desvio padrão de 0,0005 mm<sup>2</sup>, enquanto os limites de concordância determinaram um intervalo relativamente estreito: -0,0080 a 0,0116. Apesar de estreito, esse intervalo contém 95% das diferenças. Tais dados indicam que, para  $A_N$ , os resultados de ambos os métodos foram semelhantes, ou

seja, com uma variabilidade pequena. No entanto, as medições manuais foram maiores que as automáticas na maioria das vezes, o que explica o valor positivo da média das diferenças. Além disso, as diferenças entre as medições não se distribuíram homogeneamente ao longo do eixo horizontal. Houve uma tendência de aumento da diferença com o aumento da magnitude da medida. De fato, nas baixas magnitudes, os valores automáticos sobrepujaram os manuais, ocorrendo o contrário nas altas magnitudes. Entretanto, na faixa intermediária da magnitude das medições, que incluiu a maioria dos valores, as diferenças se distribuíram de forma mais homogênea em torno da média, denotando uma menor variabilidade.



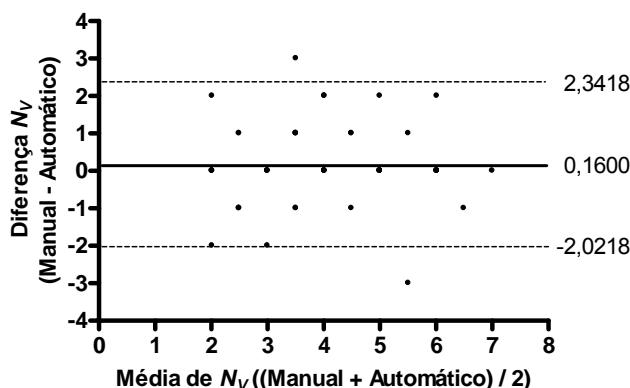
**FIGURA 83** – Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as medições da variável área de neovascularização ( $A_N$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  pixels. A diferença entre as medições manuais e automáticas de  $A_N$  é expressa em função da média das medições. A linha horizontal contínua representa a média das diferenças e as linhas tracejadas correspondem aos limites de concordância.

A Figura 84 mostra o gráfico de Bland-Altman para as medições manuais e automáticas de  $C_T$ . Observa-se que as diferenças se distribuíram de forma homogênea ao longo do eixo horizontal e se concentraram em torno da média, denotando uma variabilidade pequena e constante, razão pela qual não se verificou correlação entre a magnitude das diferenças e a magnitude das medições. O valor da média das diferenças foi muito pequeno, próximo de zero, sendo igual a 0,0021 mm, com desvio padrão de 0,0783 mm. Os limites de concordância definiram um intervalo bastante estreito: -0,1513 a 0,1555. Neste intervalo estão contidas 95% das diferenças observadas, indicando uma pequena variabilidade. Tais dados demonstram que as medições de  $C_T$  por ambos os métodos foram muito semelhantes.



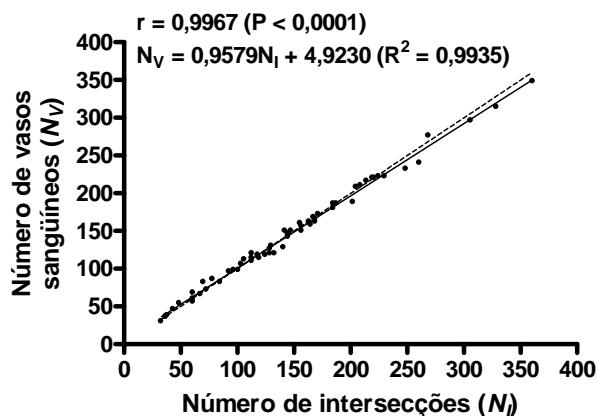
**FIGURA 84** – Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as medições da variável comprimento vascular total ( $C_T$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  pixels. A diferença entre as medições manuais e automáticas de  $C_T$  é expressa em função da média das medições. A linha horizontal contínua representa a média das diferenças e as linhas tracejadas correspondem aos limites de concordância.

O gráfico de Bland-Altman para as medições manuais e automáticas de  $N_V$  é mostrado na Figura 85. Nota-se que as diferenças se distribuíram homogeneamente ao longo do eixo horizontal, porém se mostraram dispersas em relação à média. Não se observou associação entre a magnitude das diferenças e a magnitude das medições. A média das diferenças foi igual a 0,1600, um valor pequeno decerto, com desvio padrão de 1,1132, porém os limites de concordância determinaram um intervalo menos estreito: -2,0218 a 2,3418; indicando uma maior variabilidade das medições e, por conseguinte, uma menor concordância entre os valores manuais e automáticos de  $N_V$ .

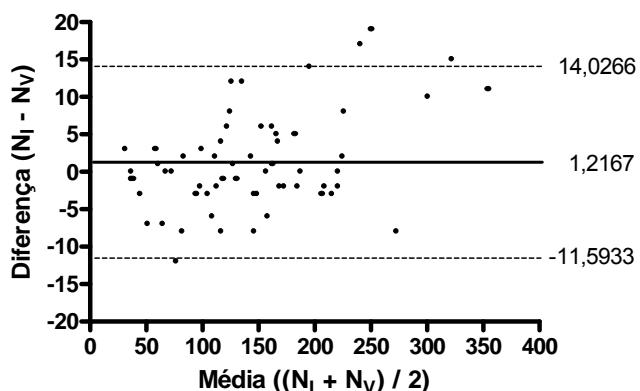


**FIGURA 85** – Gráfico de Bland-Altman para avaliação da concordância entre as medições da variável número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) efetuadas pelos métodos manual e automático nas 50 subimagens de tamanho  $20 \times 20$  pixels. A diferença entre as medições manuais e automáticas de  $N_V$  é expressa em função da média das medições. A linha horizontal contínua representa a média das diferenças e as linhas tracejadas correspondem aos limites de concordância.

A terceira etapa do processo de avaliação da validade do método automático consistiu em mensurar o grau e o sinal da correlação linear entre o número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) e o número de intersecções ( $N_I$ ) entre os vasos e as linhas do sistema-teste, ambos referentes à análise de 60 imagens, mediante o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ). Verificou-se uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante ( $r = 0,9967; P < 0,0001$ ). No diagrama de dispersão de  $N_V$  em função de  $N_I$  (Figura 86), os pontos se situaram ao longo da linha de identidade, que representa a perfeita concordância ( $y = x$ ). Além disso, a reta de regressão praticamente coincidiu com a linha de identidade, sendo o seu coeficiente angular igual a 0,9579, um valor muito próximo da unidade. Analisados conjuntamente, tais dados indicam que entre  $N_V$  e  $N_I$  não existiu apenas uma correlação, mas de fato uma concordância. Assim, calculou-se o coeficiente de correlação intraclasse, cujo valor foi 0,9960 ( $P < 0,0001$ ; intervalo de confiança de 95%: 0,9930 a 0,9980), significando uma concordância excelente, conforme os critérios descritos no Quadro 3. A concordância entre  $N_V$  e  $N_I$  também foi avaliada pelo método gráfico de Blan-Altman (Figura 87). O valor da média das diferenças foi muito pequeno, sendo igual a 1,2167, com desvio padrão de 6,5357. Os limites de concordância definiram um intervalo estreito: -11,5933 a 14,0266. Apesar de estreito, esse intervalo contém 95% das diferenças observadas, o que denota uma pequena variabilidade dos dados. Além disso, as diferenças se concentraram em torno da média e se distribuíram de forma homogênea ao longo do eixo horizontal, indicando uma variabilidade pequena e constante, de modo que não se observou associação entre a magnitude das diferenças e a magnitude das medições. Assim, conjuntamente, esses dados demonstram que os valores de  $N_V$  e  $N_I$  foram muito semelhantes.



**FIGURA 86** – Diagrama de dispersão do número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) em função do número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema-teste ( $N_I$ ). Os dados são referentes à análise de 60 imagens. A linha tracejada equivale à linha de identidade ( $y = x$ ) e a linha contínua corresponde à reta de regressão.  $R^2$  é o coeficiente de determinação e  $r$  é o coeficiente de correlação de Pearson.



**FIGURA 87** – Concordância entre as variáveis número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) e número de intersecções entre os vasos e as linhas do sistema-teste ( $N_I$ ), de acordo com o gráfico de Bland-Altman. Os dados são referentes à análise de 60 imagens. A diferença entre os valores de  $N_I$  e  $N_V$  é expressa em função da média dos valores. A linha horizontal contínua representa a média das diferenças e as linhas tracejadas correspondem aos limites de concordância.

A confiabilidade do método automático foi avaliada através da quantificação da concordância intra e interexaminadores pelo coeficiente de correlação intraclass (CCI). Assim, 3 examinadores utilizaram o método automático para determinar  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em 50 imagens em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. Para a variável  $A_N$ , o CCI referente às medições dos 3 examinadores (concordância interexaminadores) no momento 1 foi 0,8830 ( $P < 0,0001$ ), significando uma boa concordância, de acordo com os critérios enumerados no Quadro 3, enquanto no momento 2, o CCI foi igual a 0,9330 ( $P < 0,0001$ ), indicando uma excelente concordância (Tabela 14). Os valores do CCI referentes às medições de um mesmo examinador nos momentos 1 e 2 (concordância intra-

examinador) foram: 0,9450 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 1; 0,9050 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 2 e 0,9800 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 3 (Tabela 15). Nos três casos, o grau de concordância foi, portanto, excelente.

**TABELA 14** – Concordância interexaminadores em relação ao parâmetro área de neovascularização ( $A_N$ ). Três examinadores determinaram  $A_N$  em 50 imagens, utilizando o método automático, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. O grau de concordância entre as medições efetuadas pelos examinadores 1, 2 e 3 foi avaliado pelo coeficiente de correlação intraclass (CCI) nos momentos 1 e 2.

Momento	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
1	0,8830	0,5070 – 0,9570	$P < 0,0001$
2	0,9330	0,8320 – 0,9680	$P < 0,0001$

**TABELA 15** – Concordância intra-examinador em relação ao parâmetro área de neovascularização ( $A_N$ ). Três examinadores determinaram  $A_N$  em 50 imagens, utilizando o método automático, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. O grau de concordância entre as medições de um mesmo examinador efetuadas nos momentos 1 e 2 foi avaliado pelo coeficiente de correlação intraclass (CCI).

Examinador	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
1	0,9450	0,8450 – 0,9750	$P < 0,0001$
2	0,9050	0,2100 – 0,9720	$P < 0,0001$
3	0,9800	0,9650 – 0,9890	$P < 0,0001$

Em relação ao quantificador  $C_T$ , os valores do CCI referentes às medições dos 3 examinadores nos momentos 1 e 2 foram 0,9110 ( $P < 0,0001$ ) e 0,9480 ( $P < 0,0001$ ), respectivamente (Tabela 16). Em ambos os casos, uma excelente concordância interexaminadores. Constatou-se igualmente uma excelente concordância intra-examinador para cada um dos 3 examinadores, conforme indicam os valores do CCI relativos às medições de um mesmo examinador nos momentos 1 e 2: 0,9560 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 1; 0,9260 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 2 e 0,9840 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 3 (Tabela 17).

**TABELA 16** – Concordância interexaminadores em relação ao parâmetro comprimento vascular total ( $C_T$ ). Três examinadores determinaram  $C_T$  em 50 imagens, utilizando o método automático, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. O grau de concordância entre as medições efetuadas pelos examinadores 1, 2 e 3 foi avaliado pelo coeficiente de correlação intraclass (CCI) nos momentos 1 e 2.

Momento	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
1	0,9110	0,5950 – 0,9670	$P < 0,0001$
2	0,9480	0,8760 – 0,9750	$P < 0,0001$

**TABELA 17** – Concordância intra-examinador em relação ao parâmetro comprimento vascular total ( $C_T$ ). Três examinadores determinaram  $C_T$  em 50 imagens, utilizando o método automático, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. O grau de concordância entre as medições de um mesmo examinador efetuadas nos momentos 1 e 2 foi avaliado pelo coeficiente de correlação intraclass (CCI).

Examinador	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
1	0,9560	0,8840 – 0,9790	$P < 0,0001$
2	0,9260	0,3140 – 0,9790	$P < 0,0001$
3	0,9840	0,9710 – 0,9910	$P < 0,0001$

Para a variável  $N_V$ , os valores do CCI foram um pouco menores do que os análogos de  $A_N$  e  $C_T$ , porém não menos expressivos. O CCI referente às medições dos 3 examinadores no momento 1 foi 0,8510 ( $P < 0,0001$ ), denotando uma boa concordância, enquanto no momento 2, o CCI foi igual a 0,9030 ( $P < 0,0001$ ), significando uma excelente concordância interexaminadores (Tabela 18). Os valores do CCI relativos às medições de um mesmo examinador nos momentos 1 e 2 (concordância intra-examinador) foram: 0,9060 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 1; 0,8830 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 2 e 0,9640 ( $P < 0,0001$ ) para o examinador 3 (Tabela 19). Assim, para o examinador 2, o grau de concordância foi bom, enquanto para os demais, foi excelente.

**TABELA 18** – Concordância interexaminadores em relação ao parâmetro número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). Três examinadores determinaram  $N_V$  em 50 imagens, utilizando o método automático, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. O grau de concordância entre as medições efetuadas pelos examinadores 1, 2 e 3 foi avaliado pelo coeficiente de correlação intraclasse (CCI) nos momentos 1 e 2.

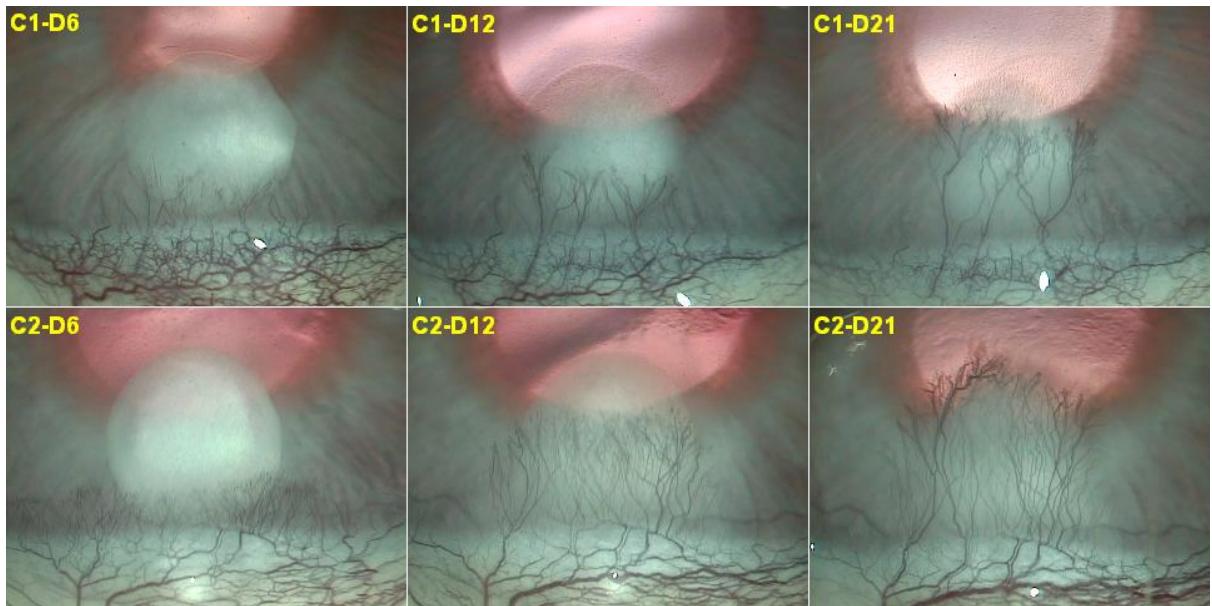
Momento	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
1	0,8510	0,4430 – 0,9430	$P < 0,0001$
2	0,9030	0,7920 – 0,9510	$P < 0,0001$

**TABELA 19** – Concordância intra-examinador em relação ao parâmetro número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). Três examinadores determinaram  $N_V$  em 50 imagens, utilizando o método automático, em 2 momentos, separados por um intervalo de 30 dias. O grau de concordância entre as medições de um mesmo examinador efetuadas nos momentos 1 e 2 foi avaliado pelo coeficiente de correlação intraclasse (CCI).

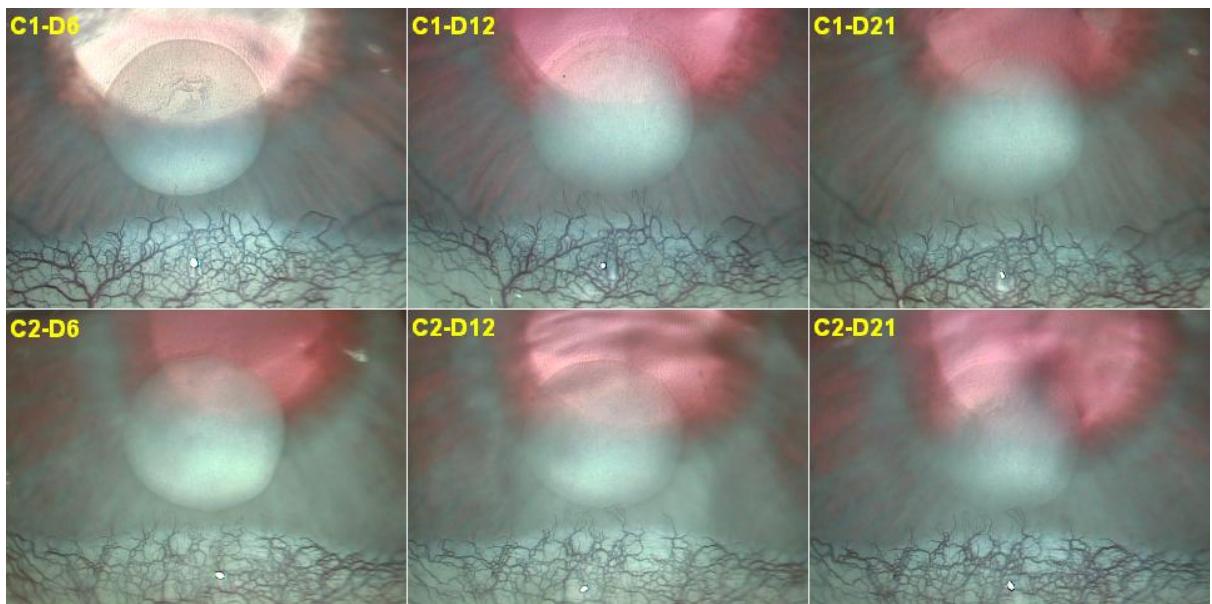
Examinador	CCI	Intervalo de confiança de 95%	Significância (valor $P$ )
1	0,9090	0,7940 – 0,9550	$P < 0,0001$
2	0,8830	0,1750 – 0,9650	$P < 0,0001$
3	0,9640	0,9380 – 0,9800	$P < 0,0001$

#### 4.3 Avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático

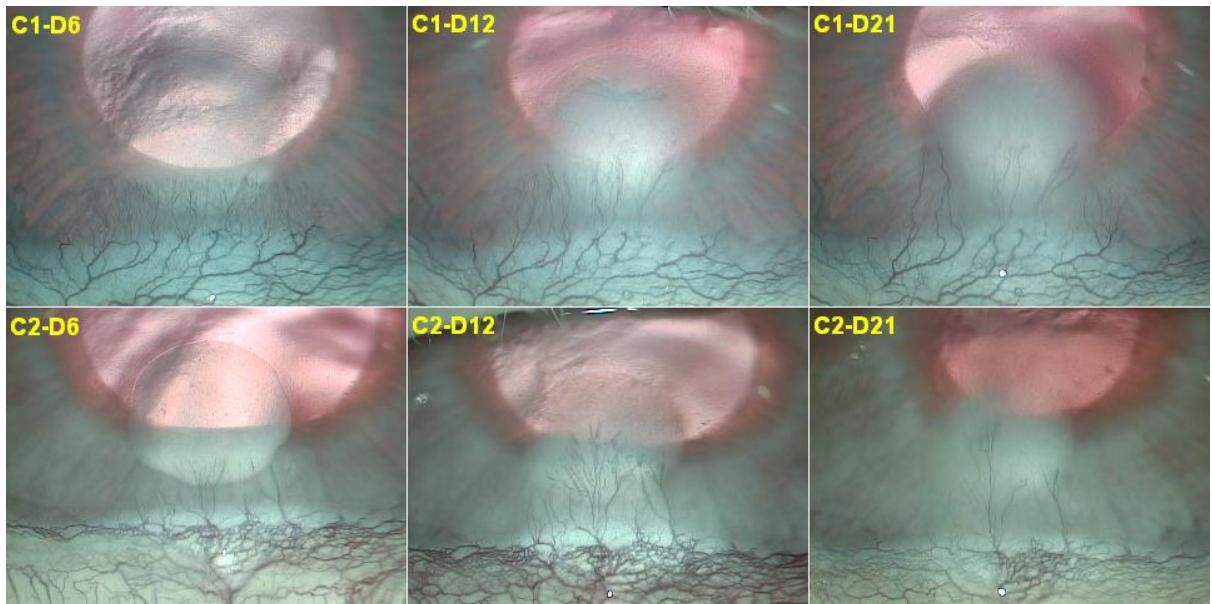
O método automático foi utilizado para quantificar as possíveis alterações na resposta neovascular, no modelo de angiogênese corneana inflamatória, decorrentes do tratamento com prednisona, talidomida, ácido acetilsalicílico (AAS), etoricoxib e celecoxib. A angiogênese foi quantificada nos seis grupos de tratamento mediante a determinação dos seguintes parâmetros: área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). Exemplos da progressão temporal da resposta angiogênica nos grupos controle, prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib são mostrados nas Figuras 88, 89, 90, 91, 92 e 93, respectivamente.



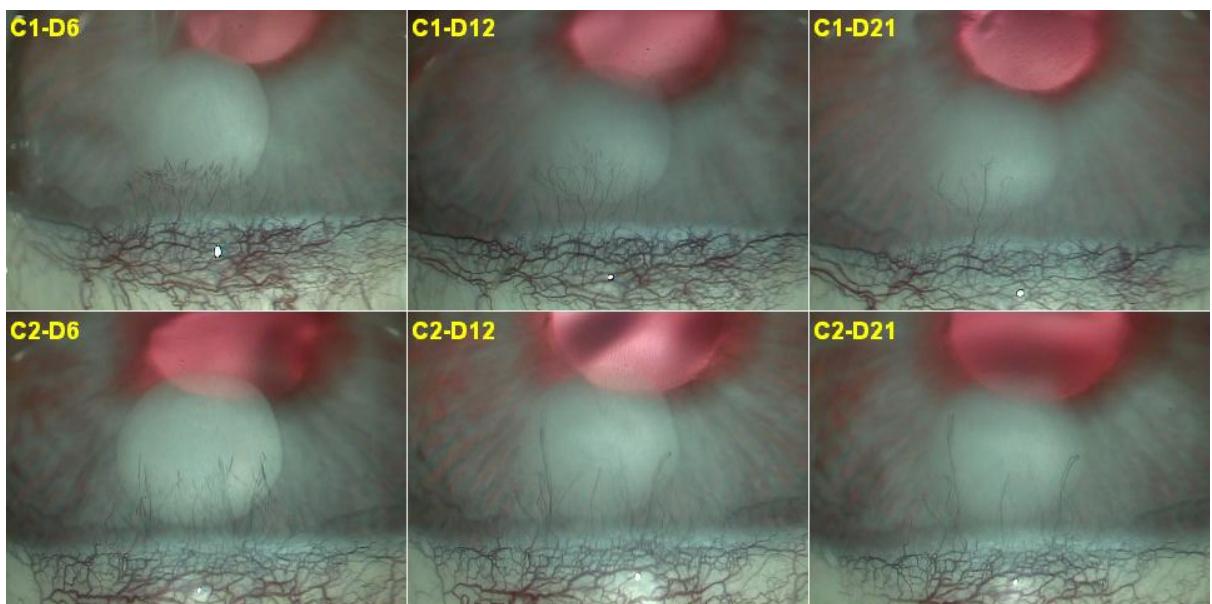
**FIGURA 88** – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo controle (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.



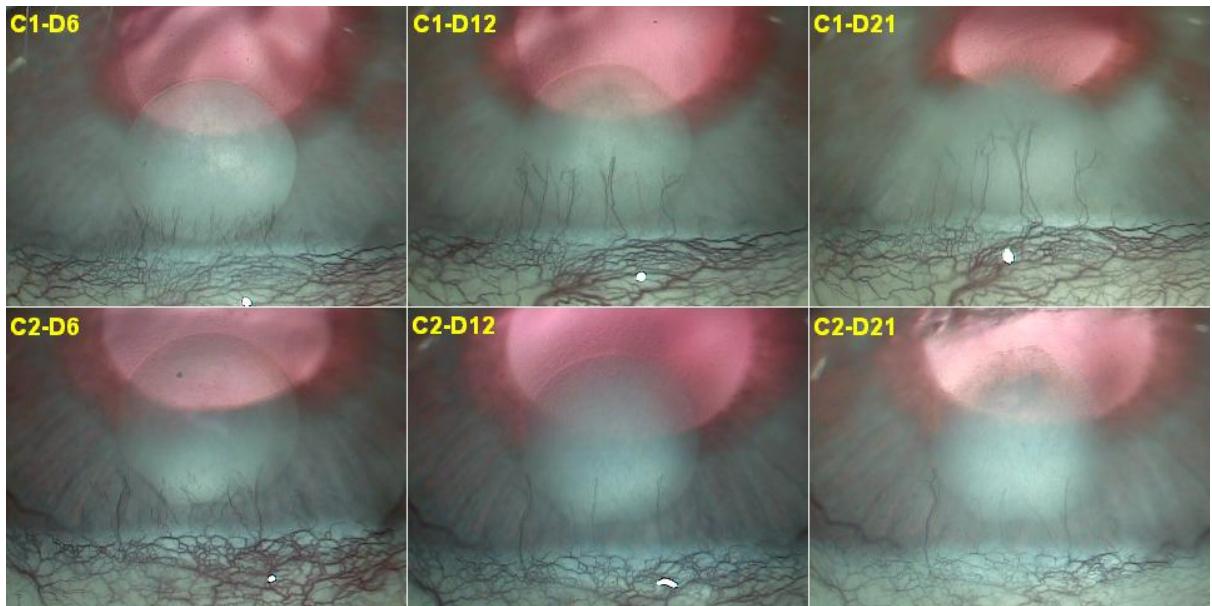
**FIGURA 89** – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo prednisona (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.



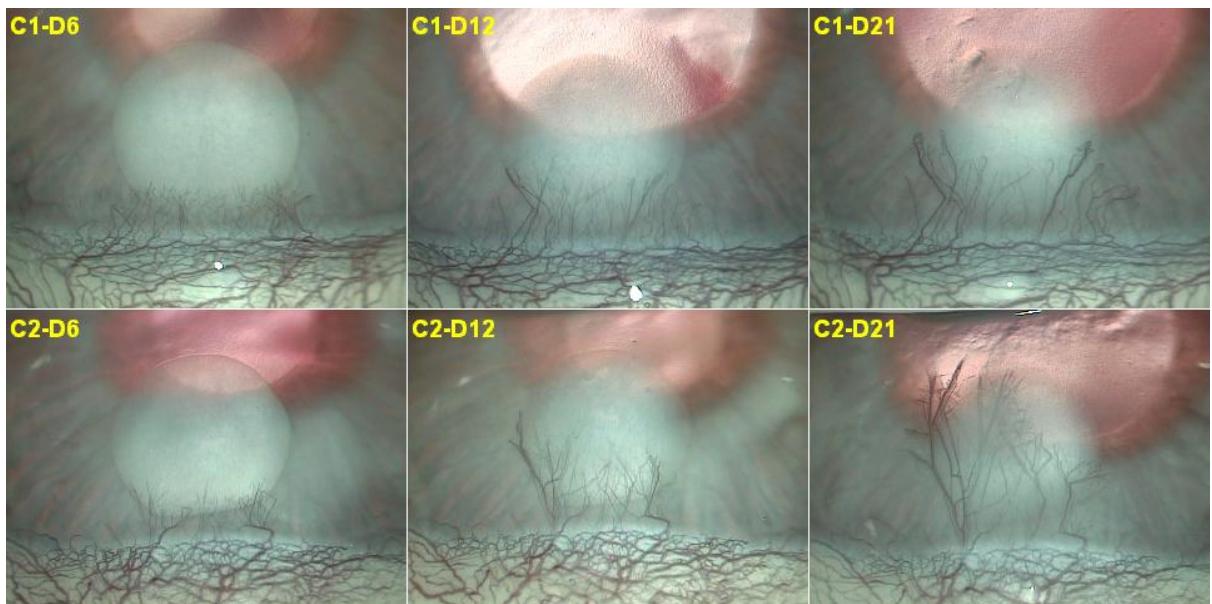
**FIGURA 90** – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo talidomida (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.



**FIGURA 91** – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo AAS (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.

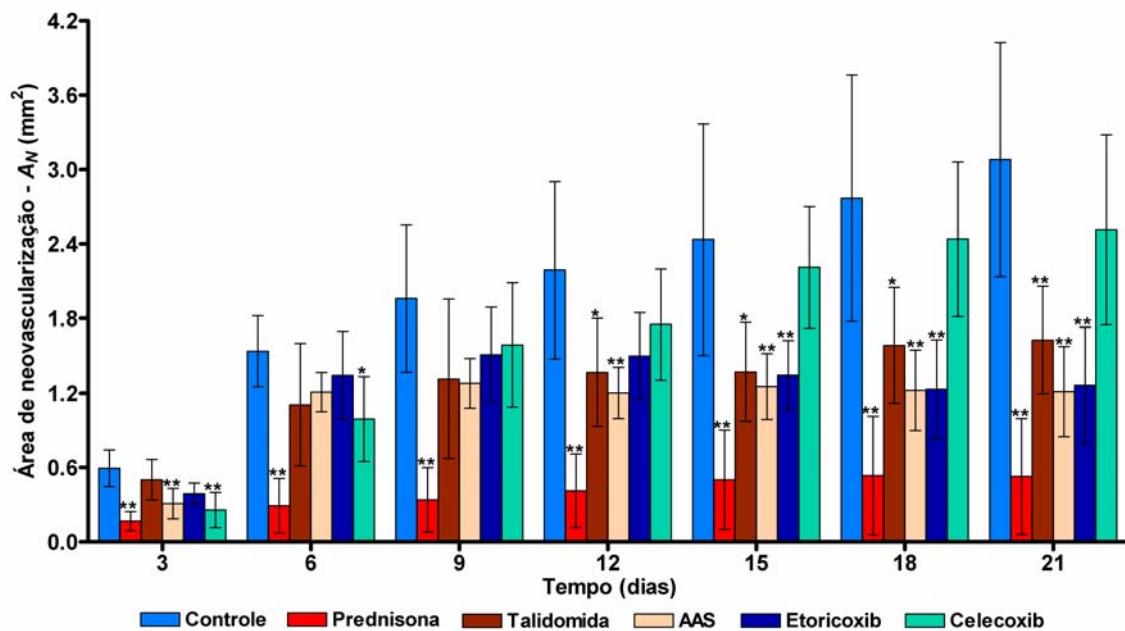


**FIGURA 92** – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo etoricoxib (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.



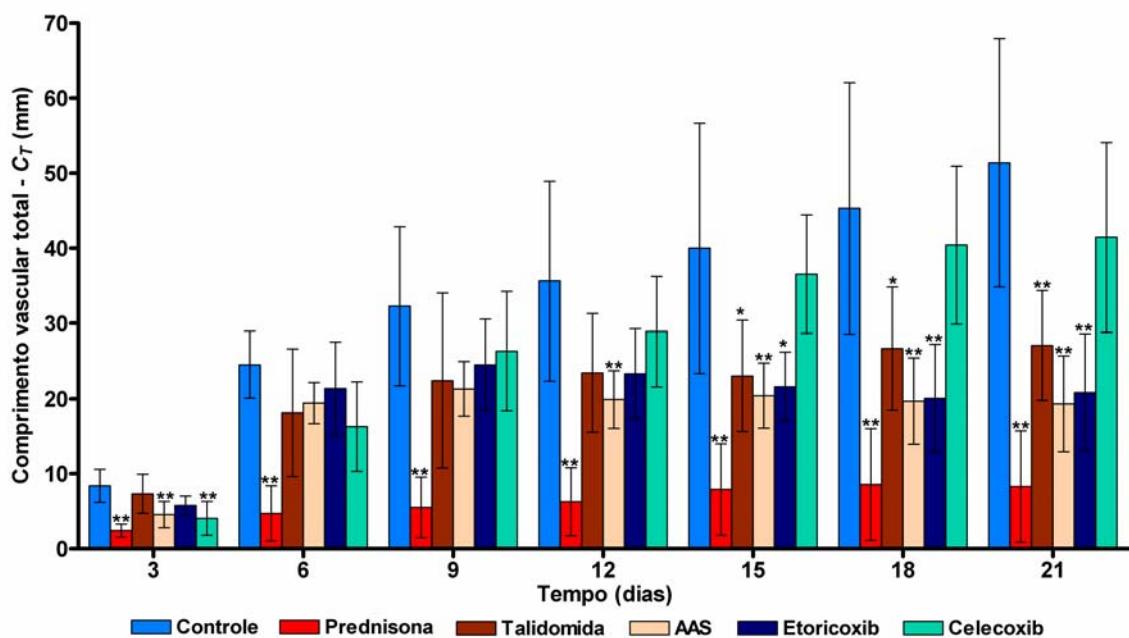
**FIGURA 93** – Aspecto da resposta angiogênica verificada em dois coelhos do grupo celecoxib (C1 e C2) nos dias 6, 12 e 21, após a cauterização. Magnificação de 25 vezes.

A Figura 94 ilustra a quantificação da resposta angiogênica, de acordo com o parâmetro  $A_N$ , nos seis grupos de tratamento. Observa-se que a evolução temporal da resposta neovascular no grupo controle obedeceu ao padrão descrito anteriormente no Item 4.2, isto é: um crescimento exponencial até por volta do dia 12, seguido de um crescimento linear até o dia 21. No grupo prednisona, ao longo dos 21 dias, a curva de  $A_N$  obedeceu a um padrão de crescimento ligeiramente linear, na realidade quase constante, com valores médios muito baixos, bem menores que os do grupo controle, não ultrapassando  $0,5341 \pm 0,4779 \text{ mm}^2$ : o valor máximo, que foi verificado no dia 18. Dessa forma, constataram-se diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,01$ ) entre os grupos prednisona e controle em todas as avaliações, as quais foram realizadas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. No grupo talidomida,  $A_N$  cresceu até o dia 9, manteve-se praticamente constante até o dia 15, voltando a ascender nos dias 18 e 21 (valor máximo). No entanto, os seus valores médios foram sempre menores que os do grupo controle, de modo que diferenças significantes foram verificadas nos dias 12 ( $P < 0,05$ ), 15 ( $P < 0,05$ ), 18 ( $P < 0,05$ ) e 21 ( $P < 0,01$ ). Os valores médios de  $A_N$  relativos ao grupo AAS aumentaram até o dia 9, quando alcançaram o ponto máximo, diminuíram ligeiramente no dia 12 e assim se mantiveram até o dia 21, porém, ao longo dos dias, foram sempre menores que os do grupo controle. Diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,01$ ), em relação ao grupo controle, foram constatadas nos dias 3, 12, 15, 18 e 21. No grupo etoricoxib,  $A_N$  cresceu até o dia 9, quando atingiu o valor máximo, decrescendo linearmente até o dia 18, seguido de um ligeiro aumento no dia 21. Os seus valores médios foram sempre menores que os análogos do grupo controle, observando-se diferenças significantes ( $P < 0,01$ ) nos dias 15, 18 e 21. O padrão de crescimento de  $A_N$  no grupo celecoxib foi semelhante ao do grupo controle, porém com valores médios menores, verificando-se diferenças com significância estatística nos dias 3 ( $P < 0,01$ ) e 6 ( $P < 0,05$ ).



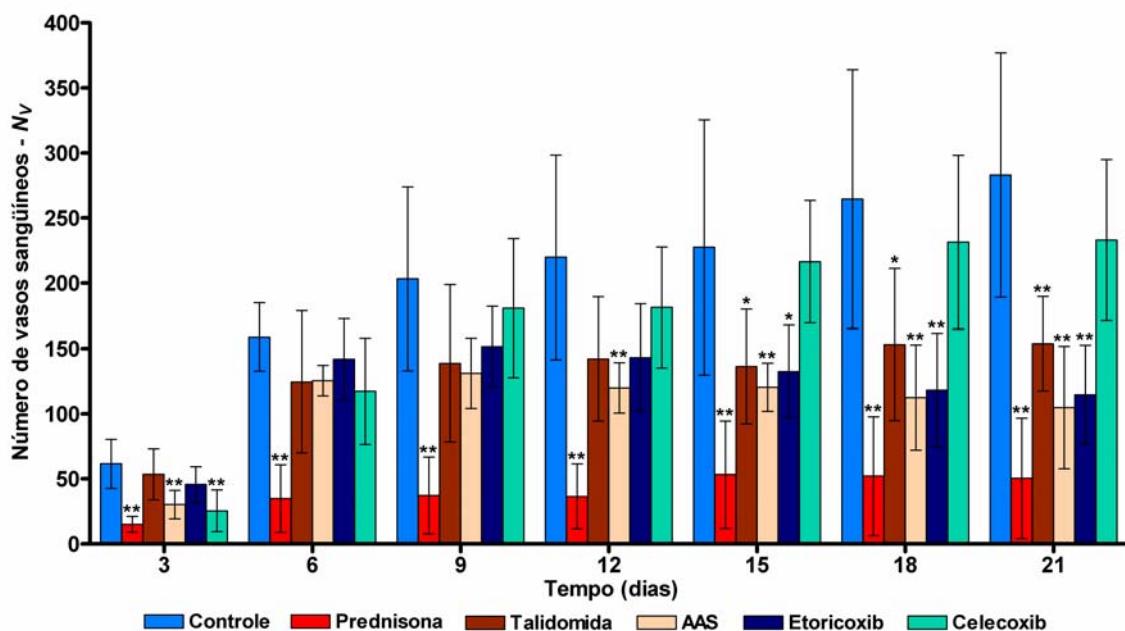
**FIGURA 94** – Quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos de tratamento, conforme o parâmetro área de neovascularização ( $A_N$ ). Os dados, expressos em  $\text{mm}^2$ , correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas pelo método automático em 6 córneas dos grupos controle e AAS e em 5 córneas dos grupos prednisona, talidomida, etoricoxib e celecoxib nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização. Para comparar os seis grupos num mesmo dia, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de Dunnett, que comparou os cinco grupos experimentais com o grupo controle. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia; \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo controle no mesmo dia.

A quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos, conforme a variável  $C_T$ , é detalhada na Figura 95. O padrão de crescimento ou decaimento da curva de  $C_T$  nos seis grupos foi semelhante ao descrito para  $A_N$ . No grupo prednisona, os valores médios de  $C_T$  foram sempre menores que os do grupo controle, constatando-se diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,01$ ) em todos os dias avaliados. Os valores médios de  $C_T$  relativos ao grupo talidomida foram significantemente menores que os análogos do grupo controle nos dias 15 ( $P < 0,05$ ), 18 ( $P < 0,05$ ) e 21 ( $P < 0,01$ ). Entre os grupos AAS e controle, verificaram-se diferenças com significância estatística ( $P < 0,01$ ) nos dias 3, 12, 15, 18 e 21. Diferenças significantes entre os grupos etoricoxib e controle foram observadas nos dias 15 ( $P < 0,05$ ), 18 ( $P < 0,01$ ) e 21 ( $P < 0,01$ ). Ao nível de significância de 5%,  $C_T$  do grupo celecoxib foi menor que  $C_T$  do grupo controle apenas no dia 3 ( $P < 0,01$ ).



**FIGURA 95** – Quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos de tratamento, conforme o parâmetro comprimento vascular total ( $C_T$ ). Os dados, expressos em mm, correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas pelo método automático em 6 córneas dos grupos controle e AAS e em 5 córneas dos grupos prednisona, talidomida, etoricoxib e celecoxib nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização. Para comparar os seis grupos num mesmo dia, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de Dunnett, que comparou os cinco grupos experimentais com o grupo controle. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia; \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo controle no mesmo dia.

A Figura 96 mostra a quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos, de acordo com o parâmetro  $N_V$ . O padrão de crescimento ou decaimento de  $N_V$  nos seis grupos também foi semelhante ao descrito para  $A_N$ . Novamente, constataram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos prednisona e controle em todos os dias avaliados ( $P < 0,01$ ). Os valores médios de  $N_V$  relativos ao grupo talidomida foram significantemente menores que os do grupo controle nos dias 15 ( $P < 0,05$ ), 18 ( $P < 0,05$ ) e 21 ( $P < 0,01$ ). Ao nível de significância de 5%,  $N_V$  do grupo AAS foi menor que  $N_V$  do grupo controle nos dias 3, 12, 15, 18 e 21 ( $P < 0,01$ ). Diferenças com significância estatística entre os grupos etoricoxib e controle foram observadas nos dias 15 ( $P < 0,05$ ), 18 ( $P < 0,01$ ) e 21 ( $P < 0,01$ ). O dia 3 foi novamente o único momento em que se verificou diferença significante entre os grupos celecoxib e controle ( $P < 0,01$ ).

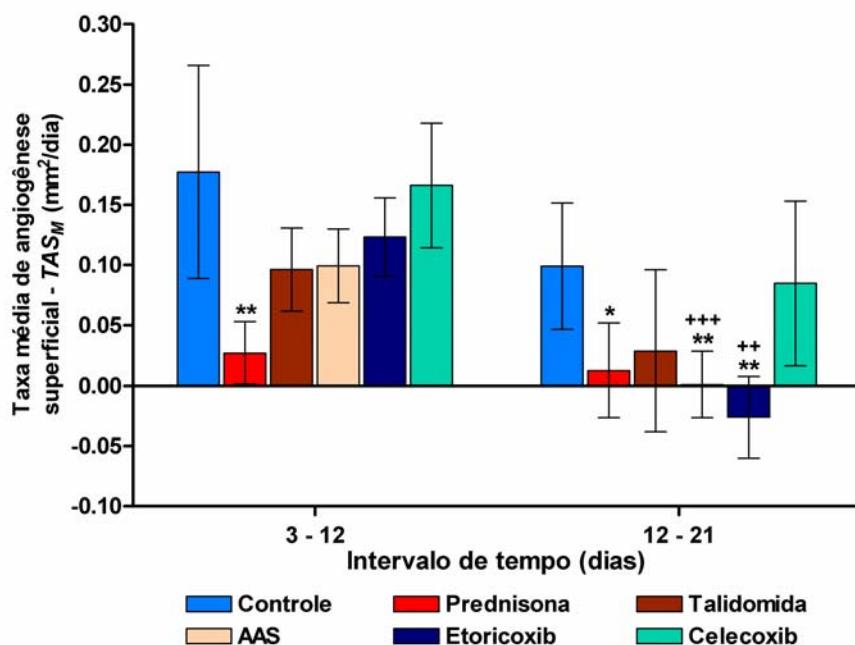


**FIGURA 96** – Quantificação da resposta angiogênica nos seis grupos de tratamento, conforme o parâmetro número de vasos sanguíneos ( $N_v$ ). Os dados correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas pelo método automático em 6 córneas dos grupos controle e AAS e em 5 córneas dos grupos prednisona, talidomida, etoricoxib e celecoxib nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização. Para comparar os seis grupos num mesmo dia, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), complementada com o teste de Dunnett, que comparou os cinco grupos experimentais com o grupo controle. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia; \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo controle no mesmo dia.

As ações dos cinco fármacos na angiogênese corneana inflamatória, conforme a quantificação realizada conjuntamente pelos parâmetros  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_v$ , podem ser assim resumidas: a prednisona inibiu a resposta angiogênica de maneira sustentada ao longo de todo o experimento; o efeito inibitório do AAS ocorreu a partir do dia 12; a talidomida e o etoricoxib inibiram a resposta neovascular a partir do dia 15; enquanto a ação inibitória do celecoxib foi pontual, sendo verificada apenas no dia 3.

A taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) foi calculada, a partir da variável  $A_N$  e conforme a Equação (3.33), para os intervalos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 (Figura 97), assim como para o período entre o 3º e o 21º dia (Figura 98). Os grupos experimentais foram então comparados com o grupo controle. No intervalo entre os dias 3 e 12, apenas a  $TAS_M$  do grupo prednisona foi显著mente menor que a do grupo controle ( $P < 0,01$ ). Por outro lado, no período entre os dias 12 e 21, verificaram-se diferenças significantes entre o grupo controle e os grupos prednisona ( $P < 0,05$ ), AAS ( $P < 0,01$ ) e etoricoxib ( $P < 0,01$ ). Comparou-se também a  $TAS_M$  referente ao intervalo entre os dias 3 e 12 com a relativa ao período entre os

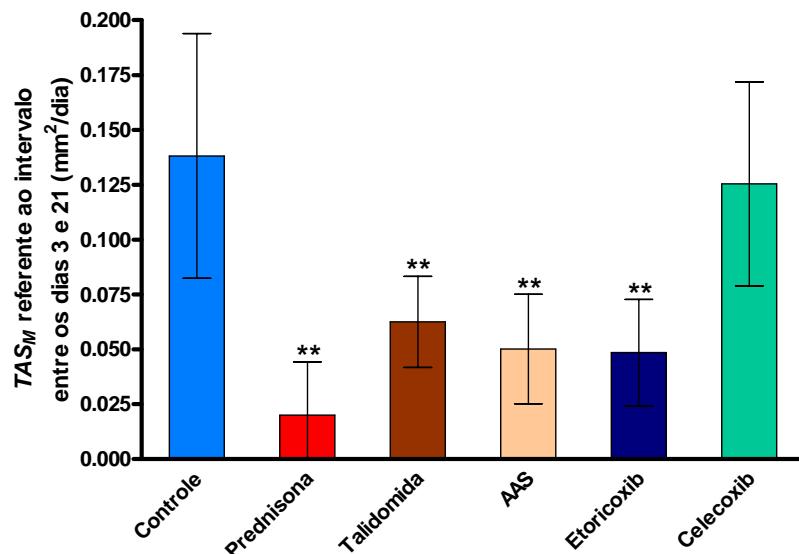
dias 12 e 21, num mesmo grupo. Houve uma redução significante da  $TAS_M$  nos grupos AAS ( $P = 0,0005$ ) e etoricoxib ( $P = 0,0019$ ). Apesar de não ter sido estatisticamente significante, ocorreu também uma diminuição marcante da  $TAS_M$  no grupo talidomida. Esses dados demonstram que, durante os primeiros 12 dias, exceto para o grupo prednisona, as taxas de crescimento vascular dos grupos experimentais foram comparáveis à do grupo controle. Contudo, entre os dias 12 e 21, a velocidade de crescimento vascular decresceu acentuadamente nos grupos AAS ( $TAS_M$  quase zero: 0,0011) e etoricoxib ( $TAS_M$  negativa: -0,0261) e menos intensamente no grupo talidomida, o que justifica o efeito inibitório desses fármacos a partir do dia 12 (Figura 97).



**FIGURA 97 –** Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao período entre os dias 3 e 12 e ao intervalo entre o 12º e 21º dia, verificada nos seis grupos de tratamento. Os dados correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas pelo método automático em 6 córneas dos grupos controle e AAS e em 5 córneas dos grupos prednisona, talidomida, etoricoxib e celecoxib. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os seis grupos num mesmo intervalo de tempo, complementada com o teste de Dunnett, que comparou os cinco grupos experimentais com o grupo controle. O teste  $t$  para variáveis emparelhadas foi usado para comparar os dados de um mesmo grupo referentes aos dois intervalos. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo controle no mesmo intervalo; \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo controle no mesmo intervalo; +++  $P = 0,0005$  comparado ao intervalo 3-12 dias.

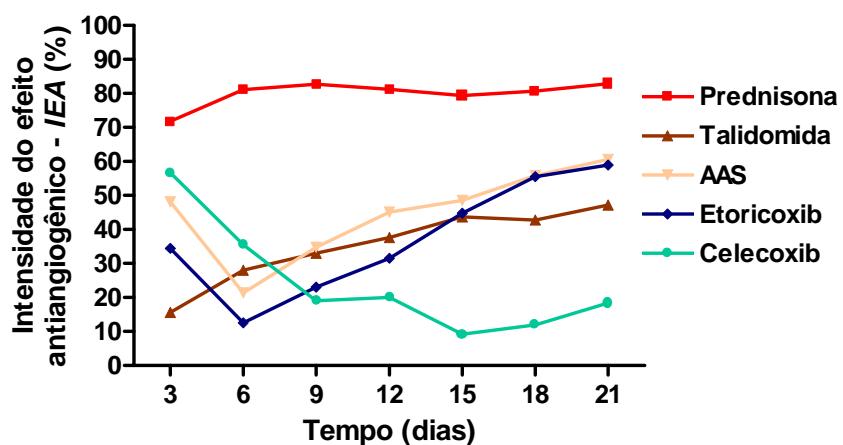
Considerando o período entre os dias 3 e 21, os valores da  $TAS_M$  para os grupos controle, prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib foram, respectivamente, iguais a  $0,1382 \pm 0,0558$ ;  $0,0200 \pm 0,0243$ ;  $0,0625 \pm 0,0208$ ;  $0,0502 \pm 0,0249$ ;  $0,0486 \pm 0,0242$  e  $0,1254 \pm 0,0465 \text{ mm}^2/\text{dia}$ . Ao nível de

significância de 5%, os valores médios da  $TAS_M$  relativos aos grupos prednisona, talidomida, AAS e etoricoxib foram menores que o referente ao grupo controle ( $P < 0,01$ ) (Figura 98). Nos grupos talidomida, AAS e etoricoxib, os baixos valores da  $TAS_M$  durante esse período foram consequência da redução do crescimento vascular, medido pela variável  $A_N$ , observada a partir do dia 12.



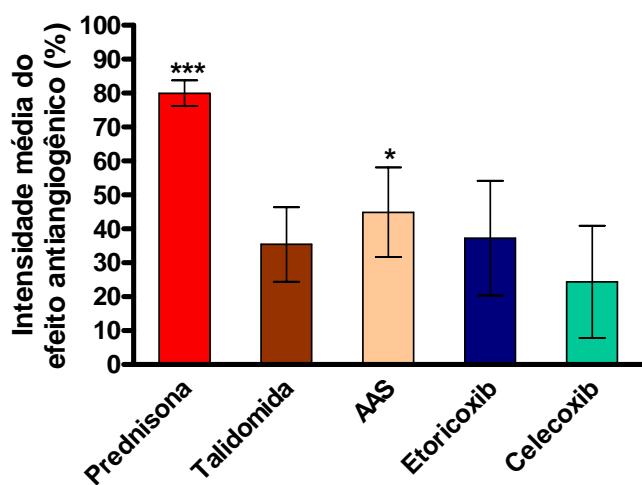
**FIGURA 98** – Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao período entre os dias 3 e 21, verificada nos seis grupos de tratamento. Os dados correspondem à média ± desvio padrão das medições efetuadas pelo método automático em 6 córneas dos grupos controle e AAS e em 5 córneas dos grupos prednisona, talidomida, etoricoxib e celecoxib. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os seis grupos num mesmo intervalo de tempo, complementada com o teste de Dunnett, que comparou os cinco grupos experimentais com o grupo controle. ANOVA:  $F = 9,1990$ ;  $P < 0,0001$ . \*\*  $P < 0,01$  comparado ao grupo controle (teste de Dunnett).

A intensidade do efeito antiangiogênico ( $IEA$ ) foi determinada para cada fármaco avaliado, conforme a Equação (3.35), nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. A Figura 99 mostra a evolução temporal da  $IEA$ . Observa-se que a  $IEA$  referente à prednisona manteve-se alta e aproximadamente constante. A  $IEA$  relativa à talidomida apresentou um padrão de crescimento ligeiramente linear. Após uma queda entre os dias 3 e 6, a  $IEA$  do AAS e etoricoxib cresceu linearmente até o dia 21. A curva da  $IEA$  relativa ao celecoxib apresentou um padrão linearmente decrescente ao longo dos dias, com um ligeiro aumento no dia 21. O crescimento linear da  $IEA$  referente à talidomida, AAS e etoricoxib durante a segunda metade do experimento explica a atividade inibitória desses fármacos observada nesse período.

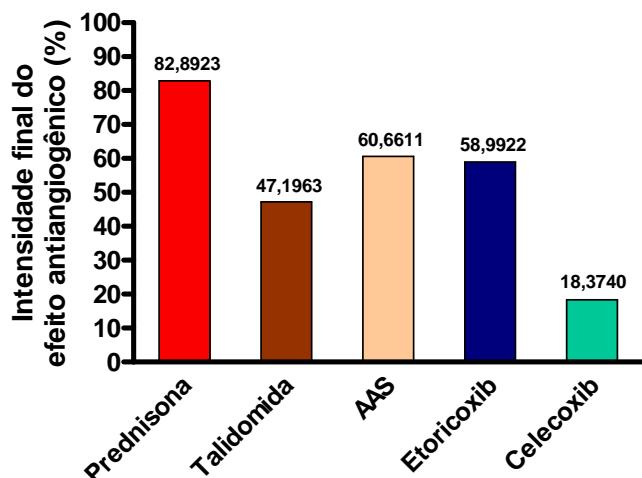


**FIGURA 99** – Intensidade do efeito antiangiogênico (*IEA*), expressa em termos percentuais, referente aos fármacos prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib, verificada nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

A intensidade média do efeito antiangiogênico (*IEA* média), ou seja, a média dos valores da *IEA*, foi  $79,9807 \pm 3,7869\%$  para a prednisona,  $35,4225 \pm 10,9459\%$  para a talidomida,  $44,9166 \pm 13,2221\%$  para o AAS,  $37,2725 \pm 16,9138\%$  para o etoricoxib e  $24,3996 \pm 16,5366\%$  para o celecoxib. A *IEA* média da prednisona foi显著mente maior que a dos demais fármacos ( $P < 0,001$ ), enquanto a *IEA* média do AAS foi显著mente maior que a do celecoxib apenas ( $P < 0,05$ ) (Figura 100). A intensidade final do efeito antiangiogênico (*IEA* final), isto é, a *IEA* medida no dia 21, foi 82,8923% para a prednisona, 47,1963% para a talidomida, 60,6611% para o AAS, 58,9922% para o etoricoxib e 18,3740% para o celecoxib (Figura 101). Comparada com a *IEA* média, a *IEA* final foi ligeiramente maior para a prednisona, consideravelmente menor para o celecoxib, consideravelmente maior para a talidomida e AAS e significativamente maior para o etoricoxib. O incremento na *IEA* final da talidomida, AAS e, mormente, do etoricoxib foi reflexo da intensificação da atividade inibitória desses agentes a partir do dia 12.



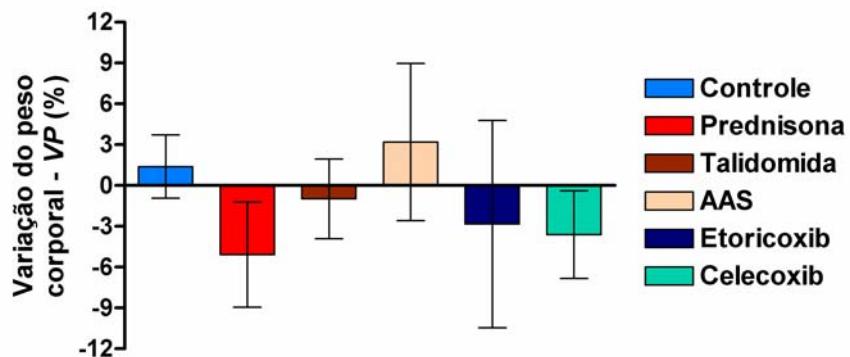
**FIGURA 100** – Intensidade média do efeito antiangiogênico (*IEA* média), expressa em termos percentuais, referente aos fármacos prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib. Os dados correspondem à média ± desvio padrão dos valores da *IEA* obtidos nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os cinco fármacos, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para verificar diferenças entre os fármacos dois a dois. ANOVA:  $F = 18,1100$ ;  $P < 0,0001$ . \*  $P < 0,05$ : AAS > celecoxib (teste de Tukey-Kramer); \*\*\*  $P < 0,001$ : prednisona maior que talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib (teste de Tukey-Kramer).



**FIGURA 101** – Intensidade final do efeito antiangiogênico (*IEA* final), expressa em termos percentuais, referente aos fármacos prednisona, talidomida, AAS, etoricoxib e celecoxib. Os dados correspondem à *IEA* verificada no dia 21.

Investigou-se ainda a influência das drogas estudadas no peso corporal mediante o cálculo da variação de peso (*VP*), conforme a Equação (3.36). Nas doses testadas, não se constatou diferença estatisticamente significante entre os seis grupos de tratamento em relação à variação de peso. Contudo, os valores médios de *VP* nos grupos controle e AAS foram positivos, denotando ganho de peso. Contrariamente, nos grupos prednisona, talidomida, etoricoxib e celecoxib os valores médios de *VP* foram negativos, significando perda de peso (Figura 102).

Individualmente, a perda de peso máxima foi de 13,2515%, observada num coelho do grupo etoricoxib, e o ganho de peso máximo foi de 13,3077%, verificado num animal do grupo AAS.



**FIGURA 102** – Variação de peso corporal (VP), expressa em termos percentuais, referente aos seis grupos de tratamento. A análise de variância (ANOVA) não detectou diferença estatisticamente significante entre os seis grupos ( $F = 2,5330$ ;  $P = 0,0538$ ).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho

Neste estudo, procurou-se estabelecer um modelo de angiogênese experimental com os seguintes atributos: fácil exequibilidade e, por conseguinte, reproduzibilidade, e que, além disso, propiciasse o monitoramento temporal da resposta neovascular, num mesmo animal, de forma não invasiva. Tal intento foi conseguido com a indução de angiogênese em córnea de coelho mediante uma cauterização pontual com NaOH 1 M. O modelo constituiu então a base para a validação do software de quantificação automática de angiogênese: o objeto maior desta tese.

O coelho da linhagem Nova Zelândia foi o animal de experimentação escolhido em virtude das características anatômicas de sua córnea. Quando comparada com a córnea de outros animais de laboratório, como rato e camundongo, a córnea de coelho tem uma dimensão bem maior, cerca de 6 mm de raio (D'AMATO *et al.*, 1994), e uma curvatura menor. A córnea maior e mais aplanada propicia um exame microscópico mais adequado, tanto da periferia como da transição córneo-escleral (BECKER *et al.*, 1998), facilitando sobremaneira o processo de quantificação da resposta angiogênica, seja por métodos manuais, seja por processamento de imagens digitais. Selecionaram-se apenas coelhos albinos, pois a ausência de pigmento na íris proporciona um melhor contraste dos neovasos contra um fundo mais claro (íris). Além disso, o coelho é um animal dócil e de fácil manipulação, mormente quando o peso varia entre 2 e 3 kg. Por outro lado, os custos de manutenção são mais altos, assim como são maiores as doses das drogas porventura testadas (ZICHE, 2001).

Para a anestesia, utilizou-se a associação de cloridrato de cetamina com cloridrato de xilazina. A combinação desses dois agentes tem a vantagem de ser administrada por via intramuscular e de induzir anestesia num nível tal que o animal mantém respiração espontânea, sem bradipnéia importante, além de proporcionar relaxamento muscular (BECKER *et al.*, 1998). Nas doses empregadas, a duração da anestesia variou entre 20 e 30 minutos, tempo mais que suficiente para a realização dos procedimentos. Entretanto, para proporcionar uma adequada anestesia da

córnea, foi necessária a instilação de duas gotas do anestésico tópico cloridrato de proximetacaína.

A cauterização alcalina da córnea constitui um modelo de inflamação e neovascularização simples, de fácil reprodução e quantificação (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). Tem sido usada para estudar o papel de leucócitos, fatores angiogênicos e mediadores da inflamação na angiogênese inflamatória (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; MOROMIZATO *et al.*, 2000; ZHENG *et al.*, 2001a; GÖTTE *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2002; ZHANG; LI; BACIU, 2002; AMBATI *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003b; POULAKI *et al.*, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005; SONODA *et al.*, 2005), bem como para avaliar o efeito anti-inflamatório e/ou antiangiogênico de drogas (CONRAD *et al.*, 1994; BENELLI *et al.*, 1998; HEPSEN; ER; ÇEKİÇ, 1999; BOCCI *et al.*, 1999; SOTOZONO *et al.*, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; KWON *et al.*, 2005). Sendo assim, tal modelo é de grande utilidade no estudo das afecções oculares que cursam com neovascularização corneana, sejam elas de natureza inflamatória, infeciosa ou traumática (CONRAD *et al.*, 1994; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001a; YOSHIDA *et al.*, 2003b; POULAKI *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2005).

A superfície ocular normal é recoberta pelos epitélios conjuntival, límbico e corneano, cada um com fenótipos celulares próprios (PARENTE *et al.*, 2002). Os três são epitélios estratificados e não queratinizados. O epitélio conjuntival contém as células caliciformes que produzem a camada mucosa do filme lacrimal. O epitélio corneano é do tipo pavimentoso estratificado, com junções intercelulares firmemente aderidas, o que lhe confere uma superfície óptica peculiar (RYMER *et al.*, 2002). O epitélio límbico corresponde à zona de transição entre os epitélios corneano e conjuntival. Nele, estão localizadas as células germinativas precursoras do epitélio corneano e, portanto, responsáveis pela sua regeneração (LEE; WANG; ADAMIS, 1998; MOROMIZATO *et al.*, 2000; PARENTE *et al.*, 2002; RYMER *et al.*, 2002; MA *et al.*, 2004). Tais epitélios são essenciais para a manutenção da integridade da superfície ocular e, por conseguinte, para uma adequada função visual.

Em condições normais, o tecido corneano é transparente e isento de vasos sanguíneos e linfáticos. Tais atributos são fundamentais para a integridade do eixo visual e estão associados a dois fenômenos. O primeiro é chamado de

“privilégio imunológico”, isto é, a resistência natural ao desenvolvimento de inflamação que é inerente à córnea (CURSIEFEN *et al.*, 2004c). Fatores moleculares, celulares e anatômicos estão envolvidos na manutenção do “privilégio imunológico” (OSAWA; MARUYAMA; STREILEIN, 2004). O segundo, chamado de “privilégio angiogênico”, em analogia ao primeiro termo, designa a resistência natural da córnea ao desenvolvimento de vasos sanguíneos e linfáticos a partir do limbo. Os mecanismos que regulam a angiogênese na córnea e que, conseqüentemente, mantêm o “privilégio angiogênico” (avascularidade corneana) são pouco conhecidos. Acredita-se, porém, que vários fatores antiangiogênicos presentes na córnea e no humor aquoso estejam envolvidos (CURSIEFEN *et al.*, 2004b). De fato, a regulação precisa da angiogênese corneana é também responsável pela manutenção do “privilégio imunológico” da córnea, além, obviamente, da sua transparência (JOUSSSEN *et al.*, 2003). Ambos os fenômenos não são, contudo, absolutos e podem ser anulados por diversas condições patológicas ou manipulações cirúrgicas da córnea (CURSIEFEN *et al.*, 2004b).

A neovascularização corneana, isto é, o crescimento de vasos sanguíneos no previamente avascular tecido corneano a partir do plexo vascular límbico (LEE; WANG; ADAMIS, 1998; KLOTZ *et al.*, 2000), é uma característica comum a diversas doenças da córnea, sejam elas de origem infecciosa, traumática, degenerativa ou inflamatória (JOUSSSEN *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2003b; POULAKI *et al.*, 2004; KWON *et al.*, 2005; USUI *et al.*, 2005). Entre as principais afecções associadas a importante neovascularização corneana citam-se: ceratite bacteriana, viral e fúngica, queimaduras químicas, rejeição de transplante de córnea, síndrome de Stevens-Johnson, penfigóide ocular, pterígio, degeneração marginal de Terrien, trauma, uso prolongado de lentes de contato (LEE; WANG; ADAMIS, 1998; ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; HOLZER *et al.*, 2003; SAMOLOV *et al.*, 2005; USUI *et al.*, 2005).

Os principais estímulos para a neovascularização corneana são: inflamação, hipóxia e destruição das células germinativas límbicas (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999). A hipóxia está associada mais comumente ao uso prolongado de lentes de contato (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; HOLZER *et al.*, 2003). A destruição ou depleção das células germinativas do limbo, por sua vez, resulta freqüentemente na “conjuntivalização” da superfície da córnea. De fato, quando a lesão da córnea não envolve a margem límbica, a reparação do defeito

epitelial é realizada pelo próprio epitélio corneano e pelo epitélio límbico adjacente, porém defeitos que resultam na destruição das células germinativas límbicas são reparados pelo epitélio conjuntival (LEE; WANG; ADAMIS, 1998). Portanto, o processo de “conjuntivalização” caracteriza-se pelo crescimento do epitélio conjuntival em direção à superfície corneana, que é então coberta por um epitélio anormal, de fenótipo conjuntival, rico em vasos e células caliciformes e de qualidade óptica inferior, levando assim a uma importante degradação visual, além de inflamação persistente (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999; MOROMIZATO *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2002; HOLZER *et al.*, 2003; JOUSSEN *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2004). Os três estímulos podem ocorrer simultaneamente como, por exemplo, no caso de uma queimadura química extensa, que pode destruir as células germinativas límbicas e causar intensa inflamação, que, por sua vez, pode produzir um microambiente hipóxico, em virtude do afluxo de grande número de células inflamatórias (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999).

Apesar de intensamente investigada, a patogênese da neovascularização corneana ainda não está totalmente compreendida (AMBATI *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003b; SAMOLOV *et al.*, 2005). Diversos mediadores e tipos celulares foram implicados. Num estudo para determinar os eventos celulares que precedem a angiogênese inflamatória em córnea murina, constatou-se que o infiltrado pré-angiogênico é composto essencialmente de granulócitos e monócitos (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991). Outro estudo demonstrou que a interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6) são produzidas numa fase precoce em córneas submetidas a queimadura alcalina e que estão associadas à infiltração de leucócitos polimorfonucleares (SOTOZONO *et al.*, 1999).

Num modelo de angiogênese inflamatória em córnea de rato, verificou-se que o VEGF produzido por leucócitos que infiltram o estroma corneano — inicialmente neutrófilos e subsequentemente monócitos/macrófagos — desempenha papel fundamental na indução e manutenção da neovascularização em córneas cauterizadas e que tanto a hipóxia como mediadores inflamatórios aumentam a expressão do VEGF na vizinhança da lesão (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). Este, por sua vez, induz a migração e proliferação da célula endotelial. De fato, o VEGF foi o primeiro mediador endógeno da neovascularização corneana a ser identificado (ADAMIS; AIELLO; D'AMATO, 1999).

Vários outros autores também enfatizaram a importância do VEGF como o estímulo principal na angiogênese corneana inflamatória (MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2001a; ZHANG; LI; BACIU, 2002; AMBATI *et al.*, 2003; JOUSSEN *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004; USUI *et al.*, 2005).

Num estudo para investigar o papel da proteína para quimiotaxia de macrófagos MCP-1 (*macrophage chemotactic protein 1*) e da citocina pró-inflamatória interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) na angiogênese inflamatória em córnea de camundongo, foi sugerido que MCP-1 — liberada pelo epitélio corneano circunvizinho ao sítio de cauterização — recruta monócitos/macrófagos do sangue periférico para a córnea, onde eles liberam IL-1 $\beta$ , que então induz a neovascularização inflamatória. Esta citocina pode aumentar a produção de potentes fatores angiogênicos, como VEGF, IL-8 e HGF, assim como proteases e moléculas de adesão. Dessa forma, tais agentes podem ser os mediadores da neovascularização corneana induzida por IL-1 $\beta$ . Além disso, IL-1 $\beta$  e MCP-1 podem induzir diretamente neovascularização corneana, independente do recrutamento de monócitos/macrófagos (YOSHIDA *et al.*, 2003b).

Kon *et al.* (2002) postularam que o óxido nítrico age como um mediador pró-angiogênico na neovascularização corneana inflamatória, promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Castro, Lutz e Edelman (2004) demonstraram que os inibidores seletivos e não seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2) bloqueavam parcialmente a angiogênese inflamatória em córnea de rato e concluíram que os produtos resultantes da ação da COX-2 estão entre os diversos mediadores que modulam a expressão do VEGF na neovascularização induzida pela inflamação.

Utilizando um modelo de angiogênese inflamatória em córnea de camundongo induzida por um fio de sutura, Cursiefen *et al.* (2004a) propuseram que o recrutamento de monócitos/macrófagos, derivados da medula óssea e que expressam VEGFR-1, pelo VEGF desempenha um papel importante na indução da neovascularização inflamatória, visto que tais células liberam fatores angiogênicos que amplificam a angiogênese patológica. Neste mesmo modelo, Samolov *et al.* (2005) mostraram que a metaloproteinase da matriz 2 (MMP-2) também está implicada na neovascularização corneana inflamatória.

Num modelo de transplante de córnea em camundongos, constatou-se que a neovascularização pós-transplante é dependente do VEGF e que a inibição desse fator aumenta a sobrevida do enxerto (CURSIEFEN *et al.*, 2004c).

Recentemente, Sonoda *et al.* (2005) postularam que células derivadas da medula óssea são recrutadas para a córnea sadia, avascular, onde realizam a depuração das escórias metabólicas, sendo, pois, essenciais para a manutenção da transparência corneana. Além disso, se a córnea sofre uma lesão, tais células respondem prontamente à agressão com a produção de várias citocinas, que então iniciam a resposta imune. Concluíram ainda que, na córnea inflamada, os neutrófilos são responsáveis pelo edema e opacificação que surgem precocemente, enquanto os macrófagos são essenciais para a indução de angiogênese corneana e para a cronicidade da inflamação.

O envolvimento de vários outros mediadores na neovascularização corneana inflamatória também foi investigado, entre os quais citam-se: FGF-2, angiogenina, prostaglandinas, IL-2, IL-8, PDGF (KWON *et al.*, 2005), C18, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) (MOROMIZATO *et al.*, 2000), ativina A (POULAKI *et al.*, 2004), integrina  $\alpha\beta_5$  (ZHANG; LI; BACIU, 2002).

Pelo exposto, nota-se a necessidade de estudos mais profundos para desvendar os mecanismos celulares e, sobretudo, moleculares envolvidos na neovascularização corneana inflamatória. Nesse sentido, os modelos de angiogênese inflamatória em córnea, seja de coelho, rato ou camundongo, são de importância capital, visto que simulam com maior realismo as situações clínicas onde a neovascularização corneana é induzida por estímulo inflamatório (CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005). Assim, nesses casos, tais modelos são preferíveis aos ensaios que utilizam a microbolsa corneana com implante de *pellets* contendo um estímulo angiogênico único, onde a resposta inflamatória é mínima (YOSHIDA *et al.*, 2003b; SAMOLOV *et al.*, 2005).

A cauterização da córnea com NaOH não é comumente usada como modelo para o estudo de angiogênese. É utilizada, mormente, para provocar uma lesão difusa do epitélio corneano e da região límbica, com a finalidade de induzir neovascularização inflamatória e, assim, reproduzir desordens oculares que cursam com insuficiência límbica e, consequentemente, com o fenômeno da “conjuntivalização” do epitélio corneano, como queimaduras alcalinas extensas (MOROMIZATO *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2002; RYMER *et al.*, 2002; JOUSSEN *et*

al., 2003). O animal utilizado geralmente é o camundongo e a técnica consiste na instilação de cerca de 2  $\mu$ l de NaOH 0,15 mM na superfície corneana, seguida da remoção do epitélio da córnea e da região límbica, onde se encontram as células germinativas (MOROMIZATO et al., 2000; JOUSSEN et al., 2001; AMBATI et al., 2003; JOUSSEN et al., 2003; POULAKI et al., 2004).

O hidróxido de sódio foi o agente químico escolhido para a realização da cauterização porque a lesão por ele provocada é de aspecto esbranquiçado, inicialmente opaca, mas que, com o passar dos dias, torna-se paulatinamente transparente (Figura 51). Muitas vezes, ao final do experimento, a transparência da lesão era semelhante à da região circunvizinha normal. Assim, à medida que os neovasos avançavam, a transparência da lesão aumentava. Isto propiciou uma adequada identificação dos neovasos e facilitou, sobremaneira, o procedimento de quantificação.

O nitrato de prata também foi avaliado e induziu angiogênese de forma até mais vigorosa que o NaOH. Entretanto, impregnava na área cauterizada, deixando-a de aspecto marrom escuro e indefinidamente opaca, de modo que os neovasos que cresciam no estroma corneano eram obscurecidos pela lesão sobrejacente, dificultando enormemente o processo de quantificação.

O papel filtro não é um instrumento de uso corriqueiro para a cauterização pontual de córneas com NaOH. Hurst et al. (1991) utilizaram uma peça de papel filtro de 6 mm de diâmetro, embebida em NaOH 1 M, para provocar uma cauterização alcalina no centro da córnea de coelhos, que eram sacrificados após 3 horas, com o objetivo de investigar, em preparações *in vitro* do tecido corneano cauterizado, a ativação da lipoxigenase em resposta à lesão. Num estudo que utilizou um modelo murino de ceratite estromal herpética, relatou-se o uso de uma peça circular de papel filtro, diâmetro de 1 mm, para cauterizar a região central da córnea com NaOH 0,5 normal, com a finalidade de comparar a expressão de VEGF no tecido corneano infectado pelo herpes vírus, lesado por queimadura alcalina ou submetido ao trauma mecânico (ZHENG et al., 2001a). Em outro modelo, desta vez para reproduzir queimaduras químicas oculares em coelhos, uma peça de papel filtro, em forma de meia-lua, com 7,5 mm de diâmetro, foi utilizada para provocar uma lesão alcalina em toda a superfície corneana, assim como no limbo (RYMER et al., 2002). Carlson et al. (2003) utilizaram uma peça de papel filtro, com 2 mm de diâmetro, para provocar uma cauterização alcalina no centro da córnea de camundongos, com o objetivo de

comparar a expressão de proteoglicanos no tecido corneano submetido a três tipos de lesão: queimadura alcalina, remoção parcial e total do epitélio.

A peça de papel filtro utilizada neste estudo, circular e com 3 mm de diâmetro, constituiu um instrumento simples, prático e eficaz para realização da cauterização pontual da córnea. Outros instrumentos, como esponja de celulose, foram também testados, porém a lesão resultante era quase sempre disforme em virtude do pouco controle sobre a ação da solução. A peça de papel filtro, no entanto, quando embebida com uma quantidade adequada de NaOH, sem excessos, provocou uma lesão uniforme, bem definida, restrita à área de contato com a córnea, não ocorrendo extravasamento do líquido (Figura 7). Além disso, trata-se de um instrumento delicado que, por si só, sem o agente alcalino, não foi capaz de causar lesão epitelial nem induzir neovascularização corneana (Figura 53).

No coelho anestesiado, após a colocação do blefarostato, o olho deslocava-se espontaneamente para baixo, expondo a metade superior da córnea e a região límbica superior (Figura 6C). Este fato determinou a escolha da periferia superior, num ponto situado às 11 horas, como local da cauterização. A distância entre o limbo e a peça de papel filtro, por sua vez, foi estabelecida em cerca de 1 mm. Tal distância proporcionou um estímulo angiogênico satisfatório, conservando, porém, uma faixa de córnea clara entre a área cauterizada e o limbo. Em distâncias acima de 2 mm, a angiogênese induzida foi insuficiente.

Quando a cauterização química da córnea é utilizada como modelo de angiogênese, a resposta inflamatória deve ter sua intensidade controlada, de modo que proveja um estímulo neovascular suficiente e, ao mesmo tempo, propicie uma adequada quantificação. Uma reação inflamatória exacerbada é, de fato, um evento indesejável, visto que a neovascularização induzida geralmente compromete um arco da córnea periférica muito extenso e a identificação dos neovasos é deveras prejudicada pelo edema e a opacificação que se instalaram. Assim, para uma correta quantificação da neovascularização, muitas vezes é necessário injetar agentes que contrastem os vasos, como tinta da Índia (PROIA *et al.*, 1988; BENELLI *et al.*, 1998; BOCCI *et al.*, 1999; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; SENNLAUB; COURTOIS; GOUreau, 1999; ZHENG *et al.*, 2001a) ou compostos fluorescentes (MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; GÖTTE *et al.*, 2002; AMBATI *et al.*, 2003; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; POULAKI *et al.*, 2004). Nesses casos, a córnea necessita ser removida, preparada e montada em lâmina (*flat-mounted*

cornea), de modo que uma única avaliação é realizada, requerendo assim um maior número de animais.

Neste estudo, pretendeu-se estabelecer um modelo de cauterização pontual, onde a neovascularização se restringisse à região do estímulo e a reação inflamatória não dificultasse a quantificação; e que, além disso, permitisse avaliações sucessivas num mesmo animal. De fato, a técnica empregada resultou em um sítio de cauterização homogêneo e bem delimitado, restrito à área de aplicação da peça de papel filtro, como relatado anteriormente, e sem comprometer a região límbica, não afetando, portanto, a população de células germinativas. Isto foi de fundamental importância para a indução de angiogênese localizada, envolvendo apenas um pequeno arco da circunferência corneana, que, por sua vez, propiciou a quantificação dos neovasos *in vivo*. O arco máximo correspondeu a um ângulo central ( $A_C$ ) de 83,62°. Comparativamente, um ângulo de 120°, portanto significativamente maior, foi observado em córneas de coelho cauterizadas com nitrato de prata/nitrato de potássio (CONRAD *et al.*, 1994). Além disso, a reação inflamatória não foi proeminente, não constituindo empecilho para a observação e quantificação dos neovasos, os quais podiam ser vistos, sem dificuldade, mesmo na região cauterizada, dispensando assim o uso de meios de contraste. Foi mais intensa no 3º dia e diminuiu progressivamente ao longo do experimento. Fato evidenciado pela restauração gradual da transparência na área da lesão e nas suas vizinhanças.

Neste modelo, o propósito principal não foi investigar os eventos celulares e moleculares envolvidos na neovascularização corneana, mas tão-somente o estudo da cinética do processo angiogênico. Assim, a angiogênese foi mensurada de acordo com cinco métodos manuais, dentre os já descritos para quantificar a resposta neovascular em córnea de coelho: comprimento vascular radial ( $C_R$ ), área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), área do setor de coroa circular ( $A_S$ ), índice angiogênico ( $I_A$ ) e ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ). Analisando os gráficos dos quantificadores  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$  (Figuras 54 a 57), pôde-se inferir que a progressão temporal da resposta angiogênica seguiu um padrão bifásico: uma fase de crescimento exponencial até por volta do dia 12, seguida de uma fase de crescimento ligeiramente linear — exceto para  $I_A$  que, a partir do dia 12, apesar de pequenas variações, não revelou uma tendência de crescimento ou decaimento, assumindo um padrão aproximadamente constante —, que perdurou até o fim do

experimento. Esse comportamento também se refletiu na taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ) (Tabela 1 e Figura 64), cujo valor no intervalo de 3 a 12 dias ( $0,1972 \pm 0,0657$  mm/dia) foi 3,38 vezes maior do aquele referente ao período entre o 12º e o 21º dia ( $0,0583 \pm 0,0627$  mm/dia;  $P = 0,0011$ ) (Figura 65). Tal padrão bifásico se correlaciona com as fases proliferativa e regressiva observadas num modelo de neovascularização inflamatória em córnea de rato (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). A primeira se caracteriza por intensa proliferação vascular (fase de proliferação). A densidade vascular é alta, observam-se inúmeros brotos e a taxa de angiogênese alcança seu valor máximo. A fase regressiva se caracteriza pela maturação vascular (fase de maturação). Os neovasos se alongam, diminuem as ramificações e a taxa de angiogênese se estabiliza.

Entretanto, o perfil temporal de  $A_C$  (Figura 58) destoou sobremaneira daquele apresentado pelos demais quantificadores. Na realidade, não se observou a fase ascendente exponencial que caracterizou as outras variáveis, refletindo o fato de, já no 3º dia, a neovascularização envolver um arco da circunferência corneana cuja extensão se aproximou da máxima alcançada. Assim, verificaram-se valores altos de  $A_C$  desde a primeira avaliação, no dia 3, sendo o máximo alcançado já no 6º dia. A partir do dia 9,  $A_C$  decaiu ligeiramente e de forma linear até o dia 18, quando se estabilizou. Esse padrão temporal é semelhante ao observado num modelo de angiogênese em córnea de camundongo, induzida por *pellets* contendo FGF-2 implantados numa microbolsa estromal (KENYON *et al.*, 1996).

A variável  $C_R$  quantifica o crescimento linear dos neovasos, na direção radial, enquanto a variável  $A_C$  corresponde ao ângulo que determina o arco da circunferência corneana envolvido pela neovascularização. Confrontando os gráficos das duas variáveis em função do tempo, observa-se que, a partir do dia 6, à medida que  $C_R$  aumentava, ocorria uma diminuição de  $A_C$ , ainda que ligeira e de forma não proporcional. Em outras palavras, à proporção que os neovasos avançavam em direção ao estímulo, observava-se um encurtamento do arco da córnea periférica envolvido pela neovascularização, que é subentendido por  $A_C$ . Certamente, isto foi reflexo da intensidade do estímulo. Os neovasos localizados nas proximidades da zona cauterizada amadureceram e se alongaram, enquanto os neovasos situados nas extremidades do arco de neovascularização tornaram-se inviáveis e regrediram.

Considerando que o mesmo fenômeno, ou seja, a angiogênese, foi mensurado por cinco diferentes métodos, que usam escalas distintas, decidiu-se

então avaliar o grau e o tipo de correlação existente entre eles, dois a dois. O intuito foi verificar se, em termos relativos, as cinco variáveis mensuraram a resposta angiogênica de forma análoga. Os dados revelaram uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante, entre  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$ , dois a dois, onde os valores do coeficiente de correlação foram acima de 0,97, denotando que essas variáveis tendem a variar conjuntamente de forma linear (Figuras 59 a 62). Isto demonstra que, apesar de constituírem medidas distintas, apresentaram um comportamento temporal similar, ou seja, o modelo proposto não leva a resultados discrepantes quando avaliado por esses quatro quantificadores. Em outras palavras,  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$  quantificaram a resposta angiogênica de forma semelhante. Por outro lado, entre  $A_C$  e as demais variáveis constatou-se também uma forte correlação, porém do tipo não linear (Figura 63). Tal achado pode ser atribuído ao comportamento temporal diferenciado de  $A_C$ , que refletiu apenas o que aconteceu na transição córneo-escleral. Assim, neste modelo, o parâmetro  $A_C$ , isoladamente, constituiu um quantificador de angiogênese de valor limitado.

Tendo em vista o relacionamento funcional entre a resposta angiogênica e o tempo, decidiu-se estabelecer um modelo matemático que permitisse mensurar a angiogênese em qualquer instante ao longo do período de observação, isto é, entre 3 e 21 dias. Escolheu-se então a variável  $C_R$  para expressar a resposta angiogênica, visto que representa uma medida direta do fenômeno em estudo, ou seja, não constitui uma estimativa. Entretanto, determinar a equação da curva que melhor se ajustou aos pontos de  $C_R$  em função do tempo ( $t$ ),  $C_R(t)$ , não foi uma tarefa fácil. Testaram-se diversas equações, muitas delas já definidas na biblioteca dos softwares utilizados. Então surgiu a idéia de utilizar uma função que assumisse um padrão exponencial, para valores pequenos de  $t$ , e um perfil linear, para valores de  $t$  maiores. Assim, a partir de sete medidas pontuais de  $C_R$ , determinou-se a função horária  $C_R(t)$ , Equação (4.1), que possibilita calcular o valor de  $C_R$ , e consequentemente quantificar a resposta angiogênica, em qualquer instante  $t$  pertencente ao intervalo [3, 21] (Figura 66). Constitui, portanto, uma representação mais fidedigna do fenômeno em estudo. Obviamente, trata-se de um modelo teórico que tem algumas limitações. Uma delas diz respeito ao domínio da função horária  $C_R(t)$ , que é restrito ao intervalo [3, 21]. Restrição necessária, visto que não foram efetuadas medições da angiogênese antes do dia 3, nem após o dia 21. Além disso, os coeficientes da Equação (4.1) são válidos apenas para este experimento e não

podem ser extrapolados para outros ensaios, em virtude da variabilidade inherente aos dados de natureza biológica. No entanto, o perfil do gráfico da função  $C_R(t)$  certamente seria mantido em experimentos repetidos.

Derivando-se  $C_R$  em relação a  $t$ , obtém-se uma função, Equação (4.2), que permite o cálculo da taxa de angiogênese radial em qualquer instante  $t$  pertencente ao intervalo [3, 21], ou seja, a taxa instantânea de angiogênese radial ( $TAR_I$ ). O gráfico de  $TAR_I$  (Figura 67) evidencia melhor, sobretudo quando confrontado com os gráficos de  $C_R(t)$  e  $TAR_M$ , o padrão bifásico assumido pela resposta angiogênica neste modelo: uma fase de proliferação, que se estendeu até o dia 12, caracterizada inicialmente por uma alta taxa de angiogênese, que decaiu ao longo dos dias, até se estabilizar por volta do dia 12; uma fase de maturação, que perdurou até o dia 21, caracterizada por uma taxa de angiogênese baixa e constante. O gráfico de  $TAR_I$  pode ainda ser interpretado do ponto de vista da intensidade do estímulo neovascular. Assim, os valores iniciais altos de  $TAR_I$  corresponderiam a uma grande quantidade do estímulo angiogênico, desencadeando então uma intensa proliferação vascular. Com o passar do tempo, contudo, o estímulo seria consumido gradualmente, de modo que a diminuição gradativa da oferta ocasionaria uma desaceleração proporcional da proliferação vascular. Por volta do dia 12, seria alcançado o ponto de equilíbrio entre o estímulo angiogênico e o crescimento vascular. Pelo exposto anteriormente, pode-se conjecturar que o estímulo neovascular seria o VEGF, certamente o principal fator angiogênico envolvido na neovascularização corneana inflamatória. Tal interpretação está em consonância com os achados de Edelman, Castro e Wen (1999), que quantificaram o VEGF em córneas de rato cauterizadas com nitrato de prata. Segundo esses autores, as concentrações de VEGF aumentaram 75 vezes nas primeiras 48 horas após a cauterização, quando comparadas com aquelas detectadas em córneas não cauterizadas (controle). Entre os dias 2 e 4, os níveis de VEGF decresceram 70% e retornaram, no 7º dia, a valores similares aos do controle. Concluíram então que a expressão de VEGF se correlacionava temporalmente com a intensidade da resposta angiogênica. Resultados semelhantes foram obtidos por Moromizato *et al.* (2000), que mediram a concentração de VEGF em córneas de camundongo cauterizadas com hidróxido de sódio, nos dias 2, 4 e 7 após a cauterização.

Os dados dos quantificadores de angiogênese demonstram que o período de observação adotado, 21 dias, foi adequado, uma vez que propiciou o acompanhamento temporal do processo angiogênico, denotado pela clara distinção entre as fases de proliferação e maturação. De fato, os períodos de observação relatados em estudos que utilizaram ensaios de angiogênese em córnea de coelho ordinariamente não extrapolaram os 21 dias: doze (D'AMATO *et al.*, 1994; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999), quinze (ZICHE *et al.*, 1994; MARCONCINI *et al.*, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 2000), dezesseis (KRUSE *et al.*, 1998), dezoito (CONRAD *et al.*, 1994), vinte (ZICHE *et al.*, 1997), vinte e um dias (BENEZRA *et al.*, 1997).

A técnica de cauterização alcalina pontual utilizada neste modelo foi capaz de induzir e manter angiogênese corneana durante todo o período de observação, como atestam os quantificadores, com uma taxa média de angiogênese radial de  $0,1278 \pm 0,0336$  mm/dia. Além disso, possibilitou o monitoramento espacial e temporal do processo angiogênico *in vivo*. Sendo assim, este ensaio requer um número menor de animais, quando comparado com estudos semelhantes, onde a córnea necessite ser removida, uma vez que permite múltiplas observações numa mesma unidade experimental.

Neste estudo, descreveu-se um modelo de angiogênese experimental onde a neovascularização é induzida pela inflamação que se instala, tratando-se, pois, de um estímulo neovascular inespecífico (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1991; KENYON *et al.*, 1996; SAMOLOV *et al.*, 2005). Difere, portanto, dos ensaios com implante de *pellets* de liberação lenta contendo um fator pró-angiogênico, onde a resposta neovascular decorre da estimulação direta pelo fator utilizado, isto é, de um estímulo específico (KENYON *et al.*, 1996; GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Assim sendo, o modelo proposto destina-se, essencialmente, à triagem de drogas com atividade antiangiogênica. Poderá ainda ser útil para investigar o papel de células e substâncias na patogênese da neovascularização corneana inflamatória.

## **5.2 Método automático de quantificação de angiogênese**

O objeto maior desta tese foi o desenvolvimento e a validação de um programa de computador específico para a segmentação e quantificação de angiogênese em imagens digitais da córnea, capturadas *in vivo* de forma

padronizada e sem o emprego de métodos invasivos para contrastar os neovasos. O sistema quantifica a angiogênese de forma rápida e objetiva através da determinação da área ocupada pelos vasos sanguíneos, área de neovascularização ( $A_N$ ), bem como de parâmetros que caracterizam a arquitetura da rede neovascular, quais sejam: comprimento vascular total ( $C_T$ ), número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ), número de pontos terminais, bifurcações e nós. Os três últimos parâmetros compõem a expressão para o cálculo de  $N_V$ , Equação (3.32).

Adicionalmente, o sistema também calcula os cinco parâmetros utilizados para a quantificação de angiogênese pelo método convencional (manual), ou seja, o comprimento vascular radial ( $C_R$ ), a área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), a área do setor de coroa circular ( $A_S$ ), o índice angiogênico ( $I_A$ ) e o ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ). Disponibiliza assim uma quantificação alternativa, caso o usuário também deseje analisar os dados fornecidos por essas variáveis.

Na literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo que descrevesse métodos para determinar, de forma automática, *in vivo*, o comprimento vascular total, o número de vasos sanguíneos, o número de terminais, bifurcações e nós em modelos de angiogênese em córnea. Rotineiramente, a quantificação da neovascularização se resume ao cálculo da sua área, geralmente após o uso de técnicas de enfatização dos neovasos.

A determinação automática da área ocupada pelos neovasos na córnea não é uma tarefa fácil, tendo em vista que a córnea é uma estrutura curva, semelhante a uma calota de esfera, e que existem fatores de confusão, como os vasos da íris subjacente, que dificultam a adequada segmentação. Sendo assim, a solução é remover e montar a córnea em lâminas, após perfusão com meios de contraste, como tinta da Índia (PROIA *et al.*, 1988; BENELLI *et al.*, 1998; BOCCI *et al.*, 1999; EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999; GU *et al.*, 1999; SENNLAUB; CURTOIS; GOUREAU, 1999; KLOTZ *et al.*, 2000; SHAN *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2003) ou compostos fluorescentes (MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; STECHSCHULTE *et al.*, 2001; GÖTTE *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2002; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; POULAKI *et al.*, 2004; USUI *et al.*, 2004; SAMOLOV *et al.*, 2005). Dessa forma, os neovasos contrastados são facilmente segmentados, calculando-se, em seguida, a área por eles ocupada.

A abordagem acima descrita implica em uma medida pontual da resposta neovascular, de modo que o monitoramento contínuo requer avaliações em animais

diferentes. CONRAD *et al.* (1994) descreveram um método interessante, porém deveras complicado, para quantificar angiogênese corneana em imagens digitais obtidas *in vivo*, permitindo assim múltiplas observações num mesmo animal. O realce dos vasos era obtido através do sistema de iluminação, que dispunha de um filtro passa-banda que selecionava uma estreita faixa de comprimento de onda de luz, centrada no pico de absorção da hemoglobina. Além disso, a profundidade de foco do microscópio era menor que a espessura corneana, proporcionando a exclusão de estruturas de confusão, como os vasos da íris. O aparato para alinhamento da córnea com o microscópio permitia movimentos no espaço, bem como rotação em torno do eixo do olho, de modo que a mesma incidência — perpendicular à córnea periférica — poderia ser obtida em observações subsequentes. Entretanto, era necessário obter fotografias a cada 15° ao longo de um arco de 120°, pelo fato de a neovascularização envolver extensão equivalente da córnea periférica. As fotografias parciais da zona de angiogênese eram posteriormente montadas para compor uma única imagem, que era então processada.

Um filtro verde (*red free*) foi utilizado, neste estudo, para aumentar o contraste dos neovasos (GIMBRONE *et al.*, 1974; PARKE *et al.*, 1988; OWEN *et al.*, 2002). Entretanto, o realce proporcionado pelo filtro verde foi atenuado pela introdução de ruído ao longo do processo de conversão analógico-digital: desde a captação pela câmera de vídeo até a digitalização pela placa de captura. Além disso, o sistema de focalização do microscópio cirúrgico não permitia a exclusão da íris subjacente. Mais ainda, a placa de captura utilizada, apesar de boa qualidade, destinava-se a aplicações domésticas, não profissionais. Apesar desses empecilhos, conseguiu-se um aumento substancial do contraste dos neovasos mediante a aplicação apropriada de técnicas de realce de imagens digitais.

O monitoramento espacial e temporal da resposta angiogênica *in vivo* pressupõe medições múltiplas da neovascularização num mesmo animal. Sendo assim, a distorção espacial decorrente da projeção da córnea, uma estrutura curva, no plano deve ser minimizada, através de um alinhamento perpendicular entre o eixo do microscópio e o plano tangente à periferia da córnea (CONRAD *et al.*, 1994; BECKER *et al.*, 1998). Além disso, deve ser mantido o mesmo enquadramento ou incidência em medições subsequentes, abrangendo toda a área de neovascularização.

Neste estudo, os requisitos acima descritos foram obtidos através de um método simples, que, inicialmente, envolveu a determinação das relações angulares entre o eixo do microscópio e o plano simultaneamente tangente à periferia da córnea e à esclera, após o estabelecimento do enquadramento ideal. A seguir, foram marcados quatro pontos na tela do monitor numa disposição tal que propiciou a obtenção da mesma incidência em medições subsequentes, mantendo-se fixa a angulação do microscópio. Além disso, no modelo de angiogênese proposto neste estudo, o arco equivalente à extensão da periferia da córnea envolvida pela neovascularização correspondeu a um ângulo central máximo de 83,62°. Isto significa que a zona de angiogênese abrangeu uma região da córnea periférica restrita e, por conseguinte, quase plana, de modo que os neovasos foram projetados no plano praticamente sem distorção espacial, tanto na direção horizontal como na vertical. Dessa forma, em termos proporcionais, a área dos neovasos projetada nas imagens bidimensionais constituiu uma medida bastante fiel da real área ocupada, na córnea, pela região de neovascularização. Portanto, um único enquadramento foi suficiente para abranger toda a área de neovascularização, sem distorção importante dos cantos. Isto dispensou o complicado procedimento de subdividir a zona de neovascularização em vários quadros, cada um correspondendo a imagens diferentes, as quais devem ser posteriormente montadas para recompor a cena original. Assim, a padronização do procedimento de aquisição das imagens foi crucial para o êxito do método automático, uma vez que possibilitou a captura de imagens da zona de neovascularização em diferentes momentos num mesmo animal, mantendo-se praticamente o mesmo enquadramento (Figuras 11, 51 e 52), o que, por sua vez, proporcionou a quantificação da evolução temporal da resposta angiogênica. Ademais, as imagens digitais da zona de neovascularização constituem uma documentação definitiva da resposta angiogênica, de modo que podem ser reutilizadas em revisões posteriores ou em estudos adicionais.

Os neovasos formam uma rede tridimensional disposta na espessura da córnea. A projeção dessa rede tridimensional numa imagem bidimensional pode ocasionar a sobreposição de alguns vasos, subestimando então a área de neovascularização. Por outro lado, durante as fases iniciais de intensa proliferação, mormente no 3º dia, observaram-se pontos de alta densidade vascular, na forma de agregados densos. A magnificação e a resolução espacial (o grau de detalhes discerníveis) das imagens foram incapazes de delinear as bordas dos vasos nesses

agregados, de modo que estas se fundiam e englobavam as pequenas áreas que as separavam, levando a uma superestimação da área e a uma inabilidade em identificar os vasos individualmente. Entretanto, esses pequenos erros no cálculo da área de neovascularização se contrabalançam, de modo que o erro final é minimizado (PROIA *et al.*, 1988).

Em imagens digitais que representam redes vasculares, um dado vaso só poderá ser identificado se o seu diâmetro estiver dentro dos limites da resolução espacial utilizada, ou seja, se for de pelo menos 1 *pixel* (CONRAD *et al.*, 1994). Sendo assim, considerando a dimensão das imagens e a magnificação utilizadas, bem como o correspondente fator de escala (38 *pixels/mm*), este sistema está apto a identificar individualmente vasos com pelo menos 0,0263 mm de diâmetro.

O sistema foi implementado de forma modular, sendo composto por cinco módulos que caracterizam fases distintas do processamento das imagens, as quais devem ser executadas de maneira seqüencial, até a obtenção do resultado final. Os módulos são: seleção da região de interesse, pré-processamento, segmentação, pós-processamento e quantificação. Contudo, para o usuário final, o sistema funciona como se fosse composto apenas por três módulos: seleção da região de interesse, segmentação e quantificação. As fases de pré e pós-processamento são ocultadas, visto que não necessitam do comando do operador para serem executadas.

O *software* foi projetado para proporcionar uma interação amigável com o usuário, minimizando a interferência do operador na execução dos processos, de maneira que mesmo aqueles usuários pouco familiarizados com processamento de imagens podem facilmente operá-lo. A interferência do operador se resume à seleção da região de interesse, que deve ser rigorosa apenas na transição córneo-escleral, excluindo assim os vasos do limbo. Opcionalmente poderá também alterar o limiar de binarização sugerido, caso julgue que a segmentação não foi a ideal.

Uma vez selecionada a região de interesse, o sistema automaticamente a recorta da imagem original, gerando uma nova imagem. Esta é então convertida em níveis de cinza. Um algoritmo seleciona, entre os canais *R* (*Red*), *G* (*Green*) e *B* (*Blue*) do sistema RGB e o componente *I* (*Intensity*) do modelo HSI, aquele que possui o melhor contraste, baseado no cálculo do desvio padrão dos níveis de cinza da imagem (SANTOS, 1995; BANON, 1998; GONZALEZ; WOODS, 2000c). Durante o processamento das imagens, o componente escolhido foi quase sempre o canal *G*

(Green) do modelo RGB. De fato, numa amostra aleatória composta por 65 imagens, o componente G do modelo RGB foi o escolhido em 93,85% das vezes. Tal escolha pode ser explicada pelo fato de, nesse componente, os níveis de cinza representarem a contribuição do verde para a cor final. A cor verde, por sua vez, aumenta o contraste dos vasos sanguíneos, razão pela qual foi utilizado um filtro verde durante a captura das imagens. Logo, seria natural que o componente G (Green) apresentasse o melhor contraste.

Neste estudo, não foi utilizada nenhuma técnica para a rotulação dos vasos sanguíneos, exceto o filtro verde. Por conseguinte, as imagens da zona de angiogênese, capturadas *in vivo*, caracterizaram-se, geralmente, pelo baixo contraste entre os neovasos e o fundo, mormente aqueles localizados mais profundamente no estroma corneano. Sendo assim, durante o desenvolvimento do sistema, o maior desafio foi, sem dúvida, melhorar a qualidade das imagens, destacando os neovasos dos componentes do fundo e, dessa forma, aumentar o desempenho do procedimento de segmentação.

Em processamento de imagens, não existe uma regra geral que estabeleça quais técnicas devem ser utilizadas, de modo que o uso de determinados procedimentos é ditado, muitas vezes de forma empírica, pelas peculiaridades do problema a ser resolvido. Assim, diversos algoritmos para o realce de imagens digitais foram implementados e testados. Muitos foram descartados por não proporcionarem bons resultados. Várias combinações desses algoritmos foram testadas. Aquela que mostrou os melhores resultados envolveu seis desses algoritmos: alargamento do contraste (expansão do histograma) (COMELLI *et al.*, 1995; GONZALEZ; WOODS, 2000c); transformação de intensificação do contraste localmente adaptativa (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999; BARMAN *et al.*, 2000); remoção do fundo (BENSEBAA; SUZIM, 2003); equalização do histograma (PINTO, 1996; GONZALEZ; WOODS, 2000c); fechamento morfológico (operação dilatação seguida da erosão) (MATTA, 1998; SCHMID, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000e); operador laplaciano da gaussiana (SANTOS, 1995; GONZALEZ; WOODS, 2000d; SOUZA, 2002; GHOSH; SARKAR; BHAUMIK, 2005). A execução em seqüência desses algoritmos definiu a fase de pré-processamento. Todos eles foram importantes para o resultado final dessa fase, porém dois foram fundamentais: o algoritmo que implementou a transformação de intensificação do contraste localmente adaptativa e o que implementou o laplaciano da gaussiana. O primeiro

promoveu um notável realce dos vasos sanguíneos em relação aos componentes do fundo, enquanto o segundo definiu os contornos e facilitou o reconhecimento desses vasos.

A segmentação é uma fase crítica em processamento de imagens, uma vez que é durante esta etapa que os objetos de interesse são extraídos para posterior análise (GONZALEZ; WOODS, 2000d; SOUZA, 2002). Neste sistema, a abordagem empregada para a segmentação automática dos neovasos foi a binarização. Assim, foram implementadas e testadas técnicas de binarização global, como o método de Otsu (OTSU, 1979; SMITH *et al.*, 2005) e a análise do histograma (SANTOS, 1995; GONZALEZ; WOODS, 2000d; FACON, 2002), além de técnicas de binarização local adaptativa, como o método de Niblack (TRIER; JAIN, 1995; TRIER; TAXT, 1995). Todavia, os melhores resultados foram obtidos com uma modificação do método de Niblack para o cálculo de um limiar global (SANTOS, 1995; PEREZ, 2001), tomando-se como base as propriedades brilho e contraste, que, por seu turno, estão associados à média e ao desvio padrão, respectivamente, dos níveis de cinza da imagem. Esse método de binarização automática mostrou-se bastante eficaz para a segmentação dos neovasos nas imagens deste estudo, distinguindo-se pela homogeneidade dos valores dos limiares gerados. De fato, em quase todas as imagens processadas, o limiar calculado foi sempre o mesmo, isto é, 8, não necessitando correção, pois a segmentação sugerida era a mais adequada, de acordo com a avaliação do operador. A exceção ocorreu para as imagens relativas ao dia 3, caracterizadas por uma área de angiogênese muito pequena, onde os limiares calculados variaram entre 6 e 8, assim como para poucas imagens capturadas com um brilho mais intenso, onde o limiar calculado foi 9.

A binarização automática torna o processo de segmentação mais objetivo, uma vez que dispensa a intervenção do operador, razão pela qual foi utilizada neste sistema. Contudo, o *software* também permite que o operador realize a binarização de maneira interativa, caso julgue que a limiarização automática não foi satisfatória. Assim, o operador poderá estabelecer um novo limiar global ou uma faixa de limiares que, à inspeção visual, determine uma correta segmentação dos neovasos. Em vários estudos, o método de binarização interativa foi utilizado para segmentar a neovascularização corneana (CONRAD *et al.*, 1994; BOCCI *et al.*, 1999; MOROMIZATO *et al.*, 2000; JOUSSEN *et al.*, 2001; AMBATI *et al.*, 2003; JOUSSEN *et al.*, 2003; POULAKI *et al.*, 2004). Entretanto, a binarização interativa é um

procedimento dependente do operador, sendo, portanto, sujeito a vieses, além de exigir do usuário um certo conhecimento de processamento de imagens e de demandar mais tempo para a sua execução.

O desempenho da segmentação depende de quão bem pré-processada foi a imagem, destacando os objetos de interesse dos demais componentes da cena (GONZALEZ; WOODS, 2000a). Neste sistema, o módulo de pré-processamento foi de importância capital para o sucesso do procedimento de segmentação. Na realidade, o desempenho conjunto das etapas de pré-processamento e segmentação pode ser considerado excelente, visto que proporcionaram o reconhecimento até mesmo daqueles neovasos obscurecidos na imagem original, em virtude de estarem localizados mais profundamente no estroma corneano.

O processo de binarização pode classificar erroneamente pequenas regiões como vasos, as quais necessitam ser removidas. Para tanto, implementou-se um algoritmo que determina as seguintes propriedades: perímetro, área, compacidade (quadrado do perímetro dividido pela área). Esta última estima a forma da região, sendo mínima para uma região circular (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999; GONZALEZ; WOODS, 2000e; SHARMA; SHARMA; SARKAR, 2005). A região mais compacta é o círculo. Logo, quanto menor o valor da compacidade mais parecida com um círculo é a região. Os critérios usados para a reclassificação dessas regiões como não vasos foram: área menor que 10 pixels ou compacidade menor que 30. Esses valores foram obtidos de forma empírica e propiciaram a remoção daquelas regiões inconsistentes, como objetos cujas formas não condiziam com as características dos vasos sanguíneos, preservando, porém, os pequenos neovasos.

A imagem resultante das fases de segmentação e pós-processamento está pronta para a análise quantitativa, pois, tratando-se de uma imagem binária, contém apenas duas características: os neovasos representados pela cor branca (*pixels* iguais a 255) e o fundo representado pela cor preta (*pixels* iguais a 0). Dessa forma, a área de neovascularização ( $A_N$ ) foi determinada pela simples contagem dos pixels iguais a 255 (branco) (GONZALEZ; WOODS, 2000e), convertendo-se, em seguida, o valor para  $\text{mm}^2$ .

A imagem binária foi então processada pelo algoritmo de esqueletização (ZHANG; SUEN, 1984; GONZALEZ; WOODS, 2000e) para a obtenção dos parâmetros da arquitetura vascular. O esqueleto da rede vascular constitui uma representação simplificada da distribuição espacial dos vasos (VICO *et al.*, 1998),

que proporciona a identificação das ramificações existentes, além de corresponder ao comprimento vascular total (PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b; WILD *et al.*, 2000). Assim, a análise do esqueleto propiciou a determinação do comprimento vascular total ( $C_T$ ), do número de pontos terminais, bifurcações e nós. O número de vasos sangüíneos ( $N_V$ ) foi calculado conforme a Equação (3.32), que combina os três últimos parâmetros. A Equação (3.32) foi estabelecida de forma empírica. Ela foi testada numa série de situações de complexidade progressiva, onde  $N_V$  era conhecido, fornecendo sempre o resultado esperado. Assim, por indução, concluiu-se que o seu uso poderia ser estendido a qualquer outra situação encontrada neste estudo. Deve-se enfatizar que a determinação de  $N_V$  pela Equação (3.32) não considera o calibre, mas unicamente a distribuição espacial dos vasos sangüíneos. Essa equação proporcionou resultados mais acurados do que a proposta por Wild *et al.* (2000) e também utilizada por Gupta *et al.* (2002), onde o número de vasos era obtido somando-se o número de terminais com o de ramificações (não importando o tipo) e dividindo-se o resultado por 2.

O uso do esqueleto da rede vascular como instrumento para quantificar a densidade vascular tem sido relatado, com certa freqüência, em outros modelos de estudo de angiogênese. Rieder, O'Drobinak e Greene (1995) descreveram um método para determinar a densidade microvascular em preparações histológicas de músculo de rato, mediante a contagem dos pontos de intersecção entre o esqueleto da rede vascular e as linhas de uma grade de quadrados sobreposta automaticamente à imagem esqueletizada. Essa mesma abordagem foi usada para mensurar a densidade vascular em ensaios de angiogênese em membrana cório-alantóidea (KIRCHNER; SCHMIDT; GRUBER, 1996; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b). Imagens esqueletizadas de redes vasculares também foram utilizadas para explicar o crescimento vascular no tecido tumoral (GAZIT *et al.*, 1995; BAISH *et al.*, 1996; BAISH; JAIN, 2000) e na membrana cório-alantóidea (KIRCHNER; SCHMIDT; GRUBER, 1996; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; VICO *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b) de acordo com conceitos de geometria fractal. Portanto, o domínio da técnica de esqueletização possibilita que, no futuro, a análise fractal venha a ser utilizada para descrever o crescimento vascular no modelo de angiogênese proposto neste estudo.

O método automático processou as imagens representativas da resposta neovascular nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização, e quantificou a angiogênese conforme os seguintes parâmetros: área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). Comparando os gráficos dessas variáveis (Figura 68, 69 e 70) entre si e com aqueles dos quantificadores manuais  $C_R$ ,  $A_T$  e  $A_S$  (Figuras 54, 55 e 56) constata-se uma grande semelhança, ou seja, um padrão bifásico, caracterizado por um crescimento exponencial até o dia 12, seguido por um perfil linear, denotando uma similaridade da evolução temporal da resposta angiogênica quando avaliada por parâmetros manuais e automáticos. Tal padrão bifásico é melhor evidenciado pela análise dos valores da taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) (Tabela 2 e Figura 71), que, diferentemente de  $TAR_M$ , representa a taxa de expansão da árvore vascular em todas as direções do tecido corneano. O valor de  $TAS_M$  relativo ao intervalo entre os dias 3 e 12 ( $0,1931 \pm 0,0677 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) foi 2,77 vezes maior que o referente ao período entre os dias 12 e 21 ( $0,0698 \pm 0,0487 \text{ mm}^2/\text{dia}; P = 0,0004$ ), correspondendo, respectivamente, às fases de proliferação e maturação. Um comportamento temporal análogo àquele apresentado pela variável  $TAR_M$ .

A área de neovascularização ( $A_N$ ) calculada pelo método automático constitui uma medida bastante fiel da real área ocupada pela zona de angiogênese na córnea, que também foi mensurada, de forma indireta, pelas variáveis manuais área do triângulo ( $A_T$ ) e área do setor de coroa circular ( $A_S$ ). No entanto, os valores de  $A_T$  e sobretudo de  $A_S$  foram expressivamente maiores que os de  $A_N$ . Isto demonstra que, neste modelo, os quantificadores manuais  $A_T$  e  $A_S$ , mormente este último, superestimaram a real área de angiogênese.

Nas avaliações iniciais, nos dias 3 e 6, em virtude da intensa proliferação vascular, observou-se, com freqüência, a formação de agregados de neovasos. O diâmetro diminuto desses neovasos não permitia que fossem individualizados nem ao exame sob visão microscópica, com aumento de 25 vezes, tampouco pela resolução espacial das imagens. Assim, nessas regiões de alta densidade vascular, o método automático foi incapaz de identificar individualmente os neovasos, de maneira que tais regiões foram tratadas como objeto único. Este fato não afetou o cálculo da área de neovascularização ( $A_N$ ), porém resultou numa provável subestimação do comprimento vascular total ( $C_T$ ) e do número de vasos sanguíneos

( $N_V$ ), considerando a magnificação e a resolução espacial utilizadas, uma vez que esses neovasos poderiam ser visibilizados caso fosse usado um aumento maior.

A determinação das funções horárias  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$ , Equações (4.3), (4.4) e (4.5), respectivamente, envolveu um procedimento análogo ao descrito para a função  $C_R(t)$ , que utilizou a análise de regressão não linear. É interessante notar a marcante semelhança entre os gráficos dessas quatro funções (Figuras 66, 73, 74 e 75). De fato, as Equações (4.2), (4.3), (4.4) e (4.5) são do mesmo tipo, mudando-se apenas os coeficientes. Além disso, o ajuste dos gráficos de  $C_R(t)$ ,  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$  aos pontos dos respectivos diagramas de dispersão foi quase perfeito, como mostram os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) correspondentes, mormente para  $A_N(t)$  e  $C_T(t)$ ,  $R^2 = 0,9999$ , razão pela qual praticamente não se vêem, nas Figuras 73 e 74, as linhas tracejadas que delimitam a região de confiança de 95%. Assim, os comentários acerca das vantagens e desvantagens da função horária  $C_R(t)$  também são válidos para  $A_N(t)$ ,  $C_T(t)$  e  $N_V(t)$ , salientando-se que essas funções proporcionam uma representação mais fidedigna do processo angiogênico, visto que permitem quantificar a resposta neovascular em qualquer instante dentro do intervalo de tempo compreendido entre os dias 3 e 21.

A derivada de  $A_N$  em relação a  $t$ , Equação (4.6), representa a taxa instantânea de angiogênese superficial ( $TAS_I$ ). O perfil do gráfico de  $TAS_I$  (Figura 76) foi semelhante ao de  $TAR_I$ , exceto por um decaimento mais pronunciado de  $TAS_I$  entre os dias 3 e 6. Os gráficos dessas duas variáveis, analisados conjuntamente, traduzem de maneira explícita o padrão bifásico da resposta angiogênica, caracterizado pelas fases de proliferação e maturação. Além disso, a variável  $TAS_I$  pode ainda ser interpretada como uma medida da intensidade do estímulo angiogênico, de forma análoga à descrita para  $TAR_I$ .

Em se tratando de uma nova proposta para a quantificação de angiogênese corneana, o método automático necessita ser avaliado no que se refere às propriedades validade e confiabilidade (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; LATOUR *et al.*, 1997; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2006). O processo de avaliação da validade compreendeu três etapas e envolveu inicialmente a determinação do grau e do tipo de correlação existente entre as variáveis automáticas  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  e cada uma das variáveis manuais  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$ ,  $I_A$  e  $A_C$ , assim como entre  $TAS_M$  e  $TAR_M$ , tendo em vista a impossibilidade da comparação direta entre os quantificadores automáticos e manuais. O propósito foi verificar se,

resguardadas as devidas diferenças de escala, as variáveis automáticas e manuais quantificaram a angiogênese de forma similar. Os resultados revelaram uma forte correlação linear positiva, estatisticamente significante, quando as variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  foram expressas em função de  $C_R$ ,  $A_T$ ,  $A_S$  e  $I_A$  (Figuras 77 a 80), assim como entre  $TAS_M$  e  $TAR_M$  (Figura 82), onde os valores do coeficiente de correlação foram acima de 0,96. Isto demonstra que as variáveis manuais e automáticas tendem a variar conjuntamente de forma linear, denotando um comportamento temporal semelhante. Em outras palavras, a quantificação da resposta angiogênica pelo método automático foi comparável àquela realizada pelo método manual. Todavia, entre a variável manual  $A_C$  e os quantificadores automáticos, verificou-se uma forte correlação, mas do tipo não linear (Figura 81), fato aceitável tendo em vista o padrão temporal peculiar de  $A_C$ . Por outro lado, as curvas de regressão obtidas a partir dos diagramas de dispersão de  $A_C$  em função dos quantificadores automáticos e dos demais parâmetros manuais foram do mesmo tipo, ou seja, um polinômio do terceiro grau. Isto denota que  $A_C$  se correlacionou, de maneira não linear, com as variáveis automáticas e com os demais quantificadores manuais de forma similar.

O método automático é, de forma simplificada, um sistema de reconhecimento de vasos sanguíneos que analisa cada *pixel* da imagem, classificando-o como integrante de um vaso ou do fundo. Assim, a segunda etapa da avaliação da validade consistiu em mensurar a acurácia com que o método automático classifica os *pixels* como pertencentes aos vasos ou ao fundo. Para tanto, a classificação realizada pelo método automático (método em teste) foi comparada com a classificação efetuada, de forma consensual, por três examinadores (método manual), considerada a prova de referência ou padrão-ouro. Entretanto, analisar visualmente (manualmente) todos os *pixels* de uma imagem de 320 x 240 *pixels* é uma tarefa extremamente tediosa e muito difícil de ser realizada, uma vez que a imagem necessita ser ampliada, ultrapassando as dimensões da tela do monitor, perdendo-se assim a noção do conjunto. Além disso, aumentaria muito a possibilidade de erros, tendo em vista a dificuldade do examinador em delimitar com precisão os vasos, especialmente as suas bordas (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 1999). Assim, optou-se por realizar o procedimento por amostragem. Foram então selecionadas aleatoriamente 50 subimagens, de tamanho 20 x 20 *pixels*, nas áreas de neovascularização das imagens originais.

Considerando que a binarização automática constitui um processo crucial para a correta segmentação dos neovasos e, por conseguinte, para a exatidão da quantificação, então era interessante verificar se o limiar calculado automaticamente pelo sistema realmente era o que mais corretamente classificava os *pixels* como pertencentes aos vasos, quando comparado com o padrão-ouro. Para tanto, o método automático foi comparado com o manual considerando não apenas a classificação baseada no limiar ( $L$ ) calculado automaticamente, mas também a classificação baseada em  $L - 1$ ,  $L - 2$ ,  $L + 1$  e  $L + 2$ . Dessa forma, realizaram-se cinco comparações, calculando-se, para cada uma, os parâmetros sensibilidade, especificidade e coeficiente de concordância *kappa* (Tabelas 3 a 12).

A sensibilidade e a especificidade são duas medidas comumente usadas para avaliar a validade de testes diagnósticos (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; LATOUR *et al.*, 1997; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2003). Uma prova diagnóstica classifica a condição que avalia em presente ou ausente em função do resultado do teste: positivo ou negativo (FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2003). Trata-se, portanto, de uma prova dicotômica. O método automático classifica os *pixels* também em duas categorias ou estados: vaso ou fundo. Por esta razão, as propriedades sensibilidade e especificidade puderam ser aplicadas com o intuito de mensurar a validade do método automático. No contexto dos testes diagnósticos, a sensibilidade é definida como a proporção de sujeitos com a doença que têm um teste positivo, isto é, a probabilidade do resultado do teste ser positivo em pessoas com a doença, enquanto a especificidade é a proporção de sujeitos sem a doença que têm um teste negativo, ou seja, a probabilidade do resultado do teste ser negativo em pessoas sem a doença (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1996; KNOTTNERUS; WEEL; MURIS, 2002; FERNÁNDEZ; DÍAZ, 2003). Neste estudo, a sensibilidade significa a probabilidade do método automático classificar como vaso os *pixels* que verdadeiramente pertençam a vasos, segundo o método manual, ou seja, a probabilidade de classificar corretamente um *pixel* integrante dos vasos. A especificidade denota a probabilidade do método automático classificar como fundo os *pixels* que realmente pertençam ao fundo, de acordo com o método manual, isto é, a probabilidade de classificar corretamente um *pixel* integrante do fundo.

Tomando-se como referência os valores da sensibilidade, especificidade e do coeficiente de concordância *kappa* referentes à classificação baseada no limiar ( $L$ ) sugerido pelo sistema, constatou-se que à medida que se diminuiu o limiar, a

sensibilidade aumentou e a especificidade e o coeficiente *kappa* diminuíram. Inversamente, à proporção que se incrementou o limiar, a sensibilidade diminuiu, a especificidade aumentou, enquanto o coeficiente *kappa* diminuiu mais ainda. Os valores da sensibilidade e especificidade relativos à classificação baseada no limiar calculado automaticamente pelo sistema representaram, pois, o meio-termo entre os cinco níveis de limiar de segmentação avaliados, ou seja, o melhor equilíbrio entre a sensibilidade e a especificidade. Ademais, o valor do coeficiente *kappa* referente ao limiar *L* foi o maior entre os cinco níveis de limiar, significando que a binarização baseada em *L* foi a que proporcionou o maior grau de concordância entre os métodos manual e automático. Esses dados indicam que o limiar calculado automaticamente pelo sistema constituiu, de fato, aquele que propiciou a mais correta classificação dos *pixels*, tomando-se como padrão-ouro a classificação manual.

Os parâmetros de avaliação da acurácia do método automático foram então estabelecidos como aqueles referentes à classificação baseada no limiar sugerido pelo sistema. Assim, a sensibilidade do método automático foi 85,32% e a especificidade 96,37% (Tabelas 3 e 4). Comparativamente, Sinthanayothin *et al.* (1999) relataram uma sensibilidade de 83,3% e uma especificidade de 91,0% para um método de identificação automática dos vasos da retina em imagens digitais do fundo do olho. Em outro estudo (SINTHANAYOTHIN *et al.*, 2002), esses mesmos autores descreveram um sistema automático para a detecção de retinopatia diabética e relataram uma sensibilidade de 88,5% e uma especificidade de 99,7% para a identificação de exsudatos, além de uma sensibilidade de 77,5% e uma especificidade de 88,7% para o reconhecimento automático de hemorragias e microaneurismas.

Os valores significativamente altos da sensibilidade e especificidade do método automático refletiram o baixo número de falso-negativos e falso-positivos, respectivamente. Contudo, a especificidade não se distanciou da sensibilidade, indicando um certo equilíbrio entre as duas propriedades e que a alta especificidade não foi obtida com prejuízo da sensibilidade ou vice-versa. De fato, a alta especificidade do método automático constituiu um atributo bastante oportuno, pois denota que o sistema raramente classifica como pertencente aos vasos um *pixel* que, na realidade, é integrante do fundo, de acordo com o padrão-ouro, ou ainda que a ocorrência de resultados falso-positivos é pequena, fator crucial para a

exatidão da quantificação. Por outro lado, deve-se salientar que, como os neovasos ocuparam um espaço na imagem menor que o referente ao fundo, o número de *pixels* integrantes do fundo foi muito maior que o de *pixels* pertencentes aos vasos, resultando numa alta proporção de verdadeiro-negativos, que certamente contribuiu para o aumento da especificidade.

Na avaliação da acurácia do método automático, o cálculo do coeficiente de concordância *kappa* foi tão importante quanto a determinação da sensibilidade e especificidade. Esse coeficiente mediu o grau de concordância entre as classificações efetuadas pelos métodos manual e automático, sendo igual a 0,8250 ( $P < 0,0001$ ), o que significa, conforme os critérios de Landis e Koch (1977), Quadro 2, uma concordância quase perfeita. A excelente concordância entre os métodos manual e automático está, certamente, associada aos expressivos valores da sensibilidade e especificidade.

A comparação do método automático com o padrão-ouro não se limitou à tarefa de classificação dos *pixels*. O grau de concordância entre os valores das variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  obtidos pelos métodos manual e automático também foi mensurado. A concordância entre duas medições de uma variável numérica é comumente avaliada pelo coeficiente de correlação intraclass (MCGRaw; WONG, 1996) ou pelo método de Bland-Altman (BLAND; ALTMAN, 1986), que proporciona uma abordagem gráfica para a análise da concordância. O coeficiente de correlação intraclass indicou, conforme os critérios enumerados no Quadro 3, uma excelente concordância para  $C_T$  e uma boa concordância para  $A_N$  e  $N_V$  (Tabela 13). À análise do gráfico de Bland-Altman (Figuras 83, 84 e 85), o grau de concordância entre as medições manuais e automáticas das variáveis  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  poderia também ser conceituado em bom, excelente e bom, respectivamente. As discordâncias de classificação entre os métodos manual e automático aconteceram, sobretudo, nos *pixels* situados nas bordas dos vasos, não comprometendo aqueles pertencentes ao eixo médio e que representam o esqueleto (Figura 46). Este fato explica a concordância mais expressiva verificada para a variável  $C_T$ , que é calculada a partir do esqueleto da árvore vascular, em comparação com aquela referente à variável  $A_N$ .

O número de vasos sangüíneos ( $N_V$ ) foi calculado de acordo com uma equação desenvolvida neste estudo, Equação (3.32), o que determinou a necessidade de validar o procedimento para o cômputo de  $N_V$ , que foi então

comparado com uma prova de referência. Um sistema-teste constituído por uma grade de quadrados (MANDARIM-DE-LACERDA, 1994) superposta à imagem esqueletizada foi a prova de referência escolhida pelo fato de ser comumente empregado para a determinação da densidade vascular (GREENE *et al.*, 1990; RIEDER; O'DROBINAK; GREENE, 1995; KIRCHNER; SCHMIDT; GRUBER, 1996; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 1998; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000a; PARSONS-WINGERTER *et al.*, 2000b). A definição das dimensões do quadrado do sistema-teste baseou-se nos valores propostos por Parsons-Wingerter *et al.* (1998). A comparação entre  $N_V$  e o número de intersecções entre os vasos esqueletizados e as linhas do sistema-teste ( $N_I$ ) deveria limitar-se à determinação do grau e do sinal da correlação linear entre essas duas variáveis, tendo em vista que quantificam o fenômeno de interesse conforme critérios diferentes. No entanto, a reta de regressão praticamente coincidiu com a linha de identidade ( $y = x$ ) (Figura 86), denotando a existência de uma concordância entre os valores de  $N_V$  e  $N_I$ . De fato, o coeficiente de correlação intraclasse indicou uma excelente concordância entre  $N_V$  e  $N_I$ . À análise do gráfico de Bland-Altman (Figura 87), pôde-se realmente constatar que os valores de  $N_I$  e  $N_V$  foram muito semelhantes.

Análises repetidas de uma mesma imagem pelo método automático proporcionariam resultados idênticos desde que a região de interesse constituísse toda a imagem e não houvesse interferência do operador em nenhuma etapa do processamento. Entretanto, o sistema requer que o usuário selecione a região de interesse, que contém a zona de angiogênese, com o intuito principal de excluir os vasos localizados no limbo, o que torna esta etapa dependente do operador. Este fato determinou a necessidade de se avaliar a confiabilidade ou reproduzibilidade do método automático, mediante a quantificação da concordância intra e interexaminadores pelo coeficiente de correlação intraclasse. Assim, três examinadores utilizaram o método automático para calcular  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  em 50 imagens em dois momentos, separados por um intervalo de trinta dias (Tabela 14 a 19). Os resultados mostraram que em apenas três casos a concordância foi classificada como boa: concordância interexaminadores no momento 1 referente à variável  $A_N$ , concordância interexaminadores no momento 1 e intra-examinador para o examinador 2, ambas referentes à variável  $N_V$ . Em todas as demais situações o grau de concordância foi excelente. É interessante notar que, para as três variáveis, o grau de concordância interexaminadores no momento 1 foi menor que o verificado

no momento 2, sugerindo um aprendizado ou um ganho de experiência na operação do *software*. Além disso, para as três variáveis, o grau de concordância intra-examinador não foi homogêneo: o referente ao examinador 3 foi maior que o do examinador 1, que, por sua vez, superou o do examinador 2. Isto foi consequência do grau de familiaridade dos examinadores em relação à operação do sistema. De fato, a experiência do examinador 3 na operação do *software* era maior que a do examinador 1, que, por seu turno, era maior que a do examinador 2. Assim, a confiabilidade do sistema automático pôde ser demonstrada, ainda que os examinadores avaliados possuíssem habilidades distintas, no que se refere à manipulação do *software*.

Um importante atributo de um *software* é a sua robustez, ou seja, a capacidade de adaptação a situações correlatas ao seu propósito original. Nesse sentido, durante o desenvolvimento deste sistema, considerou-se outras prováveis aplicações, mormente a quantificação de angiogênese em outros modelos. De fato, modificações foram feitas no sistema original para permitir a sua aplicação em três outras situações. A primeira envolveu a quantificação da neovascularização num modelo de angiogênese tumoral e requereu apenas uma calibração do procedimento para o cálculo do limiar de segmentação (Apêndice A). No referido modelo, células tumorais são implantadas na região subcutânea do dorso de ratos. Após 5 dias, o tumor é removido juntamente com um retalho de pele. A peça é preparada e imagens representando os quadrantes superior, inferior, direito e esquerdo são obtidas de forma padronizada. O sistema processou então tais imagens, segmentando e quantificando a angiogênese induzida pelo tumor, mediante a determinação da área de neovascularização, do comprimento vascular total e do número de vasos sanguíneos. Nas outras duas situações, modificações mais profundas foram efetuadas, que envolveram inclusive o uso de funções implementadas, porém não utilizadas no sistema original. Na segunda situação, o sistema foi modificado para analisar imagens de peças histológicas tratadas por técnicas de coloração, como histoquímica e imuno-histoquímica, que rotulam especificamente determinadas estruturas de interesse (Apêndice B). O *software* segmenta essas estruturas e determina a área por elas ocupada, bem como o seu percentual em relação à área total do campo estudado. Na terceira situação, o sistema modificado processou imagens ultra-sonográficas de secções transversais de nervos periféricos acometidos por hanseníase, segmentando as regiões

correspondentes a fibrose e determinando a área por elas ocupada e o seu percentual em relação à área de secção transversal do nervo (Apêndice C). Esses três exemplos demonstram as potencialidades do *software* no que diz respeito à sua aplicabilidade em outros contextos, incluindo a análise quantitativa de imagens radiológicas, oftalmológicas, histopatológicas, ultra-sonográficas, entre outras.

Atualmente, os métodos para quantificação automática de angiogênese em córneas são complexos e onerosos, baseados na mensuração da área ocupada pela neovascularização e geralmente dependem da enfatização prévia dos neovasos. Por isso, não proporcionam o monitoramento contínuo do processo angiogênico *in vivo*. O sistema automático proposto neste estudo, no entanto, é capaz de segmentar e quantificar a angiogênese corneana, de forma acurada, rápida e objetiva, em imagens adquiridas *in vivo* de maneira padronizada, proporcionando assim múltiplas avaliações num mesmo animal. Destarte, propicia o monitoramento espacial e temporal da resposta angiogênica *in vivo*. Isto só foi possível porque dispensa o uso de métodos invasivos para contrastar a neovascularização, visto que a enfatização dos neovasos é realizada pelo próprio *software*, mediante o emprego de técnicas de realce de imagens digitais. O sistema, evidentemente, tem algumas limitações, como a necessidade da seleção da região de interesse e a inabilidade para individualizar pequenos neovasos nas áreas de intensa proliferação vascular, que, por sinal, constitui uma limitação da resolução espacial utilizada durante a captura das imagens. Por outro lado, o sistema automático proporciona uma segmentação bastante acurada da real zona de angiogênese, que se reflete na exatidão da quantificação da neovascularização, possibilitando a detecção de variações temporais mínimas na resposta neovascular. Além disso, o procedimento de quantificação da resposta angiogênica não calcula apenas a área ocupada pelos neovasos, mas também determina outros quantificadores, como o comprimento vascular total, o número de vasos sanguíneos, o número de pontos terminais, bifurcações e nós. Por fim, deve-se ressaltar que os parâmetros de avaliação da validade e confiabilidade demonstraram que o sistema automático proposto constitui um método acurado e reproduzível. Ademais, o grau de acurácia e reproduzibilidade alcançado pelo sistema automático dificilmente seria atingido por algum método manual.

### **5.3 Avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático**

O modelo de angiogênese corneana inflamatória demonstrou ser um ensaio interessante para a triagem de drogas antiangiogênicas, enquanto o sistema automático provou ser um método objetivo e acurado para a quantificação da resposta neovascular *in vivo*. Assim, para ilustrar a utilidade do modelo de angiogênese e do método de quantificação propostos, desenhou-se um ensaio que avaliou o efeito do tratamento com fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho, utilizando-se o método automático para quantificar a resposta neovascular. Foram testados os seguintes fármacos: prednisona, talidomida, ácido acetilsalicílico (AAS), etoricoxib e celecoxib. Deve ser salientado que o objetivo do ensaio foi comparar os grupos experimentais com o controle através da análise da cinética da resposta angiogênica. Para tanto, o sistema automático determinou os seguintes parâmetros de quantificação de angiogênese: área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ). A partir de  $A_N$ , calcularam-se a taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) e a intensidade do efeito antiangiogênico ( $IEA$ ).

As drogas foram administradas por via oral, acondicionadas em cápsulas, utilizando-se, para tanto, um instrumento apropriado: uma cânula metálica dotada de um dispositivo para expulsar a cápsula na faringe do animal. Tal estratégia para a administração de drogas a coelhos mostrou-se prática, segura, rápida e eficaz, não sendo encontrado nenhum relato de uma abordagem semelhante na literatura consultada. Constitui, pois, uma alternativa, mais conveniente decerto, à técnica de gavagem, quando a substância em questão for, evidentemente, sólida. O procedimento de gavagem é comumente usado para administrar drogas a coelhos (D'AMATO *et al.*, 1994; KRUSE *et al.*, 1998; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHOF, *et al.*, 1999; GONZÁLEZ, 2000; MIYATAKA *et al.*, 2002), todavia causa muito estresse ao animal, exigindo, daquele que o executa, rapidez e habilidade para não introduzir inadvertidamente a sonda na árvore respiratória.

A prednisona é um glicocorticóide sintético que, após a administração oral, é convertida, no fígado, em prednisolona, que, de fato, exerce a ação biológica. A prednisona e a prednisolona têm baixa atividade mineralocorticotrófica (HAYNES, 1991). As propriedades antiangiogênicas dos glicocorticoides, cujos mecanismos

ainda não estão completamente elucidados, decorrem da ação direta na célula endotelial vascular e de efeitos indiretos, agindo em outras células com habilidade para a produção de estímulos angiogênicos. Os efeitos indiretos envolvem a inibição da migração e ativação de macrófagos, mastócitos e outros tipos celulares que produzem fatores de crescimento e outros mediadores de relevância no processo angiogênico (MURATA *et al.*, 2006). De fato, o aumento da expressão de VEGF em córneas cauterizadas com nitrato de prata foi inibido pela dexametasona em 27% e 23% nas 24 e 48 horas, respectivamente, após a cauterização (EDELMAN; CASTRO; WEN, 1999). Os efeitos diretos, por seu turno, envolvem a inibição de processos proteolíticos que promovem a degradação da membrana basal e da matriz extracelular, evento necessário para desencadear o início do processo angiogênico (BENEZRA *et al.*, 1997; JOHNSON; BRUCE, 1997; PENN *et al.*, 2001; MURATA *et al.*, 2006). Estudos mostraram que os glicocorticóides inibem o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) (BENEZRA *et al.*, 1997; PENN *et al.*, 2001), o qual é essencial para a atividade proteolítica durante a angiogênese, e que a inibição de uPA é decorrente da indução do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) (PENN *et al.*, 2001).

Neste estudo, a prednisona foi administrada na dose de 2 mg/kg por dia (HAYNES, 1991) e promoveu a inibição da resposta angiogênica, de forma plena e sustentada, durante todo o experimento. No grupo prednisona, os valores dos quantificadores  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  foram显著mente menores que os do controle ( $P < 0,01$ ) em todos os dias avaliados e se mantiveram praticamente constante ao longo do tempo (Figuras 94, 95 e 96). Isto foi reflexo de uma taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ) muito baixa ( $0,0200 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) durante o intervalo entre os dias 3 e 21, quase 7 vezes menor que a verificada no grupo controle ( $0,1382 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ), uma diferença estatisticamente significante ( $P < 0,01$ ) (Figura 98). Ademais, a  $TAS_M$  referente ao período entre os dias 3 e 12 ( $0,0272 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) e a relativa ao intervalo entre os dias 12 e 21 ( $0,0128 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) foram显著mente menores que as análogas observadas no grupo controle ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente), porém não diferiram significantemente entre si (Figura 97), mostrando que a inibição da angiogênese pela prednisona foi temporalmente homogênea, não sendo possível discriminar as fases de proliferação e maturação vasculares (Figura 89). Convém destacar que, embora a resposta inflamatória não tenha sido avaliada do ponto de vista histológico, nos animais tratados com

prednisona, à inspeção visual, os sinais de inflamação foram bem menos intensos que os observados no controle.

A intensidade média do efeito antiangiogênico (*IEA* média) relativa à prednisona foi 79,98%, enquanto a intensidade final do efeito antiangiogênico (*IEA* final), verificada no dia 21, foi igual a 82,89%. A semelhança desses valores denota, mais uma vez, a homogeneidade temporal da atividade inibitória da prednisona, como mostra o gráfico da Figura 99. Além disso, a *IEA* média referente à prednisona foi显著mente maior que a relativa aos demais fármacos ( $P < 0,001$ ) (Figura 100).

Diversos estudos demonstraram a atividade antiangiogênica dos glicocorticóides em modelos de angiogênese corneana induzida tanto pela inflamação como por fatores específicos. De fato, os glicocorticóides e as drogas antiinflamatórias não esteroidais constituem as principais abordagens farmacológicas para o tratamento da neovascularização corneana (USUI *et al.*, 2005). Nessa afecção, os glicocorticóides geralmente são administrados por via tópica, de modo que a prednisona é substituída pela prednisolona. A ação antiangiogênica da prednisolona, aplicada topicalmente, foi descrita num modelo de neovascularização corneana inflamatória, em coelhos, induzida por uma cauterização térmica (ROBIN *et al.*, 1985) e por uma cauterização com nitrato de prata (CONRAD *et al.*, 1994). A dexametasona, administrada topicalmente, inibiu parcialmente (50%) a angiogênese induzida por *pellets* contendo sulfato de cobre implantados em córnea de coelho (PARKE *et al.*, 1988). Por outro lado, Edelman, Castro e Wen (1999) relataram que a administração de dexametasona por via intraperitoneal resultava numa inibição quase completa da neovascularização corneana inflamatória em ratos, induzida pela cauterização com nitrato de prata. Num modelo semelhante, desta vez em coelhos, a aplicação tópica de dexametasona também inibiu a neovascularização corneana inflamatória (HEPSEN; ER; ÇEKIÇ, 1999). Haynes, Proia e Klintworth (1989) referiram que tanto a dexametasona como a prednisolona administradas topicalmente reduziam significantemente a neovascularização corneana inflamatória em ratos. Murata *et al.* (2006), por seu turno, demonstraram que a administração subconjuntival de triancinolona inibia a angiogênese corneana em coelhos, induzida pelo implante de *pellets* contendo FGF-2.

Os esteróides angiostáticos constituem uma nova classe de corticosteróides que inibem a angiogênese, porém exibem mínima atividade mineralocorticóide (retenção de sal) e glicocorticóide (antiinflamatória) (JOHNSON; BRUCE, 1997; PENN *et al.*, 2001). Assim, os efeitos colaterais associados à terapia com glicocorticóides, como a elevação da pressão intra-ocular, são minimizados (BENEZRA *et al.*, 1997; PENN *et al.*, 2001). A ação antiangiogênica desses agentes foi demonstrada em diversos modelos, inclusive na neovascularização corneana. O acetato de anecortave é um dos membros dessa classe. O grau de inibição da resposta angiogênica pelo acetato de anecortave, aplicado topicalmente, variou entre 76 e 100%, dependendo da dose empregada, num modelo de neovascularização corneana em coelhos, induzida pelo implante de *pellets* contendo um lipopolissacarídeo (BENEZRA *et al.*, 1997). A média desses percentuais é semelhante à inibição proporcionada pela prednisona no 21º dia deste estudo, isto é, 82,89%.

A talidomida, um derivado sintético do ácido glutâmico, é um fármaco com propriedades imunomoduladoras, antiinflamatórias, antiangiogênicas e antitumorais (BORGES; FRÖEHLICH, 2003; MACPHERSON *et al.*, 2003; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004; GASPARINI *et al.*, 2005). Foi introduzida em 1957 como sedativo e retirada do mercado em 1961 em virtude da sua teratogenicidade (KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997; BORGES; FRÖEHLICH, 2003), caracterizada por uma malformação dos membros, chamada focomelia, em recém-nascidos cujas mães fizeram uso dessa droga durante a gravidez (GONZÁLEZ, 2000; BORGES; FRÖEHLICH, 2003). Anos mais tarde, em 1994, D'Amato *et al.* (1994) postularam que a malformação decorria da inibição do crescimento vascular nos brotos dos membros em desenvolvimento, durante o período embrionário. Por outro lado, constatou-se também que a talidomida possuía propriedades imunomoduladoras e antiinflamatórias, abrindo novas perspectivas para o uso clínico desse fármaco numa variedade de condições, entre as quais: doença de Behcet, eritema nodoso leproso, doença do enxerto *versus* hospedeiro, síndrome da imunodeficiência adquirida, doença de Crohn (BORGES; FRÖEHLICH, 2003; MACPHERSON *et al.*, 2003). A diversidade de ações da talidomida inspirou a realização de pesquisas acerca do seu efeito na angiogênese (D'AMATO, *et al.*, 1994; KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997; KRUSE *et al.*, 1998; JOUSSEN; GERMANN; KIRCHHOF, 1999). Uma vez constatada a atividade antiangiogênica da

talidomida, aventou-se então o seu uso no tratamento do câncer e outras doenças dependentes de angiogênese (MACPHERSON *et al.*, 2003). No novo horizonte terapêutico da talidomida, destaca-se o seu uso em neoplasias malignas hematológicas, notadamente no mieloma múltiplo, condição em que foi demonstrado um claro benefício clínico (SINGHAL *et al.*, 1999; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004; FAYETTE; SORIA, ARMAND, 2005; GASPARINI *et al.*, 2005), seja isoladamente ou associada à dexametasona (WEBER *et al.*, 2003), apesar de efeitos adversos, como sonolência e neuropatia periférica (FAYETTE; SORIA, ARMAND, 2005; GASPARINI *et al.*, 2005). Embora com menos proeminência, a talidomida tem também atividade em tumores sólidos, tais como: sarcoma de Kaposi, carcinoma de células renais, câncer de próstata e tumores cerebrais (MACPHERSON *et al.*, 2003; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004; GASPARINI *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação da talidomida é complexo, envolve provavelmente diversos alvos moleculares e ainda não está completamente elucidado. D'Amato *et al.* (1994) foram os primeiros a relatar a atividade antiangiogênica da talidomida. Esses autores mostraram que a talidomida inibe a angiogênese corneana induzida pelo FGF-2. Posteriormente, comprovou-se que a talidomida também inibe a neovascularização corneana induzida pelo VEGF (KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997; KRUSE *et al.*, 1998). Todavia, a bioatividade da talidomida está estreitamente relacionada à sua habilidade de inibir a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), uma citocina pró-angiogênica e pró-inflamatória, por monócitos/macrófagos (BORGES; FRÖEHLICH, 2003; MACPHERSON *et al.*, 2003; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004). Além disso, é provável que a atividade da talidomida seja em parte controlada pelo fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Um dos indutores da ativação de NF- $\kappa$ B é justamente o TNF- $\alpha$ . NF- $\kappa$ B regula a expressão de vários genes envolvidos na proliferação celular, inflamação, angiogênese e inibição da apoptose. Dois dos genes regulados pela ativação de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$  expressam os fatores pró-angiogênicos VEGF e IL-8. Assim, postulou-se que a talidomida bloquearia a ativação de NF- $\kappa$ B induzida por TNF- $\alpha$  e que o seu efeito antiangiogênico resultaria da inibição de VEGF, IL-8 e outros fatores angiogênicos regulados por NF- $\kappa$ B (MACPHERSON *et al.*, 2003). A talidomida também atua na co-estimulação de linfócitos *in vitro*, aumentando a proliferação de células T, sobretudo do subconjunto CD8+, mediada pela interleucina 2 (IL-2), assim

como a produção de interferon gama (MACPHERSON *et al.*, 2003; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004). Por outro lado, aumenta a produção de IL-4 e IL-5 e inibe a expressão de interferon gama em cultura de células mononucleares do sangue periférico (KRUSE *et al.*, 1998; BORGES; FRÖEHLICH, 2003). Outros fatores pró-angiogênicos também são inibidos pela talidomida, como interleucina 6 (IL-6), um potente fator de crescimento para células malignas (MACPHERSON *et al.*, 2003). A talidomida igualmente inibe a expressão de moléculas de adesão (JOUSSEN; GERMANN; KICHHOF, 1999; ELEUTHERAKIS-PAPAIAKOVOU; BAMIAS; DIMOPOULOS, 2004).

Neste estudo, a talidomida foi administrada na dose de 200 mg/kg por dia, considerada a dose teratogênica (D'AMATO *et al.*, 1994; KRUSE *et al.*, 1998). Ainda assim, no modelo de angiogênese corneana inflamatória, a talidomida inibiu apenas parcialmente a resposta neovascular. Os valores dos quantificadores  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  cresceram até o dia 9 e mantiveram-se praticamente constante a partir desse dia. Foram sempre menores que os análogos do grupo controle, porém diferenças estatisticamente significantes só foram detectadas a partir do dia 15 (Figuras 94, 95 e 96), demonstrando que o efeito inibitório da talidomida se manifestou na segunda metade do experimento, durante a fase de maturação vascular. Este fato é melhor evidenciado pela análise do parâmetro  $TAS_M$ . O valor da  $TAS_M$  referente ao intervalo entre os dias 12 e 21 ( $0,0289 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) foi 3,32 vezes menor que o relativo ao período entre os dias 3 e 12 ( $0,0961 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ), apesar de não ter sido constatada diferença estatisticamente significante entre os valores médios da  $TAS_M$  nos dois intervalos, como também em relação aos análogos do grupo controle no mesmo intervalo (Figura 97). Contudo, a diminuição da  $TAS_M$  a partir do dia 12 proporcionou uma redução da  $TAS_M$  total, ou seja, aquela referente ao intervalo entre os dias 3 e 21 ( $0,0625 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ), cujo valor foi显著mente menor ( $P < 0,01$ ) que o verificado no grupo controle ( $0,1382 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) (Figura 98).

A  $IEA$  final referente à talidomida, verificada no dia 21, foi 47,20%, enquanto a  $IEA$  média foi igual a 35,42%, um percentual significantemente menor que o relativo à prednisona ( $P < 0,001$ ) (Figura 100), porém não foi significantemente diferente daqueles verificados nos grupos AAS, etoricoxib e celecoxib. A discrepância entre esses dois valores decorreu certamente da intensificação da atividade inibitória durante a segunda metade do experimento (Figura 99).

Outros estudos demonstraram o efeito inibitório da talidomida na angiogênese corneana induzida por fatores específicos incorporados a *pellets* de liberação lenta implantados numa microbolsa estromal. D'Amato *et al.* (1994) monitoraram a angiogênese corneana em coelhos, induzida por *pellets* contendo FGF-2, durante 12 dias e, contrariamente ao observado neste estudo, constataram uma inibição da resposta neovascular pela talidomida, em dose única diária de 200 mg/kg, a partir do 4º dia, correspondendo a apenas dois dias de tratamento. González *et al.* (2001), utilizando o mesmo modelo e a mesma dose, avaliaram a resposta neovascular durante 15 dias e verificaram que a talidomida inibia a neovascularização corneana induzida por FGF-2 apenas no 15º dia. Nesse dia, a inibição da angiogênese foi mensurada em 55%, um valor significativamente maior que o verificado, no mesmo dia, neste estudo, isto é, 43,71%. Entretanto, nos dois estudos, utilizaram-se diferentes métodos para a quantificação da resposta angiogênica: a área do setor de coroa circular no primeiro e o índice angiogênico no segundo. Kruse *et al.* (1998), por seu turno, investigaram o efeito da talidomida na neovascularização corneana induzida, em coelhos, por *pellets* contendo VEGF. Utilizaram, no entanto, uma dose de 200 mg/kg duas vezes ao dia, sendo a resposta angiogênica monitorada por um período de 16 dias. Esses pesquisadores constataram que o efeito inibitório se manifestava apenas a partir do dia 7. No dia 16, a inibição da resposta neovascular foi de 61%, superior, portanto, à observada neste estudo no 15º dia (43,71%). Joussen, Germann e Kichhof (1999) compararam o efeito da talidomida, na dose de 200 mg/kg duas vezes ao dia, na angiogênese corneana em coelhos, induzida por FGF-2 e VEGF. Verificaram que, no dia 12, a inibição era mais proeminente na neovascularização induzida por VEGF (89%) que na angiogênese induzida por FGF-2 (59%). Comparativamente, o grau de inibição da angiogênese inflamatória verificado no 12º dia deste estudo foi 37,59%. A atividade inibitória da talidomida também foi investigada num modelo murino de angiogênese corneana induzida por FGF-2 e VEGF, sendo constatada uma inibição de 43% da neovascularização induzida pelo primeiro fator e uma inibição de 37% da angiogênese induzida pelo VEGF (KENYON; BROWNE; D'AMATO, 1997). Tais percentuais são mais próximos da IEA média calculada, neste estudo, para a talidomida, isto é, 35,42%.

Resumindo, a inibição da angiogênese inflamatória proporcionada pela talidomida no modelo proposto neste estudo foi menor que aquela verificada em

modelos de neovascularização corneana induzida por fatores específicos (FGF-2 e VEGF). Certamente, isto foi consequência da multiplicidade de estímulos que é inherente à angiogênese corneana induzida pela inflamação.

A cicloxigenase catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), que constitui o precursor comum para a biossíntese dos prostanóides: prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano A<sub>2</sub> (SMITH; GARAVITO; DEWITT, 1996; THUN; HENLEY; PATRONO, 2002; ROMANO; CLÀRIA, 2003; WARNER; MITCHELL, 2004). Os prostanóides agem localmente, mediante a ativação de receptores específicos, e exercem funções tanto fisiológicas como patológicas. Identificaram-se duas isoformas da cicloxigenase, cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2), que possuem estrutura e propriedades catalíticas similares, porém diferem no que se refere à regulação da expressão e da distribuição nos tecidos (SMITH; GARAVITO; DEWITT, 1996; RIENDEAU *et al.*, 2001). Mais recentemente, identificou-se uma variante da COX-1, designada de COX-3, que é especialmente inibida pelo acetaminofeno e outras drogas analgésicas e antipiréticas (ROMANO; CLÀRIA, 2003; WARNER; MITCHELL, 2004). A COX-1 é encontrada de forma ubíqua na maioria dos tecidos, sendo responsável pela formação de prostanóides com diferentes funções fisiológicas, tais como: citoproteção gástrica, agregação plaquetária e manutenção da homeostase renal. Contrariamente, a isoforma COX-2 ordinariamente não é detectada na maioria dos tecidos, porém sua expressão pode ser rapidamente induzida por uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, promotores tumorais, hormônios e citocinas relacionadas à inflamação, de modo que tem sido associada a doenças inflamatórias e câncer (SMITH; GARAVITO; DEWITT, 1996; RIENDEAU *et al.*, 2001; LEAHY *et al.*, 2002; THUN; HENLEY; PATRONO, 2002; ROMANO; CLÀRIA, 2003). A COX-1 tornou-se então conhecida como a isoforma essencial ou constitutiva e a COX-2 como a isoforma induzida (SMITH; GARAVITO; DEWITT, 1996; HERNÁNDEZ *et al.*, 2001). Assim, a isoforma COX-1 está associada à produção fisiológica de prostanóides, enquanto a COX-2 parece ser a responsável pela síntese aumentada de prostanóides nos locais de inflamação (WARNER; MITCHELL, 2004). Os prostanóides ativam então os seus receptores específicos, desencadeando uma variedade de efeitos biológicos, que incluem a regulação da permeabilidade e tônus vasculares e da função plaquetária, assim como inflamação e indução de dor e febre (ROMANO; CLÀRIA, 2003). A atividade de ambas as

isoformas é inibida pelas drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINS) clássicas, como o ácido acetilsalicílico, ao passo que os inibidores seletivos da COX-2 inibem apenas a atividade da COX-2. Dessa forma, os efeitos antiinflamatórios das DAINS estão relacionados à inibição da COX-2 e os efeitos adversos à inibição da COX-1 (CHOY; MILAS, 2003; WARNER; MITCHELL, 2004). Esses fármacos, além das atividades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas, apresentam ainda propriedades antitumorais e antiangiogênicas (GASPARINI *et al.*, 2005).

Existem fortes evidências de que a isoforma COX-2 contribui para a carcinogênese e o crescimento tumoral. A expressão da COX-2 está aumentada desde o início do processo de carcinogênese e persiste durante o desenvolvimento tumoral (CHOY; MILAS, 2003). Prostaglandinas derivadas da COX-2 estão envolvidas na carcinogênese, supressão da resposta imunológica, inibição da apoptose, estimulação da proliferação de células tumorais, promoção de angiogênese e aumento do potencial invasivo e metastático (CHOY; MILAS, 2003; KUWANO *et al.*, 2004). As evidências acerca do envolvimento da COX-2 na carcinogênese decorrem de estudos epidemiológicos, cujos resultados sugerem que o uso regular de DAINS, AAS em especial, reduz o risco de desenvolvimento de certos cânceres, notadamente o câncer de cólon (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002; CHOY; MILAS, 2003; ROMANO; CLÀRIA, 2003), indicando um efeito quimiopreventivo (MASFERRER *et al.*, 2000; THUN; HENLEY; PATRONO, 2002); assim como de resultados obtidos em modelos experimentais, mostrando que o AAS e outras DAINS convencionais inibem a indução de câncer de cólon (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002; ROMANO; CLÀRIA, 2003). Em tais estudos, é muito provável que o efeito protetor das DAINS tenha sido consequência da inibição da COX-2. Evidências adicionais acerca da participação da COX-2 no desenvolvimento do câncer foram obtidas com o uso de inibidores seletivos da COX-2 em estudos pré-clínicos e em ensaios clínicos envolvendo pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar (THUN; HENLEY; PATRONO, 2002; CHOY; MILAS, 2003; ROMANO; CLÀRIA, 2003).

Além da carcinogênese, a COX-2 também está associada com o crescimento tumoral. Células tumorais e componentes celulares do estroma, como macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais, produzem COX-2, que, por sua vez, aumenta a produção de prostaglandinas, mais comumente prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (CHOY; MILAS, 2003). A expressão da COX-2 está aumentada numa

variedade de cânceres, incluindo câncer de cólon, estômago, esôfago, mama, pulmão e próstata (CHOY; MILAS, 2003; KUWANO *et al.*, 2004; WARNER; MITCHELL, 2004), porém tal aumento não é observado no tecido normal correspondente (FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005). Geralmente, o aumento na expressão da COX-2 está associado a um fenótipo mais maligno, caracterizado por um comportamento mais agressivo, pior prognóstico e desenvolvimento de doença metastática (CHOY; MILAS, 2003).

A contribuição mais importante da COX-2 para a promoção do crescimento tumoral é certamente a indução de angiogênese. De fato, a COX-2 está associada ao aumento da expressão de diversos fatores angiogênicos, como VEGF e FGF-2 (ROMANO; CLÀRIA, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003a; CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004; KUWANO *et al.*, 2004). Similarmente, prostaglandinas derivadas da COX-2 também estimulam a produção de fatores pró-angiogênicos, incluindo VEGF (CHOY; MILAS, 2003; ROMANO; CLÀRIA, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2003a; KUWANO *et al.*, 2004). Em vários modelos animais, a inibição seletiva da atividade da COX-2 está relacionada à redução do crescimento tumoral e da densidade microvascular (WILLIAMS *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2004; ROH *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2004), à diminuição da produção de VEGF (WILLIAMS *et al.*, 2000; WEI *et al.*, 2004) e ao aumento da apoptose (LEAHY *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2004). Demonstrou-se ainda que a angiogênese e o crescimento tumorais eram reduzidos显著mente por inibidores não seletivos da cicloxigenase, por inibidores seletivos da COX-2, assim como pela neutralização do VEGF com anticorpo específico, porém o tratamento com um inibidor seletivo da COX-1 não resultava em nenhum efeito significante. Tais achados sugerem então que a via COX-2/VEGF está associada à promoção da angiogênese e do crescimento tumorais (YOSHIDA *et al.*, 2003a). Portanto, as propriedades antitumorais dos inibidores da COX-2 podem ser atribuídas à inibição da angiogênese mediada pela PGE<sub>2</sub> e VEGF, embora a COX-2 possa também ter algum envolvimento na migração e sobrevida da célula endotelial, na permeabilidade vascular e na supressão da resposta imunológica (FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005). Os resultados positivos obtidos nos estudos pré-clínicos estimularam, por conseguinte, a realização de vários ensaios clínicos para avaliar a eficácia dos inibidores seletivos da COX-2 como fármacos antitumorais, mormente em

combinação com outros agentes (FAYETTE; SORIA; ARMAND, 2005; GASPARINI *et al.*, 2005).

Evidências diretas de que a COX-2 estimula a angiogênese foram obtidas em modelos de angiogênese corneana induzida por um fator específico. Masferrer *et al.* (2000) mostraram que a angiogênese induzida por *pellets* de liberação lenta contendo FGF-2, implantados na córnea de ratos, era bloqueada por inibidores não seletivos da cicloxigenase (indometacina) e por inibidores seletivos da COX-2 (celecoxib), porém tal efeito não era observado com o tratamento com inibidores seletivos da COX-1 (SC-560). Tal resultado demonstra que a angiogênese corneana induzida por FGF-2 é dependente da atividade da COX-2. Além disso, constataram a presença da COX-2 em células que infiltravam o estroma corneano, como fibroblastos e macrófagos, e nas células endoteliais dos vasos neoformados. Contudo, observaram que as células endoteliais dos vasos límbicos expressavam a outra isoforma, a COX-1. Leahy *et al.* (2002), por seu turno, utilizando este mesmo modelo, verificaram um aumento da expressão da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) nas córneas que receberam o implante, em comparação com os respectivos níveis mensurados em córneas normais. Além disso, relataram que o celecoxib inibia a resposta angiogênica em 78,6%, reduzia a produção de PGE<sub>2</sub> em 78% e a de TXB<sub>2</sub> em 68% e induzia a apoptose da célula endotelial nos neovasos. Concluíram então que a inibição da produção de prostaglandinas derivadas da COX-2 estava estreitamente associada com a inibição da angiogênese corneana.

O envolvimento da COX-2 na neovascularização corneana inflamatória também foi avaliado. Yamada *et al.* (1999) mostraram que a indometacina e NS-398, um inibidor seletivo da COX-2, aplicados topicalmente, inibiam parcialmente a neovascularização corneana inflamatória em ratos. Observaram ainda um aumento na síntese de PGE<sub>2</sub> nas córneas cauterizadas, que era inibido, de maneira similar, tanto pela indometacina como por NS-398. Sugeriram então que a expressão da COX-2 na córnea cauterizada aumenta a produção de prostanóides, resultando assim na indução de angiogênese corneana. Castro, Lutz e Edelman (2004), por seu turno, relataram que a indometacina e NS-398 inibiam, também de maneira parcial, a neovascularização corneana inflamatória em ratos, porém tal efeito não era observado com o uso de SC-560, um inibidor seletivo da COX-1. Além disso, a indometacina e NS-398, mas não SC-560, reduziam parcialmente o aumento dos níveis de VEGF, que é observado em córneas cauterizadas. Postularam então que a

inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> mediada pela COX-2, e do subsequente aumento da produção de VEGF, constitui um possível mecanismo através do qual os inibidores da cicloxigenase parcialmente bloqueiam a neovascularização corneana inflamatória.

Assim, tendo em vista o envolvimento da COX-2 na neovascularização corneana, através da via COX-2/PGE<sub>2</sub>/VEGF (CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004), avaliou-se então o efeito de um inibidor não seletivo da cicloxigenase, ácido acetilsalicílico (AAS), e de dois inibidores seletivos da COX-2, etoricoxib e celecoxib, no modelo de angiogênese inflamatória proposto neste estudo.

O AAS, na dose de 100 mg/kg por dia (MIYATAKA *et al.*, 2002), dentre os três inibidores da cicloxigenase avaliados, foi o que mais consistentemente inibiu a resposta angiogênica. Na verdade, o seu desempenho só foi inferior ao da prednisona. Os quantificadores  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  ascenderam até o dia 9, o máximo alcançado, diminuíram ligeiramente no dia 12 e assim se mantiveram até o dia 21 (Figuras 94, 95 e 96). Os valores médios das três variáveis foram significantemente menores que os mensurados no grupo controle nos dias 3, 12, 15, 18 e 21 ( $P < 0,01$ ). Tais achados mostram que o efeito inibitório do AAS se manifestou a partir do dia 12, na fase de maturação vascular, embora uma inibição significante tenha também sido verificada na avaliação inicial, no dia 3. A análise do parâmetro  $TAS_M$  evidencia melhor este comportamento. No período entre os dias 3 e 21, o valor da  $TAS_M$  (0,0502 mm<sup>2</sup>/dia) foi显著mente menor ( $P < 0,01$ ) que o verificado no grupo controle (0,1382 mm<sup>2</sup>/dia) (Figura 98), porém isto decorreu, mormente, da inibição do crescimento vascular observada a partir do dia 12. De fato, a  $TAS_M$  referente ao intervalo entre os dias 12 e 21 foi quase zero (0,0011 mm<sup>2</sup>/dia), um valor significantemente menor ( $P < 0,01$ ) que o mensurado no grupo controle nesse mesmo intervalo (0,0990 mm<sup>2</sup>/dia) e muito menor ( $P = 0,0005$ ) que o seu análogo relativo ao intervalo entre os dias 3 e 12 (0,0992 mm<sup>2</sup>/dia), que, por sinal, não foi significantemente diferente daquele observado no grupo controle (0,1773 mm<sup>2</sup>/dia) (Figura 97). A intensificação da atividade inibitória na segunda metade do experimento (Figura 99) resultou numa diferença acentuada entre a  $IEA$  final, medida no dia 21, que foi igual a 60,66% e a  $IEA$  média, cujo valor foi 44,92%. Todavia, tais percentuais só foram superados por aqueles concernentes à prednisona. A  $IEA$  média foi significantemente menor que a relativa à prednisona ( $P < 0,001$ ) e significantemente maior que a referente ao celecoxib ( $P < 0,05$ ), porém

não foi significantemente diferente daquelas verificadas nos grupos talidomida e etoricoxib (Figura 100).

A inibição da neovascularização corneana inflamatória por um inibidor não seletivo da cicloxigenase, demonstrada neste estudo, confirma os resultados obtidos por outros autores. Robin *et al.* (1985) relataram que os inibidores não seletivos da cicloxigenase indometacina e flurbiprofeno, aplicados topicalmente, inibiam, de maneira similar, a neovascularização corneana em coelhos, induzida por uma cauterização térmica. Esses dois fármacos, ambos aplicados topicalmente, também inibiram显著mente a neovascularização corneana inflamatória em ratos, induzida pela cauterização com nitrato de prata, porém o efeito inibitório foi inferior ao proporcionado pela dexametasona (HAYNES; PROIA; KLINTWORTH, 1989). Yamada *et al.* (1999), por seu turno, avaliaram o efeito da aplicação tópica de indometacina na neovascularização corneana inflamatória em ratos e referiram uma inibição de 36,4%. Por outro lado, quando administrada por via oral, a indometacina inibiu a resposta neovascular em 68%, também num modelo de neovascularização corneana inflamatória em ratos (CASTRO; LUTZ; EDELMAN, 2004). Tal percentual é semelhante ao calculado, neste estudo, para o AAS no dia 21, isto é, 60,66%.

O etoricoxib, na dose oral de 20 mg/kg por dia (RIENDEAU *et al.*, 2001; WHITESIDE *et al.*, 2004), também inibiu parcialmente a angiogênese inflamatória no modelo descrito neste estudo. O seu efeito inibitório foi comparável ao do AAS, embora tenha se manifestado mais tarde. Os quantificadores  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  ascenderam exponencialmente até o dia 9, porém, a partir do dia 12, verificou-se um decaimento quase linear que perdurou até o dia 18, estabilizando-se em seguida (Figuras 94, 95 e 96). Nos dias 15, 18 e 21, os valores médios desses parâmetros equipararam-se àqueles referentes ao AAS e, por conseguinte, foram significantemente menores que os mensurados no grupo controle. A marcante inibição da resposta neovascular proporcionada pelo etoricoxib a partir do dia 15 é melhor evidenciada pela apreciação do parâmetro  $TAS_M$ . No intervalo entre os dias 12 e 21, o valor da  $TAS_M$  foi negativo, denotando, pois, uma contração da área correspondente à zona de neovascularização, ou seja, o valor de  $A_N$  referente ao dia 21 foi menor que o relativo ao dia 12. Na realidade, esse fenômeno só foi observado no grupo etoricoxib. Obviamente, o valor da  $TAS_M$  referente ao intervalo entre os dias 12 e 21 (-0,0261 mm<sup>2</sup>/dia) foi significantemente menor ( $P < 0,01$ ) que o mensurado no grupo controle nesse mesmo intervalo (0,0990 mm<sup>2</sup>/dia) e muito

menor ( $P = 0,0019$ ) que o seu análogo relativo ao período entre os dias 3 e 12 ( $0,1232 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ), que, por sua vez, não foi significantemente diferente daquele observado no grupo controle nesse período ( $0,1773 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) (Figura 97). Tal comportamento resultou igualmente numa diminuição da  $TAS_M$  total, isto é, a referente ao intervalo entre os dias 3 e 21, cujo valor ( $0,0486 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) foi significantemente menor ( $P < 0,01$ ) que o observado no grupo controle ( $0,1382 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) e, na verdade, só não foi menor que o concernente à prednisona ( $0,0200 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) (Figura 98). Em decorrência da intensificação da atividade inibitória a partir do dia 12 (Figura 99), observou-se também uma grande discrepância entre a  $IEA$  final, mensurada no dia 21, cujo valor foi 58,99%, e a  $IEA$  média, que foi igual a 37,27%, um percentual significantemente menor que o referente à prednisona ( $P < 0,001$ ) (Figura 100). Contudo, tais percentuais, apesar de inferiores àqueles referentes ao AAS, foram melhores que os relativos à talidomida. Este talvez seja o primeiro relato acerca da inibição, ainda que parcial, da neovascularização corneana inflamatória pelo etoricoxib, uma vez que, na literatura consultada, não foi encontrado nenhum estudo que associasse etoricoxib à córnea ou mesmo etoricoxib à angiogênese.

Por outro lado, o tratamento com celecoxib, na dose oral de 70 mg/kg por dia, não inibiu a angiogênese inflamatória no modelo proposto neste estudo. A dose empregada foi duas vezes maior que a utilizada para inibir a neovascularização corneana induzida pelo FGF-2 em ratos, como também a angiogênese tumoral em camundongos (MASFERRER *et al.*, 2000; LEAHY *et al.*, 2002), ainda que a dose total tenha sido dividida em duas tomadas diárias por via oral. A evolução temporal dos quantificadores  $A_N$ ,  $C_T$  e  $N_V$  foi semelhante à do controle, embora com uma amplitude menor, de modo que diferença com significância estatística foi detectada apenas no dia 3 (Figuras 94, 95 e 96). Dessa forma, a  $TAS_M$  total relativa ao celecoxib ( $0,1254 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) foi a única que não foi significantemente diferente daquela referente ao grupo controle ( $0,1382 \text{ mm}^2/\text{dia}$ ) (Figura 98). Além disso, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre a  $TAS_M$  referente ao intervalo entre os dias 3 e 12 e a relativa ao período entre os dias 12 e 21, assim como em relação aos seus respectivos controles no mesmo intervalo (Figura 97). A ação inibitória verificada apenas no 3º dia (Figura 99) provocou uma inversão entre os valores da  $IEA$  média (24,40%) e da  $IEA$  final (18,37%), divergindo do padrão apresentado pelos demais fármacos, onde o primeiro percentual foi sempre menor

que o segundo. Tais percentuais foram, obviamente, os piores entre os cinco fármacos avaliados. De fato, a IEA média, além de significantemente menor que a relativa à prednisona ( $P < 0,001$ ), foi também significantemente menor que a referente ao AAS ( $P < 0,05$ ) (Figura 100).

A incapacidade do celecoxib em inibir a neovascularização corneana inflamatória neste modelo foi realmente surpreendente, visto que diversos estudos demonstraram a habilidade desse fármaco em reduzir o crescimento tumoral e a densidade microvascular (WILLIAMS *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2004; ROH *et al.*, 2004; WEI *et al.*, 2004), assim como em inibir a angiogênese corneana induzida por *pellets* contendo FGF-2 (MASFERRER *et al.*, 2000; LEAHY *et al.*, 2002).

Apesar do desempenho insatisfatório do celecoxib, o êxito do etoricoxib em inibir a angiogênese corneana inflamatória corrobora os achados de outros estudos que avaliaram o efeito de inibidores seletivos da COX-2 na neovascularização corneana. Yamada *et al.* (1999) estudaram o efeito de NS-398, um inibidor seletivo da COX-2, aplicado topicalmente, na neovascularização corneana inflamatória em ratos e constataram uma inibição de 38,5%. Castro, Lutz e Edelman (2004) também avaliaram o efeito de NS-398 na angiogênese corneana inflamatória em ratos, induzida pela cauterização com nitrato de prata, e verificaram uma inibição de 50%, quando administrado por via subcutânea, e uma inibição de 54%, após a administração intraperitoneal. Um percentual semelhante ao verificado, neste estudo, para o etoricoxib no dia 21, isto é, 58,99%. Num modelo de angiogênese induzida pela interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), uma citocina inflamatória, incorporada a *pellets* implantados na córnea de camundongos, constatou-se que tanto JTE-522 como DFU, ambos inibidores seletivos da COX-2, administrados por via oral, inibiam significantemente a resposta angiogênica (KUWANO *et al.*, 2004).

A inibição parcial da angiogênese corneana proporcionada pelo AAS e etoricoxib neste modelo demonstra que a via COX-2/VEGF constitui apenas um dos mecanismos para a indução da neovascularização corneana inflamatória, cuja inibição não é suficiente para sustar o processo angiogênico em sua plenitude.

Os coelhos foram pesados no dia anterior à realização da cauterização e, subsequentemente, nos dias 7, 14 e 21. O intuito foi reajustar as doses dos fármacos nos dias 7 e 14, bem como calcular a variação de peso (VP), conforme a Equação (3.36), a partir das medições efetuadas no dia que antecedeu a

cauterização e no 21º dia do experimento. A determinação de VP permitiu avaliar, ainda que indiretamente, a ocorrência de efeitos tóxicos que interferem no peso corporal, como, por exemplo, alterações da mucosa intestinal. Nas doses testadas, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores médios de VP relativos aos seis grupos de tratamento (Figura 102), indicando que a administração oral dos fármacos foi bem tolerada. Além disso, não foram observados efeitos adversos como inapetência, vômitos, diarréia ou sedação aparente.

Por fim, as ações dos cinco fármacos no modelo de angiogênese corneana inflamatória descrito neste estudo, as quais foram quantificadas pelo sistema automático, podem ser assim resumidas: a prednisona inibiu plenamente a resposta angiogênica ao longo de todo o período de observação, proporcionando uma IEA final, mensurada no dia 21, de 82,89%; a talidomida, AAS e etoricoxib inibiram parcialmente a angiogênese inflamatória neste modelo, notadamente a partir da segunda metade do experimento, resultando numa IEA final de 47,20%, 60,66% e 58,99%, respectivamente; enquanto o celecoxib não inibiu de maneira consistente a resposta neovascular neste modelo, fato evidenciado pela baixa IEA final, isto é, 18,37%. Tais dados demonstram que o modelo de angiogênese corneana inflamatória é sensível à atividade antiangiogênica de fármacos, respondendo com variações temporais da resposta neovascular, as quais são devidamente identificadas e mensuradas pelo sistema automático, que provê, portanto, uma análise quantitativa do efeito inibitório.

#### **5.4 Considerações finais**

Esta tese compreendeu três etapas. Na primeira, desenvolveu-se um modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho induzida por uma cauterização alcalina pontual, cujos atributos principais são a simplicidade, a reproducibilidade e o baixo custo, embora os gastos não tenham sido formalmente avaliados. O modelo notabiliza-se ainda pela indução e manutenção de angiogênese corneana localizada, que propicia avaliações múltiplas e facilita o procedimento de quantificação da resposta neovascular. Além disso, como a angiogênese é induzida pela inflamação, tratando-se, pois, de um estímulo neovascular inespecífico, o modelo permite simular com maior realismo aquelas situações clínicas que evoluem

com neovascularização corneana inflamatória. Destarte, a principal finalidade do modelo proposto é a triagem de drogas antiangiogênicas. Alternativamente, porém, poderá ser de grande valia na investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neovascularização corneana inflamatória, assim como na avaliação do potencial terapêutico de fármacos nessa afecção. Ademais, constituiu a base para a validação do método automático.

A segunda etapa envolveu o desenvolvimento e a validação de um programa de computador para a quantificação automática de angiogênese corneana, que constituiu, de fato, o principal objetivo deste estudo. Alguns atributos são peculiares ao sistema automático proposto, os quais determinam a sua relevância. Trata-se de um *software* de fácil operação que processa imagens digitais obtidas, de forma padronizada, *in vivo*, efetuando uma análise quantitativa da resposta angiogênica. Dispensa, pois, o uso de procedimentos invasivos ou de aparatos ópticos sofisticados para promover o contraste da neovascularização, uma vez que o realce dos neovasos é obtido através de técnicas de processamento de imagens digitais. Dessa forma, permite avaliações múltiplas num mesmo animal, possibilitando, por conseguinte, o monitoramento espacial e temporal da resposta angiogênica *in vivo*. Para tanto, quantifica a angiogênese, de forma rápida e objetiva, mediante a determinação de diversos parâmetros que, além da área ocupada pelos neovasos, avaliam também a arquitetura da árvore vascular. Ademais, o sistema automático constitui um método de quantificação de angiogênese acurado e reproduzível, conforme demonstram os parâmetros de avaliação da validade e confiabilidade, cujos valores dificilmente seriam alcançados por algum método manual.

Outra característica relevante do *software* desenvolvido é a sua robustez. Assim, foram efetuadas modificações que possibilitaram o seu uso em três outras situações: quantificação de angiogênese tumoral, análise histomorfométrica e avaliação do grau de comprometimento neural por fibrose em imagens ultrasonográficas de nervos periféricos. Tais adaptações foram, no entanto, apenas as primeiras. Outras certamente serão implementadas, visto que a robustez do sistema permite a sua aplicação, após as devidas modificações, numa diversidade de situações, que incluem o processamento de imagens histológicas, radiológicas, oftalmológicas, ultra-sonográficas, assim como imagens relativas a outros modelos de angiogênese.

Na terceira e última etapa, utilizou-se o método automático para quantificar as variações na resposta neovascular num ensaio que avaliou o efeito de cinco fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória. Os resultados mostraram que o modelo de angiogênese corneana inflamatória é sensível à ação de drogas antiangiogênicas e que o método automático é capaz de quantificar as variações temporais da resposta neovascular nos diversos grupos de tratamento e, por conseguinte, identificar as diferenças na intensidade do efeito antiangiogênico entre os vários tratamentos nos diferentes momentos avaliados. Tal capacidade discriminatória é ilustrada pela detecção de diferenças no grau de inibição da resposta angiogênica proporcionado pelos diversos fármacos testados, que variou de inibição plena (prednisona), passando por parcial (talidomida, ácido acetilsalicílico, etoricoxib), até ausência de inibição (celecoxib).

Por fim, após essas considerações, pode-se afirmar então que o valor do modelo de angiogênese corneana inflamatória como ensaio para avaliação do potencial antiangiogênico de fármacos e a relevância do sistema automático como método para análise quantitativa de angiogênese estão claramente demonstrados.

## 6 CONCLUSÃO

O sistema automático desenvolvido constitui um método de quantificação de angiogênese corneana acurado e reproduzível, que propicia o monitoramento espacial e temporal da resposta angiogênica *in vivo*.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADAMIS, A. P.; AIELLO, L. P.; D'AMATO, R. A. Angiogenesis and ophthalmic disease. **Angiogenesis**, v. 3, n. 1, p. 9-14, 1999.
- ALBUQUERQUE, M. P.; ALBUQUERQUE, M. P. **Processamento de imagens:** métodos e análises. Disponível em: <<http://www.cbpf.br/cat/download/publicacoes/pdf/ProcessamentoImagens.PDF>>. Acesso em: 29 mar. 2003.
- AMBATTI, B. K.; ANAND, A.; JOUSSEN, A. M.; KUZIEL, W. A.; ADAMIS, A. P.; AMBATTI, J. Sustained inhibition of corneal neovascularization by genetic ablation of CCR5. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, n. 2, p. 590-593, 2003.
- ANDRADE, M. C. **Imageamento microscópico**. 1993. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- ANDRADE, S. P. Sponge implant model of angiogenesis. In: MURRAY, J. C. (Ed.). **Angiogenesis protocols**. Totowa: Humana Press, 2001. cap. 6, p. 77-86.
- ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994. 620 p.
- ARORA, A.; SCHOLAR, E. M. Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 315, n. 3, p. 971-979, 2005.
- AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis assays: a critical overview. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 32-40, 2003.
- AVERY, R. L.; PIERAMICI, D. J.; RABENA, M. D.; CASTELLARIN, A. A.; NASIR, M. A.; GIUST, M. J. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. **Ophthalmology**, v. 113, p. 363-372, 2006.
- BAE, K. T.; GIGER, M. L.; CHEN, C. T.; KAHN, C. E. Automatic segmentation of liver structure in CT images. **Med. Phys.**, v. 20, n. 1, p. 71-78, 1993.
- BAISH, J. W.; GAZIT, Y.; BERK, D. A.; NOZUE, M.; BAXTER, L. T.; JAIN, R. K. Role of tumor vascular architecture in nutrient drug delivery: an invasion percolation-based network model. **Microvasc. Res.**, v. 51, p. 327-346, 1996.
- BAISH, J. W.; JAIN, R. K. Fractals and cancer. **Cancer Res.**, v. 60, p. 3683-3688, 2000.
- BANON, G. J. F. **Formal introduction to digital image processing**. São José dos Campos: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 1998. 133 p.
- BARMAN, A. S.; HOLICK, E. J.; BOYCE, J. F.; SPALTON, D. J.; UYYANONVARA, B.; SANGUINETTI, G.; MEACOCK, W. Quantification of posterior capsular opacification in digital images after cataract surgery. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, n. 12, p. 3882-3992, 2000.

- BECKER, M. D.; KRUSE, E. F.; JOUSSEN, M. A.; ROHRSHNEIDER, K.; NOBILING, R.; GEBHARD, M. M.; VÖLCKER, H. E. *In vivo* fluorescence microscopy of corneal neovascularization. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 236, p. 390-398, 1998.
- BENELLI, U.; BOCCI, G.; DANESI, R.; LEPRI, A.; NUNZIA, B.; BIANCHI, F.; LUPETTI, M.; DOLFI, A.; CAMPAGNI, A.; AGEN, C.; NARDI, M.; DEL TACCA, M. The heparan sulfate suleparoide inhibits rat corneal angiogenesis and *in vitro* neovascularization. **Exp. Eye Res.**, v. 67, p. 133-142, 1998.
- BENEZRA, D.; GRIFFIN, B. W.; MAFTZIR, G.; SHARIF, N. A.; CLARK, A. F. Topical formulations of novel angiostatic steroids inhibit rabbit corneal neovascularization. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 38, n. 10, p. 1954-1962, 1997.
- BENSEBAA, K.; SUZIM, A. **Image analysis in histological sections. Segmentation and quantification of tumor angiogenesis areas.** Disponível em: <<http://www.lapsi.eletro.ufrgs.br/producao/dissertacoes/kamel/kamel.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2003.
- BISWAS, P. S.; BANERJEE, K.; KIM, B.; SMITH, J.; ROUTE, B. T. A novel flow cytometry based assay for quantification of corneal angiogenesis in the mouse mouse model of herpetic stromal keratitis. **Exp. Eye Res.**, v. 80, p. 73-81, 2005.
- BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. **Lancet**, v. 346, p. 1085-1087, 1995.
- \_\_\_\_\_. Measurement error and correlation coefficients. **BMJ**, v. 313, p. 41-42, 1996.
- \_\_\_\_\_. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 1, p. 307-310, 1986.
- \_\_\_\_\_. Validating scales and indexes. **BMJ**, v. 324, p. 606-607, 2002.
- BOCCI, G.; DANESI, R.; BENELLI, U.; INNOCENTI, F.; DI PAOLO, A.; FOGLI, S.; DEL TACCA, M. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Chemoter. Pharmacol.**, v. 43, p. 205-212, 1999.
- BORGES, L. G.; FRÖEHLICH, P. E. Talidomida – novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 49, n. 1, p. 96-102, 2003.
- BREM, H.; FOLKMAN, J. Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. **J. Exp. Med.**, v. 141, p. 427-439, 1975.
- BREY, E. M.; LALANI, Z.; JOHNSTON, C.; WONG, M.; MCINTIRE, L. V.; DUKE, P. J.; PATRICK JR., C. W. Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, n. 5, p. 575-584, 2003.
- BROWN, L. F.; DETMAR, M.; CLAFFEY, K.; NAGY, J. A.; FENG, D.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a

multifunctional angiogenic cytokine. In: GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. (Ed.). **Regulation of angiogenesis**. Basel: Birkhäuser, 1997. cap. 10, p. 233-269.

CAO, R.; BRAKENHIELM, E.; WAHLESTEDT, C.; THYBERG, J.; CAO, Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 11, p. 6390-6395, 2001.

CAO, R.; FARNEBO, J.; KURIMOTO, M.; CAO, Y. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. **FASEB J.**, v. 13, p. 2195-2202, 1999.

CAO, Y.; CHEN, C.; WEATHERBEE, J. A.; TSANG, M.; FOLKMAN, J. Gro- $\beta$ , a -C-X-C- chemokine, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of Lewis lung carcinoma in mice. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 2069-2077, 1995.

CAO, Y.; LINDEN, P.; FARNERO, J.; CAO, R.; ERIKSSON, A.; KUMAR, V.; QI, J. H.; CLAESSEN-WELSH, L.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 14389-14394, 1998.

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

CARLSON, E. C.; WANG, I. J.; LIU, C. Y.; BRANNAN, P.; KAO, C. W. C.; KAO, W. W. Y. Altered KSPG expression by keratocytes following corneal injury. **Mol. Vis.**, v. 9, p. 615-623, 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 653-660, 2003.

\_\_\_\_\_. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat. Med.**, v. 6, n. 3, p. 389- 395, 2000.

CASTRO, M. R.; LUTZ, D.; EDELMAN, J. L. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. **Exp. Eye Res.**, v. 79, p. 275-285, 2004.

CHANG, S. H.; LIU, C. H.; CONWAY, R.; HAN, D. K.; NITHIPATIKOM, K.; TRIFAN, O. C.; LANE, T. F.; HLA, T. Role of prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, n. 2, p. 591-596, 2004.

CHOY, H.; MILAS, L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, n. 19, p. 1440-1452, 2003.

COMEILLI, P.; FERRAGINA, P.; GRANIERI, M. N.; STABILE, F. Optical recognition of motor vehicle license plates. **IEEE Trans. Veh. Technol.**, v. 44, n. 4, p. 790-799, 1995.

- CONRAD, T. J.; CHANDLER, B. D.; CORLESS, J. M.; KLINTWORTH, G. K. *In vivo* measurement of corneal angiogenesis with video data acquisition and computerized image analysis. **Lab. Invest.**, v. 70, n. 3, p. 426-434, 1994.
- CONTI, C. J. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. **Oncologist**, v. 7, p. 4-11, 2002.
- COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977. 264 p
- CURSIEFEN, C.; CAO, J.; CHEN, L.; LIU, Y.; MARUYAMA, K.; JACKSON, D.; KRUSE, F. E.; WIEGAND, S. J.; DANA, M. R.; STREILEIN, J. W. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, n. 8, p. 2666-2673, 2004c.
- CURSIEFEN, C.; CHEN, L.; BORGES, L.P.; JACKSON, D.; CAO, J.; RADZIEJEWSKI, C.; D'AMORE, P. A.; DANA, M. R.; WIEGAND, S. J.; STREILEIN, J. W. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1040-1050, 2004a.
- CURSIEFEN, C.; MASLI, S.; NG, T. F.; DANA, M. R.; BORNSTEIN, P.; LAWLER, J.; STREILEIN, J. W. Roles of thrombospondin-1 and -2 regulating corneal and iris angiogenesis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, n. 4, p. 1117-1124, 2004b.
- D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is na inhibitor of angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 4082-4085, 1994.
- DEMETRI, G. D.; OOSTEROM, A. T. V.; GARRETT, C. R.; BLACKSTEIN, M. E.; SHAH, M. H.; VERWEIJ, J.; MCARTHUR, G.; JUDSON, I. R.; HEINRICH, M. C.; MORGAN, J. A.; DESAI, J.; FLETCHER, C. D.; GEORGE, S.; BELLO, C. L.; HUANG, X.; BAUM, C. M.; CASALI, P. G. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 368, n. 9544, p. 1329-1338, 2006.
- DUGEL, P. U. Ranibizumab treatment of patients with ocular diseases. **Int. Ophthalmol. Cin.**, v. 46, n. 4, p. 131-140, 2006.
- EDELMAN, J. L.; CASTRO, M. R.; WEN, Y. Correlation of VEGF expression by leukocytes with the growth and regression blood vessels in the rat cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 6, p. 1112-1123, 1999.
- EKSTRAND, A. J.; CAO, R.; BJÖRNDAHL, M.; NYSTRÖM, S.; JÖNSSON-RYLANDER, A. C.; HASSANI, H.; HALLBERG, B.; NORDLANDER, M.; CAO, Y. Deletion of neuropeptide Y (NPY) 2 receptor in mice results in blockage of NPY-induced angiogenesis and delayed wound healing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 10, p. 6033-6038, 2003.
- ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, V.; BAMIAS, A.; DIMOPOULOS, M. A. Thalidomide in cancer medicine. **Ann. Oncol.**, v. 15, p. 1151-1160, 2004.

FACON, J. **Processamento e análise de imagens**. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2002. 116 p.

FAYETTE, J.; SORIA, J. C.; ARMAND, J. P. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. **Eur. J. Cancer**, v. 41, p. 1109-1116, 2005.

FERNÁNDEZ, S. P.; DÍAZ, S. P. **La fiabilidad de las mediciones clínicas**: el análisis de concordancia para variables numéricas. Disponível em: <[http://www.fisterra.com/mbe/investiga/conc\\_numerica/conc\\_numerica.pdf](http://www.fisterra.com/mbe/investiga/conc_numerica/conc_numerica.pdf)>. Acesso em: 31 jan. 2006.

\_\_\_\_\_. Pruebas diagnósticas. **Cad. Aten. Primaria**, v. 10, p. 120-124, 2003.

FERNANDO, N. H.; HURWITZ, H. I. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. **Oncologist**, v. 9, p. 11-18, 2004.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 280, p. C1358-C1366, 2001.

\_\_\_\_\_. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr. Rev.**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FERRARA, N.; DAMICO, L.; SHAMS, N.; LOWMAN, H.; KIM, R. Development of ranibizumab, na anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. **Retina**, v. 26, p. 859-870, 2006.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr. Rev.**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiología clínica**: elementos essenciais. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1996. 281 p.

FOLKMAN, J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. In: GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. (Ed.). **Regulation of angiogenesis**. Basel: Birkhäuser, 1997. cap. 1, p. 1-8.

\_\_\_\_\_. Clinical applications of research on angiogenesis. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, n. 26, p. 1757-1763, 1995.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

FU, S. L.; WU, Y. L.; ZHANG, Y. P.; QIAO, M. M.; CHEN, Y. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, n. 13, p. 1971-1974, 2004.

GALPARSORO, I. L. U.; FERNÁNDEZ, S. P. Medidas de concordancia: el índice kappa. **Cad. Aten. Primaria**, v. 6, p. 169-171, 1999.

- GASPARINI, G.; LONGO, R.; FANELLI, M.; TEICHER, B. A. Combination of angiogenesis therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1295-1311, 2005.
- GAZIT, Y.; BERK, D. A.; LEUNIG, M.; BAXTER, L. T.; JAIN, R. K. Scale-invariant behavior and vascular network formation in normal and tumor tissue. **Phys. Rev. Lett.**, v. 75, n. 12, p. 2428-2431, 1995.
- GHOSH, K.; SARKAR, S.; BHAUMIK, K. A possible mechanism of zero-crossing detection using the concept of the extended classical receptive field of retinal ganglion cells. **Biol. Cybern.**, v. 93, p. 1-5, 2005.
- GIMBRONE, M. A.; COTRAN, R. S.; LEAPMAN, S. B.; FOLKMAN, J. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 52, n. 2, p. 413-427, 1974.
- GLATT, H. J.; KLINTWORTH, G. K. Quantitation of neovascularization in flat preparations of the cornea. **Microvasc. Res.**, v. 31, p. 104-109, 1986.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Fundamentos de imagens digitais. In: \_\_\_\_\_. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000a. cap. 2, p. 15-56.
- \_\_\_\_\_. Realce de imagens. In: \_\_\_\_\_. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000c. cap. 4, p. 115-179.
- \_\_\_\_\_. Representação e descrição. In: \_\_\_\_\_. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000e. cap. 8, p. 345-406.
- \_\_\_\_\_. Segmentação de imagens. In: \_\_\_\_\_. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000d. cap. 7, p. 295-344.
- \_\_\_\_\_. Transformadas de imagens. In: \_\_\_\_\_. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000b. cap. 3, p. 57-114.
- GONZÁLEZ, R. P. **Avaliação da atividade antiangiogênica da cartilagem de tubarão e do sulfato de condroitina**. 2000. 130 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
- GONZÁLEZ, R. P.; LEYVA, A.; MELO, R. A. B.; MOREIRA, R. D. M.; PESSOA, C.; FARÍAS, R.; MORAES, M. O. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cir. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 168-173, 2000.
- GONZÁLEZ, R. P.; SOARES, F. S. D.; FARÍAS, R. F.; PESSOA, C.; LEYVA, A.; VIANA, G. S. B.; MORAES, M. O. Demonstration of inhibitory effect of oral shark cartilage on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in the rabbit cornea. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, n. 2, p. 151-154, 2001.
- GÖTTE, M.; JOUSSEN, A. M.; KLEIN, C.; ANDRE, P.; WAGNER, D. D.; HINKES, M. T.; KIRCHHOF, B.; ADAMIS, A. P.; BERNFIELD, M. Role of syndecan-1 in

leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 1135-1141, 2002.

GRAGOUDAS, E. S.; ADAMIS, A. P.; CUNNINGHAM JR., E. T.; FEINSOD, M.; GUYER, D. R. pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 27, p. 2805-2816, 2004.

GREENE, A. S.; LOMBARD, J. H.; COWLEY, A. W.; HANSEN-SMITH, F. M. Microvessel changes in hypertension measured by *Griffonia simplicifolia* I lectin. **Hypertension**, v. 15, p. 779-783, 1990.

GROSE, R.; DICKSON, C. Fibroblast growth signaling in tumorigenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 16, p. 179-186, 2005.

GROSS, J.; AZIZKHAN, R. G.; BISWAS, C.; BRUNS, R. R.; HSIEH, D. S. T.; FOLKMAN, J. Inhibition of tumor growth, vascularization, and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 2, p. 1176-1180, 1981.

GU, W. Z.; TAHIR, S. K.; WANG, Y. C.; ZHANG, H. C.; CHERIAN, S. P.; O'CONNOR, S.; LEAL, J. A.; ROSENBERG, S. H.; NG, S. C. Effect of novel CAAX peptidomimetic farnesyltransferase inhibitor on angiogenesis in vitro and in vivo. **Eur. J. Cancer**, v. 35, n. 9, p. 1394-1401, 1999.

GUPTA, K.; KSHIRSAGAR, S.; CHANG, L.; SCHWARTZ, R.; LAW, P. Y.; YEE, D.; HEBBEL, R. P. Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth. **Cancer Res.**, v. 62, p. 4491-4498, 2002.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and merging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353-364, 1996.

HASAN, J.; SHNYDER, S. D.; BIBBY, M.; DOUBLE, J. A.; BICKNELL, R.; JAYSON, G. C. Quantitative angiogenesis assays *in vivo* – a review. **Angiogenesis**, v. 7, p. 1-16, 2004.

HAYNES, R. C. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides córtico-supra-renais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e ações dos hormônios cortiço-suprarenais. In GILMAN, A. C.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. (Ed.). **Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 60, p. 951-972.

HAYNES, W. L.; PROIA, A. D.; KLINTWORTH, G. K. Effect of inhibitors of arachidonic acid metabolism on corneal neovascularization in the rat. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 30, n. 7, p. 1588-1593, 1989.

HENRY, T. D. Therapeutic angiogenesis. **BMJ**, v. 318, p. 1536-1539, 1999.

HEPSEN, I. F.; ER, H.; ÇEKİÇ, O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. **Ophthalmic Res.**, v. 31, p. 426-431, 1999.

HERNÁNDEZ, G. L.; VOLPERT, O. V.; ÍÑIGUEZ, M. A.; LORENZO, E.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, S.; GRAU, R.; FRESNO, M.; REDONDO, J. M. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by ciclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.*, v. 193, n. 5, p. 607-620, 2001.

HOLZER, M. P.; SOLOMON, K. D.; VRONAN, D. T.; SANDOVAL, H. P.; MARGARON, P.; KASPER, T.J.; CROSSON, C. E. Photodynamic therapy with verteporfin in a rabbit model of cornel neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 44, n. 7, p. 2954-2958, 2003.

HOPKINS, W. G. Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Med.*, v. 30, n. 1, p. 1-15, 2000.

HURST, J. S.; BALAZY, M.; BAZAN, H. E. P.; BAZAN, N. G. The epithelium, endothelium, and stroma of the rabbit cornea generate (12S)-hydroxyeicosatetraenoic acid as main lipoxygenase metabolite in response to injury. *J. Biol. Chem.*, v. 266, n. 11, p. 6726- 6730, 1991.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W.; BERLIN, J.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 350, n. 23, p. 2335-2342, 2004.

JAIN, R. K.; SCHLENGER, K., HÖCKEL, M.; YUAN, F. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat. Med.*, v. 3, n. 11, p. 1203-1208, 1997.

JAIN, R. K.; MUNN, L. L.; FUKUMURA, D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat. Rev. Cancer*, v. 2, p. 266-276, 2002.

JEONG, S. J.; HIGUCHI, R.; ONO, M.; KUWANO, M.; KIM, Y. C.; MIYAMOTO, T. *Cis*-Hinokiresinol, a norlignan from *Anemarrhena asphodeloides*, inhibits angiogenic response *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 26, n. 12, p. 1721-1724, 2003.

JOHNSON, J. P.; BRUCE, J. N. Angiogenesis in human gliomas: prognostic and therapeutic implications. In: GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. (Ed.). *Regulation of angiogenesis*. Basel: Birkhäuser, 1997. cap. 3, p. 29-46.

JOUSSEN, A. M.; BEECKEN, W. D.; MOROMIZATO, Y., SCHWARTZ, A.; KIRCHHOF, B.; POULAKI, V. Inhibition of inflammatory corneal angiogenesis by TNP-470. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 42, n. 11, p. 2510-2516, 2001.

JOUSSEN, A. M.; GERMAN, T.; KIRCHHOF, B. Effect of thalidomide and structurally related compounds on corneal angiogenesis is comparable to their teratological potency. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 237, p. 952-961, 1999.

JOUSSEN, A. M.; KRUSE, F. E.; VÖLCKER, H. E.; KIRCHHOF, B. Topical application of methotrexate for inhibition of corneal angiogenesis. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 237, p. 920-927, 1999.

- JOUSSEN, A. M.; POULAKI, V.; MITSIADES, N.; STECHSCHULTE, S. U.; KIRCHHOF, B.; DARTT, D. A.; FONG, G. H.; RUDGE, J.; WIEGAND, S. J.; YANCOPOULOS, G. D.; ADAMIS, A. P. VEGF-dependent conjunctivalization of the corneal surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 44, n. 1, p. 117-123, 2003.
- KENYON, B. M.; BROWNE, F.; D'AMATO, R. J. Effects of Thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Exp. Eye Res.*, v. 64, p. 971-978, 1997.
- KENYON, B. M.; VOEST, E. E.; CHEN, C. C.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J.; D'AMATO, R. J. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 37, n. 8, p. 1625-1632, 1996.
- KIM, B.; TANG, Q.; BISWAS, P. S.; XU, J.; SCHIFFELERS, R. M.; XIE, F. Y.; ANSARI, A. M.; SCARIA, P. V.; WOODLE, M. C.; LU, P.; ROUSE, B. T. Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes. *Am. J. Pathol.*, v. 165, n. 6, p. 2177-2185, 2004.
- KIRCHNER, L. M.; SCHMIDT, S. P.; GRUBER, B. S. Quantitation of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane model using fractal analysis. *Microvasc. Res.*, v. 51, p. 2-14, 1996.
- KIRKWOOD, B. R. **Essentials of medical statistics**. Oxford: Blackwell, 1988. 234 p.
- KLEIN, S.; ROGHANI, M.; RIFKIN, D. B. Fibroblast growth factors as angiogenesis factors: new insights into their mechanism of action. In: GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. (Ed.). **Regulation of angiogenesis**. Basel: Birkhäuser, 1997. cap. 7, p. 159-192.
- KLOTZ, O.; PARK, J. K.; PLEYER, U.; HARTMANN, C.; BAATZ, H. Inhibition of corneal neovascularization by  $\alpha_v$ -integrin antagonists in the rat. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 238, p. 88-93, 2000.
- KNOTTNERUS, J. A.; WEEL, C. V.; MURIS, J. W. M. Evaluation of diagnostic procedures. *BMJ*, v. 324, p. 477-480, 2002.
- KON, K.; FUJII, S.; KOSAKA, H.; FUJIWARA, T. Nitric oxide synthase inhibition by  $N^{(G)}$ -nitro-L-arginine methyl ester retards vascular sprouting in angiogenesis. *Microvasc. Res.*, v. 65, p. 2-8, 2003.
- KONYA, D.; YILDIRIM, Ö.; KURTKAYA, Ö.; KILIÇ, K.; BLACK, P. M.; PAMIR, M. N.; KILIÇ, T. Testing the angiogenic potential of cerebrovascular malformations by use of a rat cornea model: usefulness and novel assessment of changes over time. *Neurosurgery*, vol. 56, p. 1339-1346, 2005.
- KOURLAS, H.; SCHILLER, D. S. Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review. *Clin. Ther.*, v. 28, n. 1, p. 36-44, 2006.
- KRUSE, F. E.; JOUSSEN, A. M.; ROHRSCHNEIDER, K.; BECKER, M. D.; VÖLCKER, H. E. Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, v. 236, p. 461-466, 1998.

- KUO, C. J.; FARNEBO F.; YU, E. Y.; CHRISTOFFERSON, R.; SWEARINGEN, R. A.; CARTER, R.; RECUM, H. A. V.; YUAN, J.; KAMIHARA, J.; FLYNNE, E.; D'AMATO, R.; FOLKMAN, J.; MULLIGAN, R. C. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 8, p. 4605-4610, 2001.
- KUWANO, T.; NAKAO, S.; YAMAMOTO, H.; TSUNEYOSHI, M.; YAMAMOTO, T.; KUWANO, M.; ONO, M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. **FASEB J.**, v. 18, p. 300-310, 2004.
- KWON, Y. S.; HONG, H. S.; KIM, J. C.; SHIN, J. S.; SON, Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, p. 454-460, 2005.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.
- LATOUR, J.; ABRAIRA, V.; CABELLO, J. B.; SÁNCHEZ, J. L. Las mediciones clínicas en cardiología: validez y errores de medición. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 50, p. 117-128, 1997.
- LEAHY, K. M.; ORNBERG, R. L.; WANG, Y.; ZWEIFEL, B. S.; KOKI, A. T.; MASFERRER, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells *in vivo*. **Cancer Res.**, v. 62, p. 625-631, 2002.
- LEE, P.; WANG, C. C.; ADAMIS, A. P. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. **Surv. Ophthalmol.**, v. 43, n. 3, p. 245-269, 1998.
- LEE, S.; ZHENG, M.; KIM, B.; ROUSE, B. T. Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 8, p. 1105-1111, 2002.
- LEITHOLD, L. **O cálculo com geometria analítica**. 2. ed. São Paulo: Harbra, 1982. v.1, 526 p.
- LI, H.; LIU, K. J. R.; LO, S. C. B. Fractal modeling and segmentation for the enhancement of microcalcifications in digital mammograms. **IEEE Trans. Med. Imag.** V. 16, n. 6, p. 785-798, 1997.
- LONGO, R.; SARMIENTO, R.; FANELLI, M.; CAPACCETTI, B.; GATTUSO, D.; GASPARINI, G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. **Angiogenesis**, v. 5, p. 237-256, 2002.
- LÓPEZ, J. B. C.; RODRÍGUEZ, F. P. Estudios de evaluación de las pruebas diagnósticas en cardiología. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 50, p. 507-519, 1997.
- LOSORDO, D. W.; DIMMELER, S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: angiogenic cytokines. **Circulation**, v. 109, p. 2487-2491, 2004a.
- \_\_\_\_\_. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: cell-based therapies. **Circulation**, v. 109, p. 2692-2697, 2004b.

- LOZONSCHI, L.; SUNAMURA, M.; KOBARI, M.; EGAWA, S.; DING, L.; MATSUNO, S. Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinase inhibitor, KB-R7785, in two tumor models. **Cancer Res.**, v. 59, p. 1253-1258, 1999.
- MA, D. H. K.; YAO, J. Y.; YEH, L. K.; LIANG, S. T.; SEE, L. C.; CHEN, H. T.; LIN, K. Y.; LIANG, C. C.; LIN, K. K.; CHEN, J. K. *In vitro* antiangiogenic activity in *ex vivo* expanded human limbal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45. n. 8, p. 2586-2595, 2004.
- MACPHERSON, G. R.; FRANKS, M.; TOMOAIA-COTISEL, A.; ANDO, Y.; PRICE, D. K.; FIGG, W. D. Current status of thalidomide and its role in the treatment of metastatic prostate cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 46, p. S49-S57, 2003.
- MALONNE, M.; LANGER, I.; KISS, R.; ATASSI, G. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, p. 1-14, 1999.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Manual de quantificação morfológica:** morfometria, alometria, estereometria. 2. ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994. 83 p.
- MARCONCINI, L.; MARCHIO, S.; MORBIDELLI, L.; CARTOCCI, E.; ALBINI, A.; ZICHE, M.; BUSSOLINO, F.; OLIVIERO, S. C-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 9671-9676, 1999.
- MARUYAMA, K.; LI, M.; CURSIEFEN, C.; JACKSON, D. G.; KEINO, H.; TOMITA, M.; ROOIJEN, N. V.; TAKENAKA, H.; D'AMORE, P. A.; STEN-STREILEN, J.; LOSORDO, D. W.; STREILEIN, W. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2363-2372, 2005.
- MASFERRER, J. L.; LEAHY, K. M.; KOKI, A. T.; ZWEIFEL, B. S.; SETTLE, S. L.; WOERNER, B. M.; EDWARDS, D. A.; FLICKINGER, A. G.; MOORE, R. J.; SEIBERT, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Res.**, v. 60, p. 1306-1311, 2000.
- MATTA, W. N. **Metodologia para detecção de máculas em micrografias utilizando morfologia matemática**. 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.
- MCGRAW, K. O.; WONG, S. P. Forming inferences about some intraclass correlation coefficients. **Psychol. Methods**, v. 1, n. 1, p. 30-46, 1996.
- MIYATAKA, M.; RICH, K. A.; INGRAM, M.; YAMAMOTO, T.; BING, R. J. Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. **Hypertension**, v. 39, p. 785-789, 2002.
- MOHAN, R.; SIVAK, J.; ASHTON, P.; RUSSO, L. A.; PHAM, B. Q.; KASAHARA, N.; RAIZMAN, M. B.; FINI, M. E. Curcuminoids inhibit the angiogenic response

stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 14, p. 10405-10412, 2000.

MOORE, J. E.; McMULLEN, T. C. B.; CAMPBELL, I. L.; ROBAN, R.; KAJI, Y.; AFSBARI, N. A.; USUI T, ARCHER DB. The inflammatory milieu associated with conjunctivalized cornea and its alteration with IL-1 RA gene therapy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43, n. 9, p. 2905-2915, 2002.

MORABITO, A.; DE MAIO, E.; DI MAIO, M.; NORMANNO, N.; PERRONE, F. tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current *status* and future directions. **Oncologist**, v. 11, p. 753-764, 2006.

MOROMIZATO, Y.; STECHSCHULTE, S.; MIYAMOTO, K.; MURATA, T.; TSUJIKAWA, A.; JOUSSEN, A. M.; ADAMIS, A. P. CD18 and ICAM-1-dependent corneal neovascularization and inflammation after limbal injury. **Am. J. Pathol.**, v. 157, n. 4, p. 1277-1281, 2000.

MOTULSKY, H. J. **Prism 4 statistics guide – statistical analyses for laboratory and clinical researchers**. San Diego: Graphpad Software Inc., 2003. 148 p.

MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. **Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting**. San Diego: Graphpad Software Inc., 2003. 351 p.

MOTZER, R. J.; RINI, B. I.; BUKOWSKI, R. M.; CURTI, B. D.; GEORGE, D. J.; HUDES, G. R.; REDMAN, B. G.; MARGOLIN, K. A.; MERCHAN, J. R.; WILDING, G.; GINSBERG, M. S.; BACIK, J.; KIM, S. T.; BAUM, C. M.; MICHAELSON, M. D. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. **JAMA**, v. 295, n. 21, p. 2516-2524, 2006.

MOULTON, K. S.; VAKILI, K.; ZURAKOWSKI, D.; SOLIMAN, M.; BUTTERFIELD, C.; SYLVIN, E.; LO, K. M.; GILLIES, S.; JAVAHERIAN, K.; FOLKMAN, J. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advance atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, n. 8, p. 4736-4741, 2003.

MURATA, M.; SHIMIZU, S.; HORIUCHI, S.; TAIRA, M. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on orneal neovascularization. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 244, n. 2, p. 205-209, 2006.

NISSANOV, J.; TUMAN, R. W.; GRUVER, L. M.; FORTUNATO, J. M. Automatic vessel segmentation and quantification of the rat aortic ring assay of angiogenesis. **Lab. Invest.**, v. 73, n.5, p. 734-739, 1995.

O'LEARY, J. J.; SHAPIRO, R. L.; REN, C. J.; CHUANG, N.; COHEN, H. W.; POTMESIL, M. Antiangiogenic effects of camptothecin analogues 9-amino-20(S)-camptothecin, topotecan, and CPT-11 studied in the mouse cornea model. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 181-187, 1999.

O'REILLY, M. S. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis anf tumor growth. In: GOLDBERG, I. D.; ROSEN, E. M. (Ed.). **Regulation of angiogenesis**. Basel: Birkhäuser, 1997. cap. 11, p. 273-294.

- OSAWA, H.; MARUYAMA, K.; STREILEIN, W. CD95 ligand expression on corneal epithelium and endothelium influences the fates of orthotopic and heterotopic corneal allografts in mice. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45. n. 6, p. 1908-1915, 2004.
- OTSU, N. A threshold selection method from gray-level histograms. **IEEE Trans. Syst. Man Cybern.**, v. 9, n. 1, p. 62-66, 1979.
- OWEN, C. G.; ELLIS, T. J.; RUDNICKA, A. R.; WOODWARD, E. G. Optimal green (red-free) digital imaging of conjunctival vasculature. **Ophthal. Physiol. Opt.**, v. 22, n. 3, p. 234-243, 2002.
- PAPAS, E. B. Key factors in the subjective and objective assessment of conjunctival erythema. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 41, p. 687-691, 2000.
- PAPETTI, M.; HERMAN, I.M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. C947-C970, 2002.
- PARENTE, D. R.; SILVA, M. R. B. M.; SILVA JUNIOR, R. G.; MARQUES, M. A. Modelos experimentais de deficiência limbar em coelhos – análise clínica. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 65, n. 2, p. 153-160, 2002.
- PARKE, A.; BHATTACHERJEE, P.; PALMER, R. M. J.; LAZARUS, N. R. Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea. **Am. J. Pathol.**, v. 130, n. 1, p. 173-178, 1988.
- PARSONS-WINGERTER, P.; ELLIOTT, K. E.; CLARK, J. I.; FARR, A. G. Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 1250-1256, 2000a.
- PARSONS-WINGERTER, P.; ELLIOTT, K. E.; FARR, A. G.; RADHAKRISHNAN, K.; CLARK, J. I.; SAGE, E. H. Generational analysis reveals that TGF- $\beta$ 1 inhibits the rate of angiogenesis *in vivo* by selective decrease in the number of new vessels. **Microvasc. Res.**, v. 59, p. 221-232, 2000b.
- 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. **Microvas. Res.**, v. 55, p. 201-214, 1998.
- PENN, J. S.; RAJARATNAM, V. S.; COLLIER, R. J.; CLARK, A. F. The effect of an angiostatic steroid on neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 42. n. 1, p. 283-290, 2001.
- PEPPER, M. S. Manipulating angiogenesis: from basic science to the bedside. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, p. 605-619, 1997.
- \_\_\_\_\_. Role of the matrix metalloproteinase and plasmonogen activator-plasmin systems in angiogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 1104-1117, 2001.

- PEREZ, A. A. **Segmentação e quantificação de tecidos em imagens coloridas de úlceras de perna.** 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- PINTO, F. A. C.; MALUCELLI, B. E. Inflammatory infiltrate, VEGF and FGF-2 contents during corneal angiogenesis in STZ-diabetic rats. **Angiogenesis**, v. 5, p. 67-74, 2002.
- PINTO, L. C. M. **Quantikov – um analisador microestrutural para o ambiente Windows.** 1996. 167 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- POLAKOWSKI, W. E.; COURNOYER, D. A.; ROGERS, S. K.; DESIMIO, M. P.; RUCK, D. W.; HOFFMEISTER, J. W.; RAINES, R. A. Computer-aided breast cancer detection and diagnosis of masses using difference of Gaussians and derivative-based feature saliency. **IEEE Trans. Med. Imag.**, v. 16, n. 6, p. 811-819, 1997.
- POULAKI, V.; MITISIADES, N.; KRUSE, F. E.; RADETZKY, S.; ILIAKI, E.; KIRCHHOF, B.; JOUSSEN, A. M. Activin A in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 4, p. 1293-1302, 2004.
- PRESTA, M.; DELL'ERA, P.; MITOLA, S.; MORONI, E.; RONCA, R.; RUSNATI, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 16, p. 159-178, 2005.
- PROIA, A.D.; CHANDLER, D.B.; HAYNES, W.L.; SMITH, C.F.; SUVARNAMANI, C.; ERKEL, F.H.; KLINTWORTH, G.K. Quantitation of corneal neovascularization using computerized image analysis. **Lab. Invest.**, v. 58, n. 4, p. 473-479, 1988.
- RANGAYYAN, R. M.; EL-FARAMAWY, N. M.; DESAUTELS, J. E. L.; ALIM, O. A. Measures of acutance and shape for classification of breast tumors. **IEEE Trans. Med. Imag.**, v. 16, n. 6, p. 799-810, 1997.
- RIEDER, M. J.; O'DROBINAK, D. M.; GREENE, A. S. A computerized method for determination of microvascular density. **Microvasc. Res.**, v. 49, p. 180-189, 1995.
- RIENDEAU, D.; PERCIVAL, M.D.; BRIDEAU, C.; CHARLESON, S.; DUBE, D.; ETHIER, D.; FALGUEYRET, J.P.; FRIESEN, R.W.; GORDON, R.; GREIG, G.; GUAY, J.; MANCINI, J.; OUELLET, M.; WONG, E.; XU, L.; BOYCE, S.; VISCO, D.; GIRARD, Y.; PRASIT, P.; ZAMBONI, R.; RODGER, I.W.; GRESSER, M.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; YOUNG, R.N.; CHAN, C.C. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 296, n. 2, p. 558-566, 2001.
- RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, p. 671-674, 1997.
- ROBIN, J. B.; REGIS-PACHECO, L. F.; KASH, R. L.; SCHANZLIN, D. J. The histopathology of corneal neovascularization. **Arch. Ophthalmol.**, v. 103, p. 284-287, 1985.

ROH, J. L.; SUNG, M. W.; PARK, S. W.; HEO, D. S.; LEE, D. W.; KIM, K. H. Celecoxib can prevent tumor growth and distant metastasis in postoperative setting. **Cancer Res.**, v. 64, p. 3230-3235, 2004.

ROMANO, M.; CLÀRIA, J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converting functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. **FASEB J.**, v. 17, p. 1986-1995, 2003.

RYMER, S.; BURNIER, M.; MARINHO, D.; KWITKO, S.; BELFORT JUNIOR, R.; ROHE, D. Transplante autólogo de limbo conjuntival e de limbo córneo-conjuntival no tratamento das queimaduras químicas oculares em coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 65, n. 2, p. 161-170, 2002.

SAITA, N.; FUJIWARA, N.; YANO, I.; SEJIMA, K.; KOBAYASHI, K. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5991-5997, 2000.

SAMOLOV, B.; STEEN, B.; SEREGARD, S.; VAN DER PLOEG, I.; MONTAN, P.; KVANTA, A. Delayed inflammation-associated corneal neovascularization in MMP-2-deficient mice. **Exp. Eye Res.**, v. 80, p. 159-166, 2005.

SANDERS, J. E.; GOLDSTEIN, B. S.; LEOTTA, D. F.; RICHARDS, K. A. Image processing techniques for quantitative analysis of skin structures. **Comput. Methods Prog. Biomed.**, v. 59, p. 167-180, 1999.

SANTOS, L.P.P. **Visão por computador**. Braga: Universidade do Minho, 1995. 35 p.

SBEH, Z. B.; COHEN, L. D.; MIMOUN, G.; COSCAS, G. A new approach of geodesic reconstruction for drusen segmentation in eye fundus images. **IEEE Trans. Med. Imag.**, v. 20, n.12, p. 1321-1333, 2001.

SCHMID, P. **Segmentation & symmetry measure for image analysis**: application to digital dermatoscopy. 1999. 192 f. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica Federal de Lausanne, Lausanne, 1999.

SCHUMACHER, B.; PECHER, P.; VON SPECHT, B. U.; STEGMANN, T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. **Circulation**, v. 97, p. 645-650, 1998.

SCHWARZ, M. A.; KANDEL, J.; BRETT, J.; LI, J.; HAYWARD, J.; SCHWARZ, R. E.; CHAPPEY, O.; WAUTIER, J. L.; CHABOT, J.; GERFO, P. L.; STERN, D. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells. **J. Exp. Med.**, v. 190, n. 3, p. 341-353, 1999.

SENNLARB, F.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Nitric oxide synthase-II is expressed in severe corneal alkali burns and inhibits neovascularization. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40. n.12, p. 2773-2779, 1999.

- SEO, K.; CHOI, J.; PARK, M.; RHEE, C. Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. **J. Vet. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 125-130, 2001.
- SHAN, S.; LOCKHART, A. C.; SAITO, W. Y.; KNAPP, A. M.; LADEROUTE, K. R.; DEWHIRST, M. W. The novel tubulin-binding drug BTO-956 inhibits R3230Ac mammary carcinoma growth and angiogenesis in Fischer 344 rats. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 2590-2596, 2001.
- SHARMA, S.; SHARMA, M. C.; SARKAR, C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprotgnostic perspective and significance of neoangiogenesis. **Histopathology**, v. 46, p. 481-489, 2005.
- SIMONS, M. Therapeutic coronary angiogenesis: a fronde praecipitum a tergo lupi? **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 280, p. H1923-H1927, 2001.
- SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P.; EDDLEMON, P.; MUNSHI, N.; ANAISSE, E.; WILSON, C.; DHODAPKAR, M.; ZELDIS, J.; BARLOGIE, B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 21, p. 1565-1571, 1999.
- SINTHANAYOTHIN, C.; BOYCE, J. F.; COOK, H. L.; WILLIAMSON, T. H. Automated localisation of the optic disc, fovea, and retinal blood vessels from digital colour fundus images. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 83, p. 902-910, 1999.
- SINTHANAYOTHIN, C.; BOYCE, J. F.; WILLIAMSON, T. H.; COOK, H. L.; MENSAH, E.; LAL, S.; USHER, D. Automated detection of diabetic retinopathy on digital fundus images. **Diabet. Med.**, v. 19, p. 105-112, 2002.
- SMITH, R. T.; CHAN, J. K.; NAGASAKI, T.; AHMAD, U. F.; BARBAZETTO, I.; SPARROW, J.; FIGUEROA, M.; MERRIAM, J. Automated detection of macular drusen using geometric background leveling and threshold selection. **Arch. Ophthalmol.**, v. 123, p. 200-206, 2005.
- SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 52, p. 33157-33160, 1996.
- SONODA, K. H.; NAKAO, S.; NAKAMURA, T.; OSHIMA, T.; QIAO, H.; HISATOMI, T.; KINOSHITA, S.; ISHIBASHI, T. Cellular events in the normal and inflamed cornea. **Cornea**, v. 24, p. S50-S54, 2005.
- SOTOZONO, C.; HE, J.; TEI, M.; HONMA, Y.; KINOSHITA, S. Effect of metalloproteinase inhibitor on corneal cytokine expression after alkali injury. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 40, n. 10, p. 2430-2434, 1999.
- SOUZA, A. D. A. **Imagem tridimensional da deformação da musculatura extraocular na orbitopatia de Graves**: implicações do efeito de volume parcial. 2002. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- SPAIDE, R. F.; LAUD, K.; FINE, H. F.; KLANCNIK JR., J. M.; MEYERLE, C. B.; YANNUZZI, L. A.; SORENSEN, J.; SLAKTER, J.; FISHER, Y. L.; COONEY, M. J.

Intravitreal bevacizumab treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. **Retina**, v. 26, p. 383-390, 2006.

STECHSCHULTE, S. U.; JOUSSEN, A. M.; RECUM, H. A. V.; POULAKI, V.; MOROMIZATO, Y.; YUAN, J.; D'AMATO, R. J.; KUO, C.; ADAMIS, A. P. Rapid ocular angiogenic control via naked DNA delivery to cornea. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 42, n. 9, p. 1975-1979, 2001.

SUNDERKÖTTER, C.; BEIL, W.; ROTH, J.; SORG, C. Cellular events associated with inflammatory angiogenesis in the mouse cornea. **Am. J. Pathol.**, v. 138, n. 4, p. 931-939, 1991.

TARABOLETTI, G.; GIAVAZZI, R. Modelling approaches for angiogenesis. . **Eur. J. Cancer**, v. 40, p. 881-889, 2004.

THUN, M. J.; HENLEY, S. J.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 94, n. 4, p. 252-266, 2002.

TRIER, O. D.; JAIN, A. K. Goal-directed evaluation of binarization methods. **IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 17, n. 12, p. 1191-1201, 1995.

TRIER, O. D.; TAXT, T. Evaluation of binarization methods for document images. **IEEE Trans. on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, v. 17, n. 3, p. 312-315, 1995.

TUBIC, D.; ZACCARIN, A.; POULIOT, J.; BEAULIEU, L. Automated seed detection and three-dimensional reconstruction. I. Seed localization from fluoroscopic images or radiographs. **Med. Phys.**, v. 28, n. 11, p. 2265-2271, 2001.

TURNER, H. E.; HARRIS, A. L.; MELMED, S.; WASS, J. A. H. Angiogenesis in endocrine tumors. **Endocr. Rev.**, v. 24, n. 5, p. 600-632, 2003.

UMBAUGH, S. E.; MOSS, R. H. STOECKER, W. V. An automatic color segmentation algorithm with application to identification of skin tumor borders. **Comput. Med. Imaging Graph.**, v. 16, n. 3, p. 227-235, 1992.

USUI, T.; ISHIDA, S.; YAMASHIRO, K.; KAJI, Y.; POULAKI, V.; MOORE, J.; MOORE, T.; AMANO, S.; HORIKAWA, Y.; DARTT, D.; GOLDING, M.; SHIMA, D. T.; ADAMIS, A. P. VEGF<sub>164(165)</sub> as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 45, n. 2, p. 368-374, 2004.

USUI, T.; SUGISAKI, K.; AMANO, S.; JANG, W. D.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. New drug delivery for corneal neovascularization using polyion complex micelles. **Cornea**, v. 24, p. S39-S42, 2005.

VAILHÉ, B.; VITTEL, D.; FEIGE, J. J. *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis. **Lab. Invest.**, v. 81, n. 4, p. 439-452, 2001.

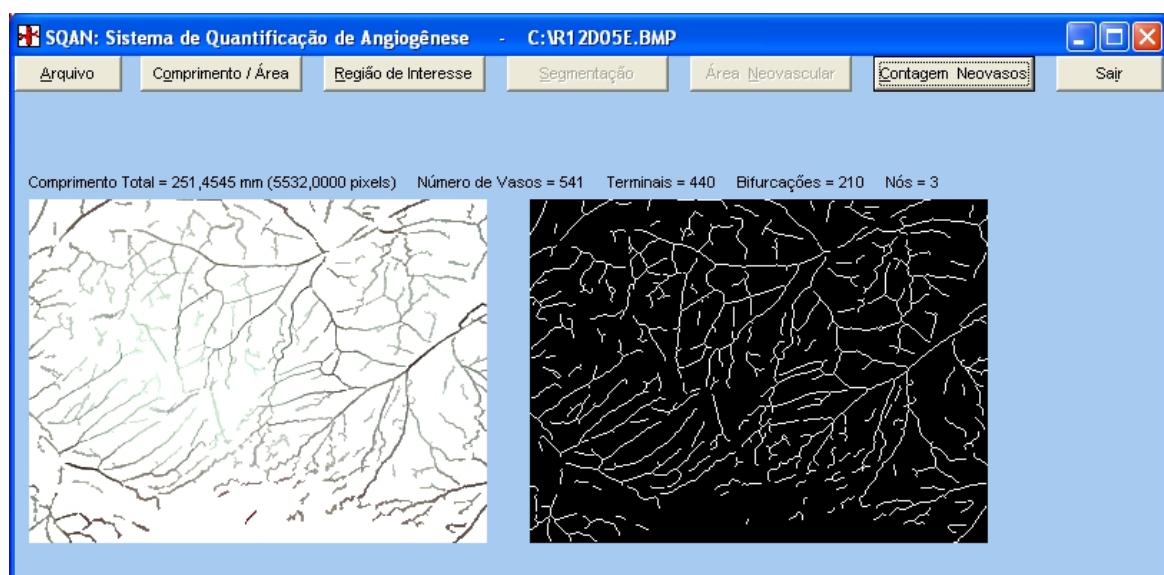
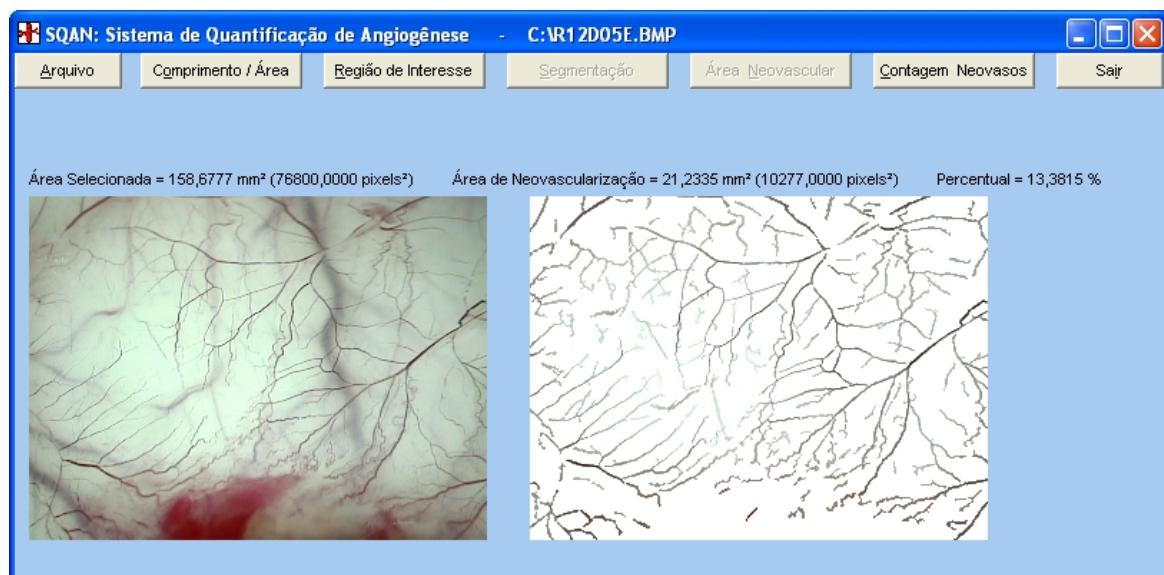
- VASSE, M.; POURTAU, J.; TROCHON, V.; MURAINÉ, M.; VANNIER, J. P.; LU, H.; SORIA, J; SORIA, C. Oncostatin M induces angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, p. 1835-1842, 1999.
- VICO, P. G.; KYRIACOS, S.; HEYMANS, O.; LOURYAN, S.; CARTILIER, L. Dynamic study of the extraembryonic vascular network of the chick embryo by fractal analysis. **J. Theor. Biol.**, v. 195, p. 525-532, 1998.
- VIEIRA, S. **Estatística Experimental**. 2. ed. São Paulo: Atlas, 1999. 185 p.
- VOEST, E. E.; KENYON, B. M.; O'REILLY, M. S. TRUITT, G.; D'AMATO, R. J.; FOLKMAN, J. Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, n. 8, p. 581-586, 1995.
- VOLPERT, O. V.; WARD, W. F.; LINGEN, M. W.; CHESTER, L.; SOLT, D. B.; JOHNSON, M. D.; MOLTENI, A.; POLVERINI, P. J.; BOUCK, N. P. Captopril inhibits angiogenesis and slows growth of experimental tumors in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 3, p. 671-679, 1996.
- VOLPERT, O.; FONG, T.; KOCH, A. E.; PETERSON, J. D.; WALTENBAUGH, C.; TEPPER, R. I. BOUCK N. O. Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 6, p. 1039-1046, 1998.
- WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **FASEB J.**, v. 18, p. 790-804, 2004.
- WEBER, D.; RANKIN, K.; GAVINO, M.; DELASALLE, K.; ALEXANIAN, R. Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2003.
- WEI, D.; WANG, L.; HE, Y.; XIONG, H. Q.; ABBRUZZESE, J. L.; XIE, K. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. **Cancer Res.**, v. 64, p. 2030-2038, 2004.
- WHITE, R. R.; SHAN, S.; RUSCONI, C. P.; SHETTY, G.; DEWHIRST, M. W.; KONTOS, C. D.; SULLINGER, B. A. Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 9, p. 5028-5033, 2003.
- WHITESIDE, G.T.; HARRISON, J.; BOULET, J.; MARK, L.; PEARSON, M.; GOTTSCHALL, S.; WALKER, K. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 85-91, 2004.
- WIJNGAARDEN, P. V.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. **JAMA**, v. 293, n. 12, p. 1509-1513, 2005.
- WILD, R.; RAMAKRISHNAN, S.; SEDGEWICK, J.; GRIFFIOEN, A. W. Quantitative assessment of angiogenesis and tumor vessel architecture by computer-assisted digital image analysis: effects of VEGF-toxin conjugate on tumor microvessel density. **Microvasc. Res.**, v. 59, p. 368-376, 2000.

- WILHELM, S.; CARTER, C.; LYNCH, M.; LOWINGER, T.; DUMAS, J.; SMITH, R. A.; SCHWARTZ, B.; SIMANTOV, R.; KELLEY, S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, n. 10, p. 835-844, 2006.
- WILLIAMS, C. S.; TSUJII, M.; REESE, J.; DEY, S. K.; DUBOIS, R. N. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1589-1594, 2000.
- WU, P. C.; LIU, C. C.; CHEN, C. H.; KOU, H. K.; SHEN, S. C.; LU, C. Y.; CHOU, W. Y.; SUNG, M. T.; YANG, L. C. Inhibition of experimental angiogenesis of cornea by somatostatin. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 241, p. 63-69, 2003.
- YAGI, T.; OHSHIMA, S.; FUNAHASHI, Y. The role of retinal bipolar cell in early vision: an implication with analogue networks and regularization theory. **Biol. Cybern.**, v. 77, p. 163-171, 1997.
- YAMADA, M.; KAWAI, M.; KAWAI, Y.; MASHIMA, Y. The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. **Curr. Eye Res.**, v. 19, n. 4, p. 300-304, 1999.
- YOSHIDA, S.; AMANO, H.; HAYASHI, I.; KITASATO, H.; KAMATA, M.; INUKAI, M.; YOSHIMURA, H.; MAJIMA, M. COX-2/VEGF-dependent facilitation of tumor-associated angiogenesis and tumor growth *in vivo*. **Lab. Invest.**, v. 83, n. 10, p. 1385-1394, 2003a.
- YOSHIDA, S.; YOSHIDA, A.; MATSUI, H.; TAKADA, Y.; ISHIBASHI, T. Involvement of macrophage chemotactic protein-1 and interleukin-1 $\beta$  during inflammatory but not basic fibroblast growth factor-dependent neovascularization in the mouse cornea. **Lab. Invest.**, v. 83, n. 7, p. 927-938, 2003b.
- ZHANG, H.; LI, C.; BACIU, P. C. Expression of integrins and MMPs during alkaline-burn-induced corneal angiogenesis. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 955-962, 2002.
- ZHANG, H. T.; BICKNELL, R. Therapeutic inhibition of angiogenesis. In: MURRAY, J. C. (Ed.). **Angiogenesis protocols**. Totowa: Humana Press, 2001. cap. 1, p. 3-26.
- ZHANG, T. Y.; SUEN, C. Y. A fast parallel algorithm for thinning digital patterns. **Comm. ACM**, v. 27, n. 3, p. 236-239, 1984.
- ZHENG, M.; DESHPANDE, S.; LEE, S.; FERRARA, N.; ROUSE, B. T. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. **J. Virol.**, v. 75, p. 9828-9835, 2001a.
- ZHENG, M.; KLINMAN, D. M.; GIERYNSKA, M.; ROUSE, B. T. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, n. 13, p. 8944-8949, 2002.
- ZHENG, M.; SCHWARZ, M. A.; LEE, S.; KUMARAGURU, U.; ROUSE, B. T. Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 3, p. 1021-1029, 2001b.

- ZHOU, B.; WANG, B. Pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration. **Exp. Eye Res.**, v. 83, p. 615-619, 2006.
- ZICHE, M. Corneal assays for angiogenesis. In: MURRAY, J. C. (Ed.). **Angiogenesis protocols**. Totowa: Humana Press, 2001. cap. 10, p. 131-142.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; CHOUDHURI, R.; ZHANG, H. T.; DONNINI, S.; GRANGER, H. J.; BICKNELL, R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 11, p. 2625-2634, 1997.
- ZICHE, M.; MORBIDELLI, L.; MASINI, E.; AMERINI, S.; GRANGER, H. J.; MAGGI, C. A.; GEPPETTI, P.; LEDDA, F. Nitric oxide mediates angiogenesis *in vivo* and endothelial cell growth and migration *in vitro* promoted by substance P. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 2036-2044, 1994.

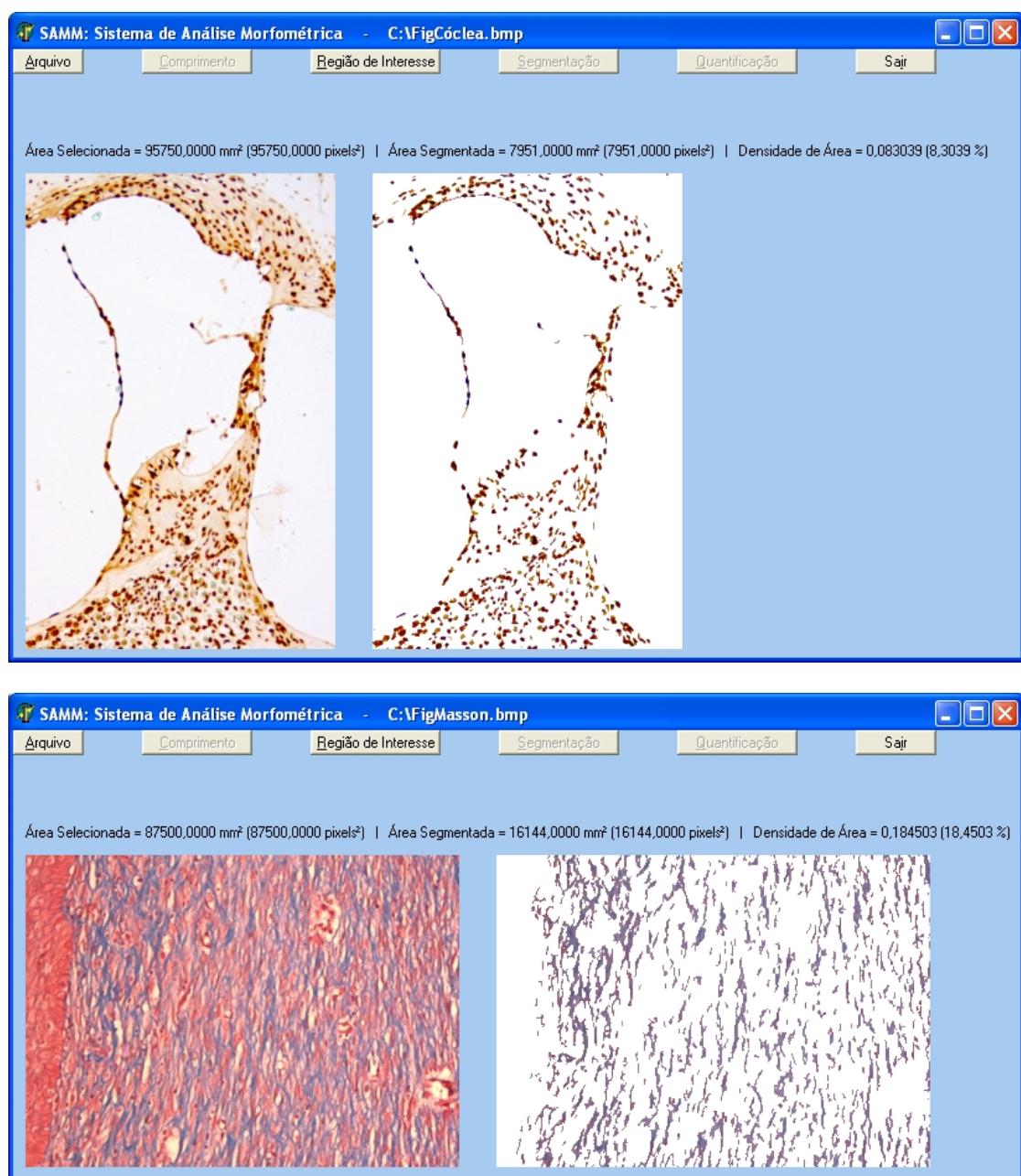
## APÊNDICE A – Quantificação de angiogênese tumoral

O sistema quantifica a resposta neovascular num modelo heterotópico de angiogênese tumoral, que consiste no implante de células tumorais na região subcutânea do dorso de ratos. Após cinco dias, o tumor é removido juntamente com um retalho de pele. A peça é examinada a fresco, após montagem, num microscópio cirúrgico com aumento de 16 vezes, utilizando o filtro verde. Uma câmera acoplada ao microscópio permite a captura de imagens de maneira padronizada. Obtêm-se imagens dos quadrantes superior, inferior, direito e esquerdo, abrangendo uma distância de 10 mm da respectiva borda tumoral. As imagens são então processadas pelo software que segmenta a neovascularização e determina os parâmetros de quantificação de angiogênese: área de neovascularização, comprimento vascular total e número de vasos sanguíneos.



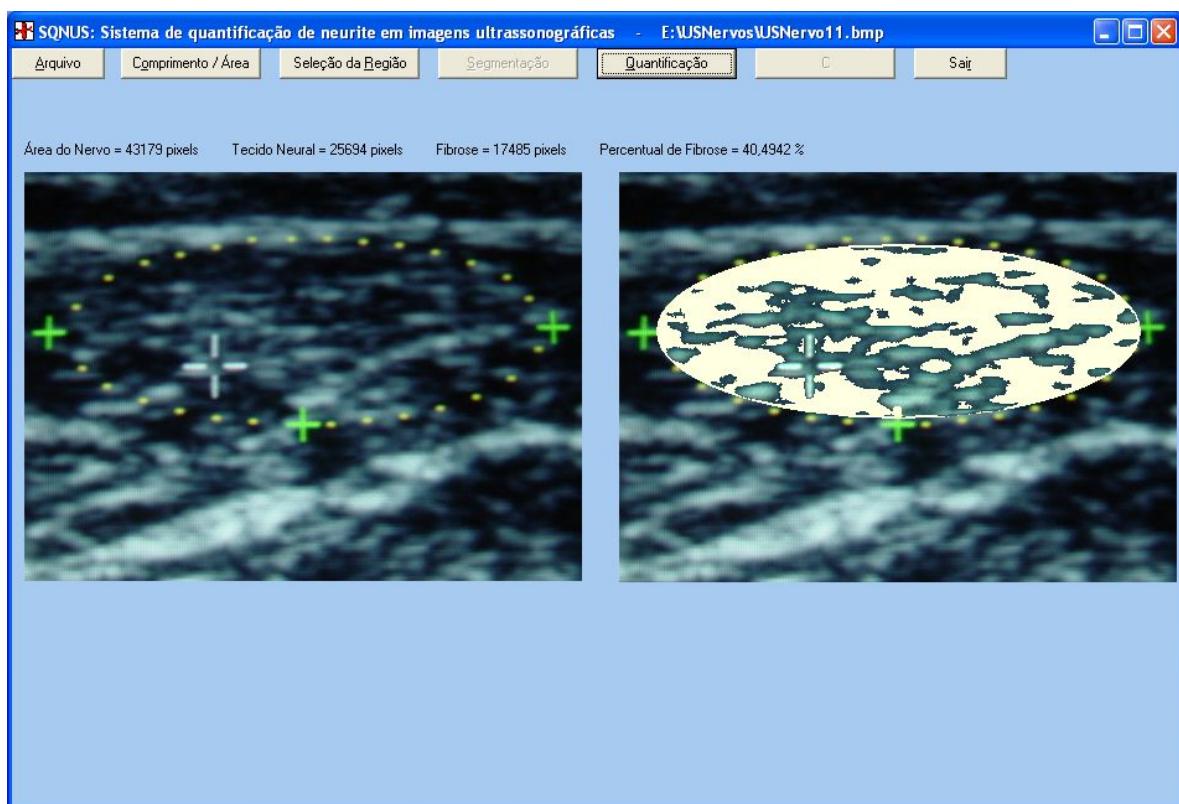
## APÊNDICE B – Sistema para análise morfométrica

O software processa imagens digitais de preparados histológicos, onde as estruturas de interesse estão devidamente rotuladas por técnicas de coloração específicas, como histoquímica e imuno-histoquímica. O sistema segmenta as estruturas de interesse e determina a área por elas ocupada, assim como o seu percentual em relação à área total do campo estudado, que corresponde, pois, à densidade de área. A figura superior mostra a quantificação de células apoptóticas na cóclea de rato rotuladas por imuno-histoquímica. A figura inferior ilustra a quantificação de colágeno numa secção de pele de rato corada pelo tricrômio de Masson.



## APÊNDICE C – Avaliação do comprometimento neural por fibrose em imagens ultra-sonográficas de nervos periféricos

O sistema analisa imagens ultra-sonográficas que representam cortes transversais de nervos periféricos acometidos por hanseníase. As regiões correspondentes a fibrose (áreas hiperecônicas) são identificadas e segmentadas, determinando-se então a área por elas ocupada, assim como o seu percentual em relação à área de secção transversal do nervo. O objetivo é estabelecer, em estudos futuros, parâmetros que determinem o grau de comprometimento do nervo e que, por conseguinte, possam definir o momento apropriado para a realização da descompressão cirúrgica.



## APÊNDICE D – Dados brutos

### **Dados brutos: modelo de angiogênese inflamatória em córnea de coelho**

Comprimento vascular radial ( $C_R$ ), em mm, mensurado pelo método manual em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
0,5000	1,5000	2,4000	2,7000	3,0000	3,0000	3,0000
0,6000	2,0000	2,6000	3,2000	3,5000	3,5000	3,2000
0,5000	1,8000	2,5000	3,1000	3,2000	3,0000	3,0000
0,6000	1,7000	2,0000	2,2000	2,2000	2,5000	2,7000
0,7000	2,3000	2,8000	3,2000	3,0000	2,8000	3,5000
0,5000	1,5000	1,7000	2,0000	1,6000	1,7000	1,7000
0,7000	1,5000	1,5000	2,0000	2,0000	2,0000	2,7000
0,5000	1,5000	1,5000	1,7000	2,0000	2,5000	3,0000
0,5000	1,5000	1,7000	2,0000	2,0000	2,0000	2,2000
0,5000	1,2000	1,5000	1,7000	1,7000	2,0000	2,7000
0,7000	1,2000	1,5000	1,7000	2,4000	2,5000	2,6000
0,3000	1,2000	2,0000	2,4000	3,1000	3,6000	3,9000

Área do triângulo de neovascularização ( $A_T$ ), em  $\text{mm}^2$ , mensurada pelo método manual em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
1,2500	5,6250	9,0000	10,1250	11,2500	11,2500	11,2500
1,8000	8,0000	9,7500	12,8000	14,0000	14,0000	12,8000
1,2500	5,8500	8,7500	10,0750	10,4000	9,7500	9,7500
1,9500	5,5250	7,5000	8,2500	8,2500	9,3750	10,1250
2,4500	9,2000	11,2000	12,8000	12,0000	10,5000	13,1250
1,7500	5,2500	6,3750	7,5000	6,0000	5,9500	6,3750
2,2750	4,5000	3,7500	4,5000	4,5000	4,5000	6,7500
1,3750	4,1250	4,1250	4,6750	5,0000	6,2500	7,5000
1,5000	4,1250	4,6750	5,0000	5,0000	4,5000	4,9500
1,3750	3,3000	4,1250	4,6750	4,6750	5,5000	6,7500
2,2750	3,6000	3,7500	4,2500	6,0000	6,2500	6,5000
0,8250	4,8000	8,0000	8,4000	10,0750	10,8000	10,7250

Área do setor de coroa circular ( $A_S$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método manual em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
2,4712	10,6333	15,5550	16,9526	18,2286	18,2286	18,2286
3,5814	14,5946	16,5002	20,5491	21,7094	21,7094	20,5491
2,4712	10,5096	14,7921	15,7930	16,1193	15,4553	15,4553
3,9153	10,0230	13,5026	14,5558	14,5558	16,0344	16,9526
4,9266	16,2802	18,7978	20,5491	19,7026	17,3914	20,0852
3,5813	9,8095	11,8216	13,5026	11,2342	10,9057	11,8216
4,5278	8,2467	6,7690	7,6879	7,6879	7,6879	10,7917
2,7377	7,4989	7,4989	8,3368	8,5955	10,2072	11,6039
3,0107	7,4989	8,3368	8,5955	8,5955	7,6879	8,2876
2,7377	6,1705	7,4989	8,3368	8,3368	9,5224	10,7917
4,5278	6,7858	6,7690	7,5254	9,9020	10,2072	10,5037
1,6712	9,4573	14,5946	14,3499	15,7930	15,8336	15,0406

Índice angiogênico ( $I_A$ ) calculado pelo método manual em 6 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
1,5000	6,0000	12,0000	13,5000	15,0000	15,0000	15,0000
1,8000	8,0000	13,0000	16,0000	17,5000	17,5000	16,0000
1,0000	7,2000	10,0000	12,4000	16,0000	12,0000	12,0000
1,8000	6,8000	8,0000	11,0000	11,0000	12,5000	10,8000
2,1000	11,5000	14,0000	16,0000	15,0000	11,2000	17,5000
1,5000	6,0000	6,8000	8,0000	8,0000	6,8000	8,5000

Ângulo central de neovascularização ( $A_C$ ), em graus, mensurado pelo método manual em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
49,2500	77,3600	77,3600	77,3600	77,3600	77,3600	77,3600
60,0000	83,6200	77,3600	83,6200	83,6200	83,6200	83,6200
49,2500	65,5900	71,3700	65,5900	65,5900	65,5900	65,5900
65,5900	65,5900	77,3600	77,3600	77,3600	77,3600	77,3600
71,3700	83,6200	83,6200	83,6200	83,6200	77,3600	77,3600
71,3700	71,3700	77,3600	77,3600	77,3600	71,3700	77,3600
65,5900	60,0000	49,2500	44,0500	44,0500	44,0500	49,2500
54,5600	54,5600	54,5600	54,5600	49,2500	49,2500	49,2500
60,0000	54,5600	54,5600	49,2500	49,2500	44,0500	44,0500
54,5600	54,5600	54,5600	54,5600	54,5600	54,5600	49,2500
65,5900	60,0000	49,2500	49,2500	49,2500	49,2500	49,2500
54,5600	83,6200	83,6200	71,3700	65,5900	60,0000	54,5600

Taxa média de angiogênese radial ( $TAR_M$ ), em mm/dia, mensurada pelo método manual em 12 córneas, referente aos intervalos de 3 dias e aos períodos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 e 3 e 21.

3 – 6	6 – 9	9 – 12	12 – 15	15 – 18	18 – 21	3 – 12	12 – 21	3 – 21
0,3333	0,3000	0,1000	0,1000	0,0000	0,0000	0,2444	0,0333	0,1389
0,4667	0,2000	0,2000	0,1000	0,0000	-0,1000	0,2889	0,0000	0,1444
0,4333	0,2333	0,2000	0,0333	-0,0667	0,0000	0,2889	-0,0111	0,1389
0,3667	0,1000	0,0667	0,0000	0,1000	0,0667	0,1778	0,0556	0,1167
0,5333	0,1667	0,1333	-0,0667	-0,0667	0,2333	0,2778	0,0333	0,1556
0,3333	0,0667	0,1000	-0,1333	0,0333	0,0000	0,1667	-0,0333	0,0667
0,2667	0,0000	0,1667	0,0000	0,0000	0,2333	0,1444	0,0778	0,1111
0,3333	0,0000	0,0667	0,1000	0,1667	0,1667	0,1333	0,1444	0,1389
0,3333	0,0667	0,1000	0,0000	0,0000	0,0667	0,1667	0,0222	0,0944
0,2333	0,1000	0,0667	0,0000	0,1000	0,2333	0,1333	0,1111	0,1222
0,1667	0,1000	0,0667	0,2333	0,0333	0,0333	0,1111	0,1000	0,1056
0,3000	0,2667	0,1333	0,2333	0,1667	0,1000	0,2333	0,1667	0,2000

### Dados brutos: método automático de quantificação de angiogênese

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em  $\text{mm}^2$ , mensurada pelo método automático em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
0,5713	2,0672	2,3705	2,6364	2,7701	2,9418	3,1745
0,5845	2,1461	2,4882	2,9127	3,2361	3,4114	3,4176
0,4501	1,7091	2,2763	2,5416	2,7542	2,5921	2,5928
0,5803	1,7327	1,9183	2,2161	2,2916	2,4668	2,6856
0,6745	2,1676	2,4176	2,5222	2,7161	2,7625	2,7777
0,5492	1,4619	1,7105	1,8650	1,9287	2,1766	2,2396
0,8740	1,3047	1,6184	1,7001	1,8199	2,1461	2,9557
0,4917	1,4079	1,4938	1,6877	1,7701	2,2625	2,7015
0,5783	1,6447	2,1309	2,4307	2,4785	2,5159	2,5381
0,6198	1,5983	1,8213	1,8269	1,8927	2,2285	2,5035
0,5332	1,2431	1,6198	1,9543	2,4141	2,7084	2,8012
0,4640	2,0215	3,0783	3,5353	4,2334	4,7493	4,9792

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, mensurado pelo método automático em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
7,2105	28,8158	34,2632	39,3947	40,7368	43,6842	47,4737
8,2632	31,6842	34,9737	43,8421	49,4737	51,9737	50,3158
6,4474	24,8947	32,6842	38,0789	40,3421	37,4737	37,8947
8,1316	24,0526	25,9737	32,4737	32,8947	35,0526	39,5789
9,6579	31,9737	35,1842	37,4737	41,7895	43,0263	43,0789
7,5789	22,0000	24,6579	27,0789	28,5526	31,7105	33,7105
12,6842	21,0263	25,6579	25,6316	28,8421	33,7368	47,2105
6,8947	22,1053	23,9474	26,7105	28,3947	35,9211	44,6579
7,8947	25,6316	34,8158	39,6579	40,0263	41,1579	42,0526
8,3947	25,0526	30,0000	29,7895	30,9474	37,2368	41,9211
7,2895	20,6842	26,8421	31,1579	39,4211	45,2632	47,6579
7,0263	32,5526	52,3947	60,7895	72,3421	78,4474	84,7895

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático em 12 córneas nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia 3	Dia 6	Dia 9	Dia 12	Dia 15	Dia 18	Dia 21
47,0000	179,0000	210,0000	225,0000	221,0000	239,0000	255,0000
60,0000	187,0000	205,0000	252,0000	244,0000	296,0000	279,0000
46,0000	155,0000	157,0000	213,0000	257,0000	215,0000	202,0000
66,0000	162,0000	187,0000	164,0000	187,0000	198,0000	246,0000
76,0000	203,0000	191,0000	209,0000	217,0000	232,0000	222,0000
52,0000	173,0000	159,0000	164,0000	169,0000	188,0000	190,0000
98,0000	143,0000	168,0000	136,0000	176,0000	218,0000	239,0000
52,0000	148,0000	160,0000	167,0000	158,0000	220,0000	243,0000
51,0000	155,0000	235,0000	271,0000	228,0000	231,0000	267,0000
62,0000	162,0000	197,0000	212,0000	167,0000	211,0000	239,0000
60,0000	136,0000	132,0000	183,0000	217,0000	241,0000	237,0000
46,0000	209,0000	328,0000	350,0000	419,0000	466,0000	473,0000

Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , mensurada pelo método automático em 12 córneas, referente aos intervalos de 3 dias e aos períodos entre os dias 3 e 12, 12 e 21 e 3 e 21.

3 – 6	6 – 9	9 – 12	12 – 15	15 – 18	18 – 21	3 – 12	12 – 21	3 – 21
0,4986	0,1011	0,0886	0,0446	0,0572	0,0776	0,2295	0,0598	0,1446
0,5205	0,1140	0,1415	0,1078	0,0584	0,0021	0,2587	0,0561	0,1574
0,4197	0,1891	0,0884	0,0709	-0,0540	0,0002	0,2324	0,0057	0,1190
0,3841	0,0619	0,0993	0,0252	0,0584	0,0729	0,1818	0,0522	0,1170
0,4977	0,0833	0,0349	0,0646	0,0155	0,0051	0,2053	0,0284	0,1168
0,3042	0,0829	0,0515	0,0212	0,0826	0,0210	0,1462	0,0416	0,0939
0,1436	0,1046	0,0272	0,0399	0,1087	0,2699	0,0918	0,1395	0,1157
0,3054	0,0286	0,0646	0,0275	0,1641	0,1463	0,1329	0,1126	0,1228
0,3555	0,1621	0,0999	0,0159	0,0125	0,0074	0,2058	0,0119	0,1089
0,3262	0,0743	0,0019	0,0219	0,1119	0,0917	0,1341	0,0752	0,1047
0,2366	0,1256	0,1115	0,1533	0,0981	0,0309	0,1579	0,0941	0,1260
0,5192	0,3523	0,1523	0,2327	0,1720	0,0766	0,3413	0,1604	0,2508

Valores das variáveis área de neovascularização ( $A_N$ ), comprimento vascular total ( $C_T$ ) e número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) obtidos pelos métodos manual (*Man*) e automático (*Aut*) em 50 subimagens de tamanho 20 x 20 pixels.

Subimagem	$A_N$ ( <i>Man</i> )	$A_N$ ( <i>Aut</i> )	$C_T$ ( <i>Man</i> )	$C_T$ ( <i>Aut</i> )	$N_V$ ( <i>Man</i> )	$N_V$ ( <i>Aut</i> )
1	0,0741	0,0644	1,0526	1,1053	4,0000	4,0000
2	0,0616	0,0602	1,0000	1,0263	2,0000	2,0000
3	0,0755	0,0658	1,2895	1,2368	6,0000	7,0000
4	0,0693	0,0651	1,0000	1,0000	5,0000	2,0000
5	0,0582	0,0547	0,8421	0,7368	2,0000	3,0000
6	0,0651	0,0616	1,0263	1,0789	3,0000	3,0000
7	0,0755	0,0727	1,3947	1,2632	3,0000	4,0000
8	0,0589	0,0596	1,0526	1,0000	5,0000	3,0000
9	0,0589	0,0589	1,0000	0,9474	2,0000	2,0000
10	0,0651	0,0616	1,0526	1,0526	5,0000	4,0000
11	0,0596	0,0658	0,9474	1,0000	6,0000	6,0000
12	0,0810	0,0713	1,1316	1,2632	5,0000	5,0000
13	0,0762	0,0727	1,3158	1,3421	6,0000	6,0000
14	0,0492	0,0568	0,8421	0,8421	4,0000	4,0000
15	0,0637	0,0609	1,1842	1,2105	6,0000	6,0000
16	0,0471	0,0499	0,7368	0,7368	5,0000	5,0000
17	0,0623	0,0637	1,0263	1,0000	6,0000	5,0000
18	0,0568	0,0630	1,2105	1,2105	6,0000	4,0000
19	0,0568	0,0602	0,9737	1,0000	2,0000	2,0000
20	0,0630	0,0609	1,0789	1,1579	4,0000	3,0000
21	0,0741	0,0776	1,3684	1,3421	5,0000	5,0000
22	0,0679	0,0672	1,1316	1,1842	4,0000	4,0000
23	0,0755	0,0651	1,1842	1,1579	4,0000	3,0000
24	0,0568	0,0547	0,8947	0,8684	5,0000	5,0000
25	0,0547	0,0533	0,7895	0,8421	5,0000	5,0000
26	0,0693	0,0693	1,3158	1,2105	5,0000	3,0000
27	0,0568	0,0561	0,9737	1,0526	2,0000	2,0000
28	0,0686	0,0651	1,1842	1,1842	5,0000	5,0000
29	0,0596	0,0609	0,9211	1,0789	4,0000	5,0000
30	0,0492	0,0589	0,7632	0,9211	1,0000	3,0000
31	0,0526	0,0568	0,9211	0,8421	5,0000	4,0000
32	0,0589	0,0561	0,9211	1,0263	3,0000	2,0000
33	0,0644	0,0575	1,0526	1,0263	7,0000	7,0000
34	0,0713	0,0713	1,3684	1,4474	7,0000	5,0000
35	0,0810	0,0741	1,5000	1,5000	2,0000	3,0000
36	0,0644	0,0637	1,2105	1,2632	6,0000	6,0000
37	0,0713	0,0658	1,2105	1,2105	4,0000	3,0000
38	0,0686	0,0693	1,1316	1,1316	6,0000	6,0000
39	0,0748	0,0713	1,2895	1,1579	4,0000	3,0000
40	0,0679	0,0609	1,1579	1,1579	3,0000	3,0000
41	0,0748	0,0686	1,3947	1,2895	3,0000	3,0000
42	0,0769	0,0686	1,2895	1,1316	2,0000	4,0000
43	0,0713	0,0686	1,1316	1,1316	4,0000	7,0000
44	0,0575	0,0589	0,9474	1,0000	4,0000	4,0000
45	0,0672	0,0596	1,0789	1,0789	2,0000	3,0000
46	0,0512	0,0526	0,8158	0,8421	3,0000	1,0000
47	0,0547	0,0561	0,9211	0,8947	3,0000	3,0000
48	0,0478	0,0554	0,9737	0,9737	3,0000	2,0000
49	0,0679	0,0637	1,5263	1,2632	3,0000	4,0000
50	0,0824	0,0699	1,4211	1,4211	6,0000	6,0000

**Dados brutos: avaliação do efeito de fármacos antiangiogênicos no modelo de angiogênese corneana inflamatória utilizando o método automático**

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 3.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
0,8740	0,0914	0,5637	0,2355	0,4197	0,2832
0,4917	0,1330	0,6073	0,3698	0,4605	0,3816
0,5783	0,1870	0,6759	0,4460	0,2860	0,3864
0,6198	0,2909	0,3033	0,2971	0,4661	0,1807
0,5332	0,1337	0,3539	0,3927	0,3123	0,0519
0,4640			0,1073		

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 6.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
1,3047	0,1683	1,4868	1,0035	1,2708	1,1032
1,4079	0,1856	1,1468	1,1780	1,9252	0,9584
1,6447	0,2825	1,6794	1,1842	0,9578	1,5132
1,5983	0,6731	0,5976	1,4148	1,2985	0,6925
1,2431	0,1420	0,6184	1,3733	1,2680	0,6856
2,0215			1,0976		

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 9.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
1,6184	0,1801	1,8954	1,0589	1,3366	1,7285
1,4938	0,1586	1,1489	0,9896	2,1122	1,3913
2,1309	0,3864	2,0713	1,3830	1,3373	2,3663
1,8213	0,7722	0,6295	1,4446	1,6343	1,0353
1,6198	0,1960	0,8220	1,4363	1,1247	1,4176
3,0783			1,3587		

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 12.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
1,7001	0,3047	1,4481	1,0810	1,3580	1,7929
1,6877	0,1510	1,2950	0,8490	2,0429	1,7749
2,4307	0,5928	2,0118	1,2722	1,3573	2,0021
1,8269	0,8400	0,8068	1,2798	1,6066	1,0083
1,9543	0,1704	1,2694	1,2867	1,1240	2,1752
3,5353			1,4391		

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 15.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
1,8199	0,3026	1,2348	1,0769	1,3068	2,1745
1,7701	0,1558	1,4453	0,8670	1,7666	2,2916
2,4785	1,1018	2,0249	1,4301	1,3546	2,0436
1,8927	0,7230	1,0880	1,4079	1,3096	1,5970
2,4141	0,2230	1,0596	1,1544	0,9861	2,9488
4,2334			1,5803		

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 18.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
2,1461	0,2708	1,5249	1,0305	1,3843	2,3082
2,2625	0,1904	2,1357	0,9619	1,7237	2,7798
2,5159	1,3532	1,9418	1,2735	1,3560	2,0893
2,2285	0,5561	1,3463	1,1690	1,0042	1,7036
2,7084	0,2999	0,9702	1,0533	0,6877	3,3102
4,7493			1,8435		

Área de neovascularização ( $A_N$ ), em mm<sup>2</sup>, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 21.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
2,9557	0,2888	1,5506	0,9183	1,4744	2,1814
2,7015	0,2008	2,1904	0,9266	1,8954	3,0346
2,5381	1,3075	1,7015	1,3082	1,3006	1,9384
2,5035	0,6177	1,7029	1,2895	0,9584	1,8241
2,8012	0,2195	0,9861	0,9688	0,6863	3,5914
4,9792			1,8580		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 3.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
12,6842	1,6316	8,2105	3,7368	6,1053	3,9474
6,8947	1,9474	9,5526	4,8421	6,7632	5,9211
7,8947	2,4211	9,6053	6,8684	4,0526	6,4211
8,3947	3,8684	3,8421	4,6316	6,9737	3,1053
7,2895	2,1842	5,3684	5,5263	4,8947	0,8158
7,0263			1,7105		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 6.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
21,0263	2,9474	24,3684	16,0000	19,3947	17,2632
22,1053	2,9474	18,8684	17,9211	31,5526	15,5526
25,6316	4,5263	28,2105	19,1316	15,1316	25,8947
25,0526	11,0526	8,9737	22,7632	21,5263	11,5000
20,6842	2,0526	10,1579	22,6842	19,1316	11,1579
32,5526			17,9737		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 9.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
25,6579	2,8947	32,1579	18,0526	21,3947	29,3947
23,9474	2,6053	19,3158	15,6579	33,6316	23,0526
34,8158	6,7895	36,7895	22,2632	23,1053	37,9474
30,0000	12,0263	9,9211	24,7632	26,7632	16,6842
26,8421	3,1842	13,7632	23,2895	17,5789	24,4737
52,3947			23,8158		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 12.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
25,6316	4,4737	23,8421	18,5263	22,4737	30,7105
26,7105	2,3421	23,2105	13,0789	32,3684	29,6316
39,6579	9,1579	35,4211	21,1579	21,7632	33,3684
29,7895	12,6842	13,4737	21,0000	24,1316	16,2632
31,1579	2,6316	21,2105	21,0526	15,7632	34,5526
60,7895			24,5263		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 15.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
28,8421	4,9674	19,5263	17,6842	21,8947	36,8684
28,3947	2,2895	25,7632	14,1053	28,0789	37,2368
40,0263	17,0263	34,7632	23,8684	22,5000	34,8421
30,9474	11,1579	18,1842	23,3158	20,1842	25,8158
39,4211	4,0526	16,8947	18,3684	15,3421	47,8947
72,3421			25,1053		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 18.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
33,7368	4,4737	24,8947	16,9211	23,5000	38,9474
35,9211	3,2368	36,3947	14,7632	28,5263	45,2632
41,1579	21,3947	33,0263	21,4737	22,2368	35,1053
37,2368	8,7632	23,0789	17,6842	15,9474	27,3947
45,2632	4,9474	15,8947	16,6842	10,0789	55,2632
78,4474			30,4737		

Comprimento vascular total ( $C_T$ ), em mm, calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 21.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
47,2105	4,2105	25,8947	14,0526	24,1842	35,9737
44,6579	3,0526	35,8947	14,0000	31,4211	49,8158
42,0526	20,6316	29,1842	21,4474	21,3421	33,2368
41,9211	9,9211	28,5789	20,2105	16,2895	28,9474
47,6579	3,6316	15,8158	15,5000	10,9211	59,2105
84,7895			30,6053		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 3.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
98,0000	9,0000	69,0000	28,0000	50,0000	26,0000
52,0000	20,0000	65,0000	30,0000	58,0000	26,0000
51,0000	15,0000	69,0000	37,0000	27,0000	49,0000
62,0000	22,0000	31,0000	41,0000	57,0000	22,0000
60,0000	9,0000	33,0000	35,0000	36,0000	4,0000
46,0000			10,0000		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 6.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
143,0000	20,0000	166,0000	111,0000	130,0000	130,0000
148,0000	24,0000	127,0000	125,0000	196,0000	106,0000
155,0000	32,0000	188,0000	125,0000	118,0000	181,0000
162,0000	80,0000	82,0000	133,0000	128,0000	76,0000
136,0000	18,0000	59,0000	143,0000	137,0000	93,0000
209,0000			115,0000		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 9.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
168,0000	13,0000	195,0000	124,0000	145,0000	231,0000
160,0000	20,0000	133,0000	98,0000	193,0000	140,0000
235,0000	43,0000	205,0000	104,0000	142,0000	243,0000
197,0000	86,0000	76,0000	141,0000	167,0000	126,0000
132,0000	24,0000	84,0000	156,0000	110,0000	164,0000
328,0000			163,0000		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 12.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
136,0000	29,0000	142,0000	121,00000	135,0000	186,0000
167,0000	17,0000	142,0000	92,00000	204,0000	209,0000
271,0000	48,0000	218,0000	115,00000	110,0000	196,0000
212,0000	74,0000	90,0000	112,00000	162,0000	101,0000
183,0000	14,0000	118,0000	129,00000	104,0000	215,0000
350,0000			150,00000		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 15.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
176,0000	35,0000	103,0000	115,0000	129,0000	218,0000
158,0000	18,0000	151,0000	92,0000	187,0000	201,0000
228,0000	110,0000	207,0000	128,0000	119,0000	197,0000
167,0000	83,0000	113,0000	124,0000	137,0000	171,0000
217,0000	20,0000	107,0000	115,0000	90,0000	295,0000
419,0000			148,0000		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 18.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
218,0000	33,0000	127,0000	111,0000	147,0000	204,0000
220,0000	22,0000	228,0000	65,0000	173,0000	254,0000
231,0000	132,0000	183,0000	114,0000	95,0000	214,0000
211,0000	46,0000	154,0000	111,0000	114,0000	153,0000
241,0000	27,0000	73,0000	88,0000	62,0000	332,0000
466,0000			185,0000		

Número de vasos sanguíneos ( $N_V$ ) calculado pelo método automático nos seis grupos de tratamento no dia 21.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
239,0000	22,0000	139,0000	74,0000	134,0000	165,0000
243,0000	22,0000	193,0000	63,0000	166,0000	291,0000
267,0000	129,0000	155,0000	111,0000	111,0000	204,0000
239,0000	56,0000	180,0000	105,0000	96,0000	199,0000
237,0000	23,0000	101,0000	82,0000	66,0000	306,0000
473,0000			193,0000		

Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao intervalo entre os dias 3 e 21, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
0,1157	0,0110	0,0548	0,0379	0,0586	0,1055
0,1228	0,0038	0,0880	0,0309	0,0797	0,1474
0,1089	0,0623	0,0570	0,0479	0,0564	0,0862
0,1047	0,0182	0,0778	0,0551	0,0274	0,0913
0,1260	0,0048	0,0351	0,0320	0,0208	0,1966
0,2508			0,0973		

Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao intervalo entre os dias 3 e 12, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
0,0918	0,0237	0,0983	0,0939	0,1043	0,1677
0,1329	0,0020	0,0764	0,0532	0,1758	0,1548
0,2058	0,0451	0,1484	0,0918	0,1190	0,1795
0,1341	0,0610	0,0559	0,1092	0,1267	0,0920
0,1579	0,0041	0,1017	0,0993	0,0902	0,2359
0,3413			0,1480		

Taxa média de angiogênese superficial ( $TAS_M$ ), em  $\text{mm}^2/\text{dia}$ , referente ao intervalo entre os dias 12 e 21, mensurada pelo método automático nos seis grupos de tratamento.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
0,1395	-0,0018	0,0114	-0,0181	0,0129	0,0432
0,1126	0,0055	0,0995	0,0086	-0,0164	0,1400
0,0119	0,0794	-0,0345	0,0040	-0,0063	-0,0071
0,0752	-0,0247	0,0996	0,0011	-0,0720	0,0906
0,0941	0,0055	-0,0315	-0,0353	-0,0486	0,1574
0,1604			0,0465		

Intensidade do efeito antiangiogênico ( $IEA$ ), expressa em termos percentuais, referente aos cinco fármacos avaliados, verificada nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21, após a cauterização.

Dia	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
3	71,8281	15,6192	48,0876	34,4735	56,7313
6	81,1089	28,0406	21,3509	12,5334	35,5372
9	82,7229	33,0035	34,7837	23,0259	19,0063
12	81,1895	37,5936	45,1261	31,5823	20,0301
15	79,4151	43,7120	48,5461	44,7716	9,1876
18	80,7080	42,7921	55,8606	55,5283	11,9306
21	82,8923	47,1963	60,6611	58,9922	18,3740

Variação de peso ( $VP$ ), expressa em termos percentuais, referente aos seis grupos de tratamento.

Controle	Prednisona	Talidomida	AAS	Etoricoxib	Celecoxib
4,9167	-6,4608	-0,2644	-2,5836	3,8402	-3,8002
1,8969	-6,7192	-1,0173	3,9979	-3,7120	-0,3538
2,3565	-0,7524	-0,9556	13,3077	-6,3085	-7,4386
0,0000	-1,4861	2,7820	-2,2801	5,2832	-0,4141
1,1593	-9,9641	-5,4357	2,8281	-13,2515	-6,0581
-1,9815			3,9116		

**ANEXO A – Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA)**

Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodlfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 288-8338 Fax (85) 288-8333

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 07/03, sobre o projeto intitulado **“Segmentação e quantificação de angiogênese em córneas de coelho através de processamento de imagens”**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em reunião realizada em 10 de dezembro de 2003.

Fortaleza, 06 de agosto de 2004

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gisela Costa Camarão".

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA