

ADERSON GEGLER

**APLICAÇÃO DE SISTEMAS MORFOMÉTRICOS BIDIMENSIONAL E  
TRIDIMENSIONAL E ANÁLISE HEMODINÂMICA EM MODELOS DE  
CORROSÃO VASCULAR**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Alois Lametschwandtner

Porto Alegre

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

G299a      Gegler, Aderson  
Aplicação de sistemas morfométricos bidimensional e tridimensional e análise hemodinâmica em modelos de corrosão vascular / Aderson Gegler. – 2007.  
150 f. : il.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Estomatologia Clínica, Porto Alegre, 2007.

Orientadora: “Profa. Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza”.

Co-orientador: “Prof. Dr. Alois Lametschwandtner”.

1. Molde por corrosão 2. Análise quantitativa 3. Microscopia eletrônica de varredura 4. Vasos sanguíneos 5. Morfologia 6. Glândula submandibular I. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia II. Título.

CDU 616.314

Bibliotecária: Eloisa Futuro Pfitscher CRB 10/598

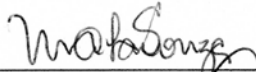
ADERSON GEGLER

**APLICAÇÃO DE SISTEMAS MORFOMÉTRICOS BIDIMENSIONAL E  
TRIDIMENSIONAL E ANÁLISE HEMODINÂMICA EM MODELOS DE  
CORROSÃO VASCULAR**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

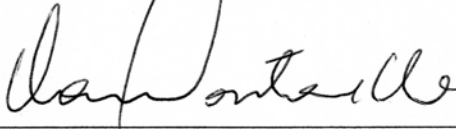
Aprovada em 6 de dezembro de 2007

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza - PUCRS




---

Profa. Dra. Vania Fontanella - UFRGS



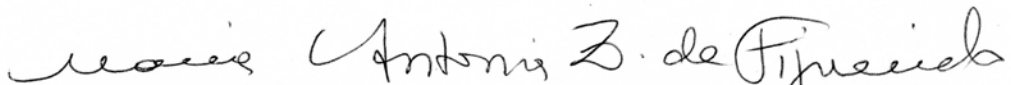
---

Profa. Dra. Leticia Algarves Miranda - PUCRS



---

Prof. Dr. Léder Leal Xavier - PUCRS



---

Profa. Dra. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo - PUCRS

# ***AGRADECIMENTOS***

---

## AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que propiciou meus estudos neste Curso de Doutorado. Uma universidade em busca de qualidade de ensino e pesquisa, que investe em laboratórios, biblioteca e parcerias, fomentando o crescimento científico de seus alunos e professores, diferenciando-se de outras universidades privadas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Faculdade de Odontologia, pela minha formação de graduação e mestrado, com uma educação gratuita e, apesar dos esforços em contrário dos últimos governos, de qualidade. E também pela prazerosa possibilidade de novamente utilizar seus laboratórios e recursos humanos no Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

Salzburg Universität, Naturwissenschaftliche Fakultät und Organismische Biologie Fachbereich, für erlauben die Verwendung Ihrer Laboratorien. Eine Ort, der ich vermissen werde.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por poder ter participado do Programa de Bolsas de Doutorado e do Programa de Estágio de Doutorado no Exterior –Doutorado Sandwich.

Ao Hospital São Lucas da PUCRS, local onde pude passar por um importante período de aprendizado durante o Curso de Doutorado, no Serviço de Estomatologia e Prevenção do Câncer Bucal.

Aos pacientes do Serviço de Estomatologia do HSL – PUCRS, por deixarem que eu aprendesse, me ajudando quando eram eles que precisavam de ajuda. Obrigado pela confiança, espero ter sido útil.

À Professora Dra Nilza Pereira da Costa, Coordenadora do Programa de Doutorado em Odontologia, que apesar de todas as suas atribuições, sempre tem tempo para

ouvir. Obrigado por ter possibilitado a realização de um Doutorado Sandwich e ser um exemplo de dedicação.

Um dia eu quis trabalhar com uma Professora, não foi possível, mas em outro minha hora chegou. Todas as minhas expectativas foram superadas. Professora Dra Maria Antonieta, obrigado pela oportunidade de trabalhar com a pessoa maravilhosa que és. Pela oportunidade e incentivo para trabalhar em um laboratório com recursos físicos e humanos de ponta e pela experiência de viver fora do País. Obrigado pela confiança que tivestes desde o princípio e que me proporcionou liberdade para procurar um caminho, que no final me foi muito proveitoso. Obrigado por não exigir comprovações de competência ao longo da caminhada. Obrigado pelo carinho quando estávamos distante e por me fazer sentir-me da família. Obrigado por ter trabalhado nos bastidores aqui no Brasil para que minha vida fosse mais fácil na Áustria. Penso que orientar é criar desafios, e foi exatamente isso que a Senhora fez o tempo todo, sempre instigando a busca pelo conhecimento. Muito obrigado.

Às Professoras da Estomatologia, Dra Liliane Yurgel, Dra Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo, Karen Cherubini e Fernanda Salum, pelas contribuições ao meu crescimento científico.

À Professora Liliane Yurgel, pela compreensão nos meus tempos de correria, pelos ensinamentos clínicos, pelo incentivo para partir para uma temporada fora e pela Bolsa de Doutorado Sandwich.

Às Professoras Dra Maria Martha Campos e Dra Liliane Yurgel, pelas prestimosas contribuições ao trabalho na fase de pré-defesa.

À Frau Professora Dra Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo, pela amizade e pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos difíceis em que tudo estava longe, inclusive o final do doutorado. Obrigado ao Herr Professor Dr José Antonio Poli de Figueiredo e toda a sua família.

A.o.Univ.Prof. Mag. Dr Alois Lametschwandtner, danke für empfangen uns in Ihrem Laboratorium, für die Geduld beim Lehren uns alle über Korrosionspräparaten und Rasterelektronenmikroskopie, für die philosophischen Besprechungen über Lehre während

der kurzen Pausen. Danke für das Vertrauen, die Freundschaft und die liebenswürdige Hingabe.

A.o.Univ.Prof. Mag. Dr Bernd Minnich, danke für die Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie, der 3D-Morphometry Software und der Laboratoriumsarbeit.

A.o.Univ.Prof. Mag. Dr Wolf-Dietrich Krautgartner, danke für die Hilfe bei der Rasterelektronenmikroskopie und die Geduld nach allein den verbranten Staubfäden.

Synnöve Tholo, danke für die unermessliche Hilfe bei der Laboratoriumsarbeit, besonders bei den Bildern in der 3D-Morphometry Software, für organisieren die Agenda, als unsere Zeit zu wenig war und für die Förderung.

Ao Prof Dr Felipe Schneider, pela acolhida no Laboratório de Neuroanatomia da UFRGS, pelas suas idéias e ensinamentos sobre a técnica de corrosão vascular e microscopia eletrônica de varredura.

Ao Biólogo Antonio Generoso Severino, o Toninho, obrigado pela inestimável ajuda e incansável trabalho na parte técnica desta pesquisa. Sem a sua mão e as suas idéias nada disso teria sido possível.

A Sílvia Pithan, pela ajuda na organização da viagem, artigos, livros, conhecimento, mas principalmente pela amizade. Obrigado por ter respondido a todos os infinitos e-mails cheios de dúvidas!!

A minha sempre orientadora e Amiga Vania Fontanella, obrigado pelo incentivo e pelo carinho. A minha caminhada profissional sempre teve a tua mão como guia e a tua postura como exemplo. Este trabalho certamente tem muito de ti (espero que gostes).

Ao Professor e Amigo João Batista Burzlaff, alguém que sempre tem a pergunta certa para fazer as pessoas pensarem. Obrigado pelo exemplo de Mestre, de Profissional e de Ser Humano.



À Juliana, obrigado pela força que você transmite, pelo bom humor, pela companhia, pela árdua dedicação ao trabalho, pelas intermináveis horas compartilhadas no laboratório, pelas longas discussões científicas e políticas, pelos ensinamentos germanogramaticais, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, pela paciência dispensada nestas horas e por tornar tudo mais fácil e compreensível. Obrigado por existir em minha vida.

A minha Mãe, Sirlei, pela dedicação incondicional, pela confiança, pelo apoio, amor, pelo incentivo ao longo de toda a minha vida,... ...obrigado por ser minha Mãe.

Ao meu Pai, Canísio, grande amigo que sempre me depositou confiança. Obrigado pelo exemplo de trabalho.

A minha irmã, Magali, por manter o *statu quo* enquanto estive fora. Obrigado por sempre estar ao meu lado.

À Família Gazolla, Germano, Marieta e Caro, sempre apoiando e incentivando novos projetos.

Aos colegas do Curso Doutorado em Estomatologia, Alexandre Futterleib, Alisson Fonseca, Carolina Fernandes e Mariana Palmeiro. Obrigado pelo convívio, grandes amigos deixam lembranças para toda uma vida.

Ao amigo Diego Veronese Saldanha, grande incentivador da finalização desta tese. Obrigado pela gerência administrativa, financeira e legal no período em que estive fora. Fizeste um ótimo trabalho. Obrigado por poder te chamar de Amigo.

Aos meus amigos e colegas de consultório, Altemir Ferreira e Antonio Furlan dos Santos, sempre disponíveis e compreensivos.

Cristine Radner, Monika Höll, Vicktoria Engelhardt, Peter Steinbacher and Robert Schabetsberger and Walter Stoiber, ich danke euch für die Aufnahme und die entspannenden Momente.

Dr Herbert Köstler, danke für machen uns fühlen wie zu Hause.

To the Prof. Dr. Vipavee Anupunpisit, thank you so much for your advices on the scanning electron microscopy.

Aos amigos Ana Lúcia Silveira Prestes, Davenir Menger Bruch, Marcos Caetano Correa e Carlos Eduardo Minossi, sempre disponíveis nas horas de dúvidas. Obrigado por terem torcido para que tudo desse certo.

Aos amigos, parafraseando um deles, quem tem amigos tem tudo.

À verdadeira Odontologia, aquela livre de mercado de trabalho, de planos de saúde ávidos por lucros irresponsáveis, de situação econômica nacional que não permite o acesso da grande maioria da população, de profissionais que a pensam como comércio, de instituições que pensam o ensino como comércio (talvez o maior dos erros de uma instituição de ensino), livre de “política acadêmica”. Obrigado pelo seu encantamento.

Ao Meu País, que mesmo tendo..... mensalões, Robertos Jefersons, Renans Calheiros, Josés Dirceus, Joãos de Deuses, Genuínos não tão genuínos, Lulas, uma Câmara dos Deputados corrupta que não defende os interesses de quem estão representando, um Senado atônito e horrorizado pelo seu presidente (desta vez do Senado) que têm seus componentes nas mãos. que têm duas tribunas que ainda hoje permitem o voto secreto em questões do mais alto interesse público, que tem uma das mais altas cargas tributárias do mundo impedindo o país de crescer, que tem como presidente alguém que faz apologia à ignorância irrestrita por meio de sua política educacional (vide Veja – o PT Emburreceu o País), com o intuito final de manipulação eleitoral, que sequer exige que embaixadores sejam bilíngües, que não me permite recordar de sequer um caso de corrupção punido exemplarmente, que tem um governo que deve à nação reformas fiscal, política, educacional e administrativa, que quer separar por cotas quando o momento é de unificar, que demora para investir em energia, impedindo o país de crescer, que quer administrar petróleo, minério, bancos, quando não consegue suprir saúde, educação, segurança pública nem saneamento básico, um país onde o medo é mais comum do que a segurança e que possui um governo que quer fazer as pessoas acreditarem que isso é normal, que tem um governo que luta para manter impostos provisórios quando deveria reformar o país trabalhista e tributariamente,

fazendo a sociedade pagar a conta com altos índices de desemprego e informalidade, que tem uma previdência falida por falta de administração eficiente e excesso de roubo, que superfatura obras, que possui órgãos competentes (que ironia essa palavra aqui) que permitem a construção de pontes que ligam Nada a Lugar Nenhum, um país com um sistema penitenciário falido, que passa longe do seu maior objetivo, que é a reestruturação do indivíduo à convivência em sociedade, onde a irresponsabilidade de um sistema aéreo falido assassina centenas de pessoas e continua funcionando, onde existe um Senado Federal que ainda permite sessões a portas fechadas para tentar omitir a vergonha de uma decisão indigna... ...me fez ter uma vontade irremediável e incrível de voltar quando estive longe. Esse país só pode ser uma terra mágica.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta pesquisa.

Obrigado.

***EPÍGRAFE***

---



Phantasie ist wichtiger als Wissen,  
denn Wissen ist begrenzt.

*Albert Einstein*

# *APRESENTAÇÃO*

---

## APRESENTAÇÃO

Esta tese é apresentada dentro de um modelo em que o paradigma está centrado nas necessidades atuais de divulgação de conhecimento e produção científica. Os pesquisadores têm sido mais exigidos quanto a suas publicações e divulgação de seus resultados. Objetiva-se que o aluno de pós-graduação participe da construção de uma linha de pesquisa e não seja apenas inserido dentro da mesma, tornando-se também responsável pelo seu crescimento e desenvolvimento, a partir do seu envolvimento em diversas pesquisas onde ele possa observar a evolução da linha de pesquisa. Esta forma de apresentação é utilizada nas escolas européias já há algumas décadas e tem sido introduzida em algumas escolas brasileiras, sendo vista como uma forma mais dinâmica de estudo e compartilhamento do conhecimento.

Dessa forma, esta tese foi estruturada apresentando 3 artigos dentro de uma mesma linha de pesquisa, de forma a dinamizar a sua divulgação e fazer com que o aluno desenvolva uma capacidade crítica de vivência no desenvolvimento da linha de pesquisa.

O primeiro artigo é uma revisão de literatura sobre análise quantitativa de sistemas circulatórios, enviada para publicação em uma revista nacional, com intuito de divulgação da técnica no país. O segundo artigo é uma proposição de um novo método de morfometria bidimensional para modelos de corrosão vascular associada à microscopia eletrônica de varredura, desenvolvido como uma alternativa aos sistemas tridimensionais, devido ao seu custo relativamente alto para alguns centros de pesquisa nacionais. Já no terceiro artigo, glândulas salivares de ratos foram mensuradas por meio de um sistema de

morfometria tridimensional para posterior comparação com conceitos hemodinâmicos dos princípios ideais de ramificação arterial, revisados no primeiro estudo. Neste último, foram utilizados os mais avançados sistemas disponíveis, bem como a fundamentação teórico-científica vigente no que tange a avaliação dos espécimes. Cabe ressaltar que os artigos encontram-se formatados de acordo com as normas de publicação dos respectivos periódicos aos quais foram enviados.

Esta tese é produto de pesquisas realizadas no Programa de Doutorado em Odontologia (Área de concentração Estomatologia), financiadas pelo Programa de Bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) na Universidade no País (42005019022D9) e do Programa de Bolsas de Estágio de Doutorado no Exterior – Doutorado Sandwich – (BEX1335-06-5 – Anexos A, B e C). O país de escolha foi a Áustria, na Universidade de Salzburg (Salzburg Universität – Anexo D), por ser um centro de referência na área de Biologia Vascular, o qual se encontra sob a supervisão do Univ.Prof. Mag. Dr. Alois Lametschwandtner, Chefe do Departamento de Biologia dos Organismos (Organismische Biologie Fabereich) da Faculdade de Ciências Naturais (Naturwissenschaftliche Fakultät). O período programado para desenvolvimento das atividades no exterior foi de seis meses, o qual foi concluído com êxito.

Os locais de realização das pesquisas foram, parte no Brasil, no Programa de Doutorado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob a orientação da Prof. Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza e colaboração de Prof. Dra. Karen Cherubini, Prof. Dr. Leo Kraether Neto, Prof. Dra. Maristela de Borba, no Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com a colaboração do Prof. Dr.



Felipe Luis Schneider e do Biólogo Antonio Severino, e parte na Áustria, no Departamento de Biologia dos Organismos (Organismische Biologie Fachbereich) da Faculdade de Ciências Naturais (Naturwissenschaftliche Fakultät), da Universidade de Salzburg (Universität Salzburg), sob a co-orientação do Univ.Prof. Mag. Dr. Alois Lametschwandtner e colaboração da Me. Juliana Gazolla, do A.o.Univ.Prof. Mag. Dr. Bernd Minnich e da técnica assistente Synnöve Tholo.

***RESUMO***

---

## RESUMO

O estudo de modelos de corrosão vascular por microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta útil na abordagem micro-anatômica de sistemas vasculares, porém estudos quantitativos não são frequentemente desenvolvidos. Este trabalho é composto por três estudos nesta área de corrosão vascular e microscopia eletrônica de varredura, com ênfase em sistemas de quantificação.

No primeiro artigo foi realizada uma revisão de literatura sobre o tema. Foram abordados métodos de avaliação quantitativa bidimensionais (2D), tridimensionais (3D), princípios teóricos ideais baseados em mínimo volume luminal, força de bombeamento sanguíneo, superfície luminal e força de atrito, bem como de sistemas circulatórios de distribuição e de entrega. Para o entendimento desses sistemas vasculares e a avaliação de suas características hemodinâmicas foram abordados também conceitos fundamentais de mensurações não-dimensionais, como o índice de bifurcação e a razão de área.

O segundo trabalho consiste em uma nova proposta para análises quantitativas de sistemas vasculares. São comparadas duas ferramentas de avaliação 2D realizadas por meios de programas de computadores, o laço magnético e o *threshold*, a um padrão-ouro. Ambos superestimam a quantidade de vasos presentes no sistema, porém o laço magnético tem uma aproximação maior da realidade, quando se avaliam redes vasculares que tendem a ser planas.

Já no terceiro estudo, glândulas submandibulares de ratos Wistar foram, pela primeira vez, mensuradas quanto a ângulos e diâmetros de toda a árvore vascular. Os resultados foram avaliados à luz dos princípios teóricos ideais revisados no primeiro artigo e mostram não haver uma associação direta entre o sistema estudado e qualquer deles. Porém, esse resultado deve ser interpretado levando-se em consideração o baixo custo de energia despendido pelo organismo, relatado na literatura, em consequência de sistemas que não aderem aos princípios teóricos.

A união destes estudos permite concluir que poderosas ferramentas para estudos na área vascular estão disponíveis hoje e, ainda que pouco utilizadas, podem ser aplicadas a diferentes tecidos, órgão ou espécies, sendo eles sadios ou alterados, com o intuito de se obter conhecimento vascular fisiológico e anatômico.

**Palavras-chave:** Molde por Corrosão. Análise Quantitativa. Microscopia Eletrônica de Varredura. Vasos Sanguíneos. Morfologia. Glândula Submandibular.

# ***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

Vascular corrosion casts on scanning electron microscopy (SEM) studies is a useful tool for assessing vascular system micro-anatomically. However, quantitative evaluation of those systems are uncommon in the scientific literature. This thesis work is composed by three articles on the field of vascular corrosion casts and SEM, focusing on quantification systems.

The first paper is a literature review about the subject. Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) methods of quantification, as well as theoretical optimal principles based on minimum luminal volume, pumping power, luminal surface and drag force were approached. Distribution and delivering circulatory systems were also explained. In order to comprehend these vascular systems and to assess their hemodynamic characteristics, fundamental concepts of non-dimensional measurements, as bifurcation index and area ratio, were assessed.

In the second work, a new 2D quantitative evaluation mode of vascular systems is proposed. Two quantitative 2D tools, based on computer-aid, are compared to a gold-standard. Both, the magnetic lasso and the threshold overestimate the vessels density, however, magnetic lasso remains closer to the true, in relatively flat vascular networks.

In the third research, for the first time submandibular glands of Wistar rats had all vascular tree measured, concerning to bifurcation angles and diameters. Outcomes were assessed regarding to the theoretical optimal principles, reviewed on the first paper. There was no clear association between the health salivary gland system and any of those optimal ones. However, the low energy cost wasted by systems who does not work under the optimal principles should be considered.

The pool of these studies allow to conclude that a powerful tool research for the vascular field is now available, although not widely used, might be applied to different tissues, organs or specimens, healthy or not, with the intention of reach physiological and anatomical vascular knowledge.

**Key words:** Corrosion Casting. Quantitative Analysis. Scanning Electron Microscopy. Blood Vessels. Morphology. Submandibular Gland.

***LISTAS***

---

## LISTA DOS ARTIGOS APRESENTADOS E STATUS

### ARTIGO I

Métodos de análise quantitativa aplicados a modelos de corrosão vascular: revisão de literatura.

*Methods of quantitative analysis applied to vascular corrosion casts: a literature review.*

Aderson Gegler, Juliana Gazolla, Maria AL de Souza

Aceito para publicação (vol. 41/2008) : Revista Medicina – Ribeirão Preto 44

(Anexo E)

### ARTIGO II

Estimation of vascular areas in scanning electron micrographs of microvascular corrosion casts by 2D-morphometry: a comparison of the magnetic lasso tool (Adobe Photoshop® 7.0) and the threshold tool (UTHSCSA ImageTool® 3.0)

Gegler A, Lametschwandtner A, Cherubini K, Borba MG, Souza MAL

Em revisão: Journal of Microscopy (Anexos F e G) 70

### ARTIGO III

Three-dimensional arrangement and hemodynamic characteristics of the microvasculature of the rat submandibular gland: a scanning electron microscope and 3D-morphometry study of vascular corrosion casts

Gegler A, Lametschwandtner A, Gazolla J, Kraether Neto L, Souza MAL

Em preparação (Anexo H) 90

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO II

Table 1: Area (pixels) of the superficial vascular layer. Means of the vascular area and their respective standard deviation for groups A, B, C and D. ....	86
---	----

### ARTIGO III

Table 1: Luminal diameters ( $\mu\text{m}$ ) of arteries and capillaries of the submandibular gland of adult Wistar rats.....	115
---	-----

Table 2: Bifurcation index ( $\alpha$ ), total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) and area ratio ( $\beta$ ) of arteries and capillaries of the submandibular gland of adult Wistar rats.....	115
---	-----

Table 3: Bifurcation index ( $\alpha$ ), total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) and area ratio ( $\beta$ ) of arteries and capillaries of five submandibular glands of adult Wistar rats.....	116
---	-----

Table 4: Mean of distance between measured values of total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of arterial and capillaries bifurcations of the adult Wistar rats submandibular glands from the lines representing optimality principle of Minimum Lumen Volume (LV) and Minimum Pumping Power (PP) or Minimum Lumen Surface (LS) and Minimum Shear Force (SF).....	116
---	-----



## LISTA DE FIGURAS

### TESE

- Figura 1: Tela do programa 3D-Morphometry® (Minnich & Muska, OEG, Salzburg, Áustria). Imagem da esquerda - 0° de inclinação, da direita - 6°. Marcação de pontos correspondentes em ambas as imagens para o cálculo dos diâmetros e ângulos..... 39
- Figura 2: Processo de montagem de modelos de corrosão vascular pela técnica das pontes condutivas. Prata coloidal (\*), fios metálicos – pontes condutivas (setas) e # – pinça de trabalho. Dissecção de glândula submandibular de rato Wistar, A – início do processo de montagem, B – pronta para metalização para avaliação externa do espécime, C, D – montagem após dissecção parcial, E – dissecção total de artérias e arteríolas e F – capilares..... 126
- Figura 3: Imagens 3D (anaglíficas) de modelos de corrosão vascular de glândulas salivares submandibulares normais de ratos Wistar adultos, geradas pelo programa 3D-Morphometry. A – notar rede vascular correspondente ao ducto salivar. Observar estreita relação do ducto com a veia subjacente. B – maior aumento da região da bifurcação do ducto salivar. C, D e E – vascularização adjacente ao ducto salivar. Notar relação entre ducto e vasos adjacentes. F – Corte transversal do modelo por inclusão em água, congelamento, corte em criótomo e liofilização. Observar imagem de corte transversal do ducto salivar e artéria (\*) que o acompanha durante o percurso. Imagem melhor visualizada com o uso de óculos 3D verde/vermelho. .... 129

## ARTIGO I

Fig. 1: Bifurcação arterial de glândula submandibular de rato,  $d_0$  representa o diâmetro do vaso mãe,  $d_1$  do maior vaso filho e  $d_2$  do menor vaso filho.  $\theta_1$  e  $\theta_2$  são os ângulos com os quais os vasos filhos, respectivamente, maior e menor, ramificam-se do vaso mãe. 350X, distância de trabalho 10mm. .... 69

## ARTIGO II

Fig. 1. Vascular network of the dental pulp of the adult Wistar rat. Vascular corrosion cast. Scanning electron micrograph. **A.** Low powered micrograph subdivided into four quadrants (1-4). Note that the test area (inboxed area) includes part of the upper left quadrant (quadrant 1). **B.** Test area. Detail, note vessels below the surface layer (\*). 87

Fig. 2. **A.** Same as Fig. 1B, but after application of the magnetic lasso tool of Photoshop® 7.0 and conversion of gray levels of pixels within the vascular cast to zero (black) and those outside to 255 (white). **B.** Same as Fig.1B, but after automatic adjustment of contrast by the contrast tool of Photoshop® and application of the manual threshold tool of ImageTool® . **C.** Same as Fig. 1B, but after application of the manual threshold tool of ImageTool®. **D.** Same as Fig. 1B, but with the application of the mean of the cut-off-points of the histograms of Fig. 3C when processed by the threshold tool of Photoshop®. .... 88

Fig. 3: “Gold standard”. **A.** Short pieces of surgical suture material (Ethicon, Prolene 10-0 metric; average diameter: 30.45 $\mu$ m) mounted to a specimen stub (s). Note the four layers of suture material simulating four layers of blood vessels. Scanning electron micrograph. **B.** Detail from A. 750x. .... 89

### ARTIGO III

- Figure 1: Dissected from the main vascular tree of a rat submandibular gland, an almost symmetrical bifurcation.  $d_0$  is the diameter of the larger (parent) vessel,  $d_1$  of the larger daughter vessel and  $d_2$  of the smaller daughter vessel.  $\theta_1$  and  $\theta_2$  are the branching angles at which the larger and the smaller branches, respectively, arise from the parent vessel. 60X, WD 10mm. .... 117
- Figure 2: Bifurcation indexes  $\alpha$  plotted against total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of arteries and capillaries of submandibular glands in adult Wistar rats. The full and dashed lines represent the optimal values derived from equations (7) to (10). Means do not differ significantly ( $p = 0.292$ ). .... 118
- Figure 3: Bifurcation indexes  $\alpha$  plotted against total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of five submandibular glands of adult Wistar rats. Glands #2 and #5 are significantly different from each other ( $p = 0.013$ ). The full and dashed lines represent the optimal values derived from equations (7) to (10). .... 119
- Figure 4: Diameter ratios of the larger branch to the parent vessel ( $d_1/d_0$ ) plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations of submandibular glands of adult Wistar rats. The full line represents the optimal values for vessel diameters derived from equation (3). Neither Mann-Whitney rank sum test shows a significant difference between arteries and capillaries ( $p = 0.098$ ) nor does Kruskal-Wallis rank test reveal a significant difference among salivary glands ( $p = 0.088$ ). .... 120
- Figure 5: Diameter ratios of the smaller branch to the parent vessel ( $d_2/d_0$ ) plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations of the submandibular glands of adult Wistar rats. The full line represents the theoretical optimal values for vessel diameters derived from equation (4). Neither Mann-Whitney rank sum test shows significant difference between arteries and capillaries ( $p = 0.323$ ), nor

does Kruskal-Wallis rank test shows a significant difference among salivary glands ( $p = 0.458$ )..... 121

Figure 6: Area ratios  $\beta$  plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations of the submandibular glands of adult Wistar rats. The full line represents the theoretical optimal value for the area ratio derived from equation (6). Independent  $t$  test ( $p = 0.066$ ) shows no significant difference between arteries and capillaries. .... 122

Figure 7: Diameter gradients of consecutive arterial bifurcation of the submandibular glands of adult Wistar rats plotted against bifurcation level, over theoretical optimal values (dashed lines) derived from equation (13). Each curve represents the course of an individual artery for a particular value of the bifurcation index  $\alpha$  and  $\lambda$ . Higher curves represent arteries whose diameters decrease slowly and whose branching indexes are low, characteristic for a distributive function. The lower curves indicate arteries with a delivering function.  $d_n$  denotes the diameter of a daughter vessel at the  $n$ -branching level. .... 123

## LISTA DE SIGLAS

<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> – Análise de Variância
<b>AS</b>	<i>Aperture Size</i> – Abertura do Feixe
<b>AV</b>	<i>Accelerating Voltage</i> – Voltagem de Aceleração
<b>bit</b>	<i>Binary digit</i> – Dígito Binário
<b>CA</b>	Califórnia
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CCD</b>	<i>Charge-Coupled Device</i> – Dispositivo Acoplado de Carga
<b>dpi</b>	<i>Dots per inch</i> – Pontos por polegada
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FTP</b>	<i>File Transfer Protocol</i> – Protocolo de Transferência de Arquivos
<b>HSL</b>	Hospital São Lucas
<b>LS</b>	<i>Minimum Lumen Surface</i> – Mínima Superfície do Lúmen
<b>LV</b>	<i>Minimum Lumen Volume</i> – Mínimo Volume do Lúmen
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>PC</b>	<i>Personal Computer</i> – Computador Pessoal
<b>PP</b>	<i>Minimum Pumping Power</i> – Mínima Força de Bombeamento

<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>RGB</b>	<i>Red Green Blue Channel</i> – Canal Vermelho Verde Azul
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i> – Desvio Padrão
<b>SEI</b>	<i>Secondary Electron Imaging</i> – Imagem por Elétrons Secundários
<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscopy</i> – Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>SF</b>	<i>Minimum Shear Force</i> – Mínima Força de Atrito
<b>TIFF</b>	<i>Tagged Image File Format</i> – Formato de arquivamento de imagem sem perda de dados
<b>UK</b>	<i>United Kingdom</i> – Reino Unido
<b>USA</b>	<i>United States of América</i> – Estados Unidos da América
<b>UTHSCSA</b>	<i>The University of Texas Health Science Center at San Antonio</i> – Universidade do Texas, Centro de Ciências da Saúde
<b>WD</b>	<i>Working Distance</i> – Distância de Trabalho

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}$	Graus (unidade de medida de ângulos)
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
<b>arccos</b>	Função trigonométrica arco cosseno, inversa ao cosseno
<b>cos</b>	Função trigonométrica cosseno
$d_0$	Diâmetro do vaso precursor em uma bifurcação
$d_1$	Diâmetro do vaso filho maior
$d_2$	Diâmetro do vaso filho menor
$d_n$	Diâmetro de qualquer vaso filho maior, até o total de $n$ bifurcações
$f$	Fluxo
<b>g</b>	Gramas
<b>kV</b>	Kilovolts
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramas
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
$n$	Qualquer ramificação até o total de bifurcações em uma árvore completa
<b>nm</b>	Nanômetros
$p$	Valor de significância estatística

$P_0$	Ponto espacial observado na imagem pré-anaglífica com inclinação de zero graus
$P_6$	Ponto espacial observado na imagem pré-anaglífica com inclinação de seis graus
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<i>pixel</i>	<i>Picture Element</i> - Unidade de medida de área em imagens digitais
$r_0$	Raio do vaso precursor em uma bifurcação
$r_1$	Raio do vaso filho maior
$r_2$	Raio do vaso filho menor
<b>sen</b>	Função trigonométrica seno
<b>UI</b>	Unidades Internacionais
<i>voxel</i>	<i>Volumetric Pixel</i> - Unidade de medida de volume em imagens digitais
<b>X, Y, Z</b>	Coordenadas de um ponto P no espaço, referentes aos três planos geométricos
$\alpha$	Índice de bifurcação
$\alpha'$	Razão de assimetria
$\beta$	Razão de área
$\gamma$	Ângulo de inclinação entre as imagens pré-anaglíficas
$\theta_1$	Ângulo formado entre o prolongamento do vaso mãe e sua ramificação maior
$\theta_2$	Ângulo formado entre o prolongamento do vaso mãe e sua ramificação menor
$\lambda$	Razão de decréscimo de diâmetro em uma bifurcação



$\mu$	Comprimento lateral do campo de visão em uma imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\rho$	Ângulo de abertura do campo de visão em uma tomada de Microscopia Eletrônica de Varredura
$\psi$	Ângulo formado entre duas ramificações vasculares

# ***SUMÁRIO***

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>42</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>42</b>
2.2.1 Artigo I.....	42
2.2.2 Artigo II.....	42
2.2.3 Artigo III.....	43
<b>ARTIGO I .....</b>	<b>44</b>
RESUMO .....	46
ABSTRACT .....	46
INTRODUÇÃO.....	47
REVISÃO DA LITERATURA.....	49
DISCUSSÃO.....	58
AGRADECIMENTOS .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
FIGURA .....	69
<b>ARTIGO II.....</b>	<b>70</b>
ABSTRACT .....	72
INTRODUCTION.....	73
MATERIAL AND METHODS .....	75
<i>Reproducibility of the application of the threshold tool of ImageTool® .....</i>	<i>75</i>
<i>Determination of the number of test areas (sample size) needed per group.....</i>	<i>76</i>
<i>Application of the magnetic lasso tool of Photoshop® .....</i>	<i>76</i>

<i>Application of the threshold tool of ImageTool®</i> .....	77
<i>Gold standard</i> .....	77
RESULTS.....	79
<i>Vascular corrosion castings</i> .....	79
<i>Gold standard</i> .....	79
DISCUSSION.....	81
REFERENCES.....	83
TABLE.....	86
FIGURES.....	87
<b>ARTIGO III.....</b>	<b>90</b>
ABSTRACT.....	92
INTRODUCTION.....	93
MATERIAL AND METHODS.....	95
<i>Vascular casting</i> .....	95
<i>Quantitative Measurements</i> .....	96
<i>Hemodynamic Characteristics and Calculation of Optimal Values</i> .....	97
<i>Statistical Analysis</i> .....	99
RESULTS.....	101
DISCUSSION.....	105
ACKNOWLEDGMENTS.....	109
REFERENCES.....	110
TABLES.....	115
FIGURES.....	117
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>133</b>
<b>7.1 Geral.....</b>	<b>133</b>

<b>7.2 Específicas .....</b>	<b>133</b>
7.2.1 <i>Artigo I</i> .....	133
7.2.2 <i>Artigo II</i> .....	133
7.2.3 <i>Artigo III</i> .....	134
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>140</b>

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1 INTRODUÇÃO

A técnica de modelos de corrosão vascular vem sendo utilizada há várias décadas, como método de estudo macro-anatômico vascular (BATSON, 1955; TANIGUCHI, OHTA, TAJIRI, 1952; TANIGUCHI *et al.*, 1955). Com o surgimento de resinas capazes de uma moldagem mais fina e fidedigna e com a associação da técnica à microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MURAKAMI, 1971), um novo campo de estudo foi aberto. A partir de então, tornaram-se possíveis pesquisas com redes vasculares micro-circulatórias. Os vasos terminais (arteríolas, vênulas e capilares, inclusive) passaram a ser visíveis não somente com microscopia de luz e confocal, mas de forma a possibilitar uma idéia tridimensional (3D) da micro-angioarquitetura desses vasos.

Logo após, diversos métodos de análises quantitativas começaram a ser propostos devido às necessidades intrínsecas de serem realizadas comparações entre sistemas ou mesmo de serem conceituados, quantitativamente, sistemas circulatórios (WEIBEL, 1979; SCHRAUFNAGEL, 1987; NELSON, 1987; MÖNNIG *et al.*, 1988). Com o advento e a evolução dos computadores e da velocidade de processamento de dados, esses métodos foram sendo desenvolvidos e tornando-se mais refinados, até que fossem alcançados os sistemas hoje disponíveis (MALKUSCH *et al.*, 1995; MINNICH *et al.*, 1999 (Figura 1); KOMATSU, TSUBUSAKI, MIYOSHI, 1999; MANELLI *et al.*, 2007; GEGLER *et al.*, *no prelo*).

Por conseguinte, pesquisas na área da biologia teórica sobre leis hemodinâmicas que começaram a ser desenvolvidas no início do século passado (MURRAY, 1926a; MURRAY, 1926b), inicialmente com base em princípios matemáticos e na mecânica dos fluidos (POISEUILLE, 1840), passaram a ter um novo foco de desenvolvimento e aprimoramento com novas abordagens dos princípios de mínimo volume luminal, superfície luminal, força de atrito e de bombeamento (ZAMIR, 1976; ZAMIR, 1988b; ZAMIR, PHIPPS, 1988), bifurcações não simétricas (ZAMIR, 1978), custo de energia despendido pelo sistema para incorporação dessas leis (ZAMIR, BIGELOW, 1984), sistemas de distribuição ou entrega de suprimento sanguíneo (ZAMIR, 1988a). Por final, a tecnologia disponível e os sistemas de morfometria até o momento desenvolvidos propiciaram a aplicação desses

---

As referências bibliográficas relativas a este capítulo, bem como ao capítulo de Discussão, encontram-se ao final desta tese, no capítulo REFERÊNCIAS.

modelos matemáticos, até então teóricos, em estudos de sistemas vasculares reais (CECON, MINNICH, LAMETSCHWANDTNER, 2002; GÖSSL *et al.*, 2003a; GÖSSL *et al.*, 2003b; LAMETSCHWANDTNER *et al.*, 2004; STÖTTINGER *et al.*, 2006, KACHLIK *et al.*, 2007), com o intuito de entendê-los e compará-los entre diferentes tecidos, órgãos, espécies ou ainda entre situações fisiológicas e patológicas.

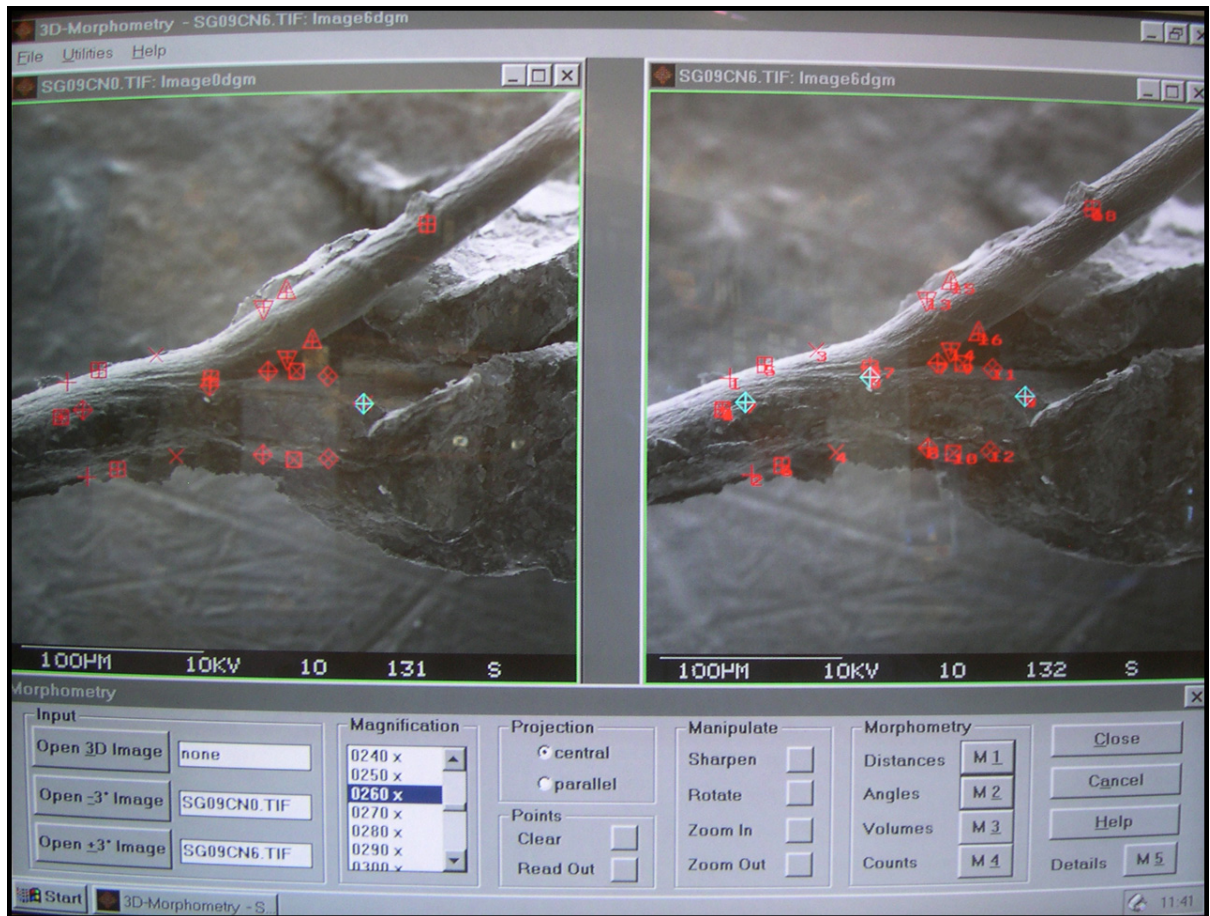


Figura 1: Tela do programa 3D-Morphometry® (Minnich & Muska, OEG, Salzburg, Áustria). Imagem da esquerda - 0° de inclinação, da direita - 6°. Marcação de pontos correspondentes em ambas as imagens para o cálculo dos diâmetros e ângulos.

Na tentativa de aproximação aos sistemas de morfometria condizentes com o estado da arte neste campo da ciência, surge o problema do custo, que para muitos centros de pesquisa constitui-se condição proibitiva. Isso traz à tona a necessidade de desenvolvimento de ferramentas alternativas e confiáveis a estes sistemas, que possam fornecer informações relevantes e de valor científico – principalmente para análises comparativas entre



tecidos/órgãos sadios e doentes ou entre diferentes órgãos, tecidos ou espécies – para pesquisas na área vascular.

Considerando a disponibilidade recente das técnicas de avaliação 3D, capazes de realizar uma análise hemodinâmica e anátomo-funcional de sistemas vasculares específicos, poucos órgãos, tecidos ou espécies animais já foram estudados. Visto que não há relatos na literatura científica internacional, este é o primeiro estudo em que é realizada uma avaliação desses parâmetros usando como substrato glândulas salivares normais, onde foi possível aplicar modelos matemáticos e compará-los com princípios hemodinâmicos teóricos ideais, na tentativa de obter informações sobre o funcionamento de glândulas sadias e disponibilizar recursos para futuros estudos utilizando glândulas histologicamente alteradas. O propósito final é o de contribuir para o entendimento, tanto da formação de condições patológicas quanto das suas necessidades de suprimento nutricional, considerando que à luz do conhecimento atual é consenso que em muitas doenças o suprimento sanguíneo é fundamental para o desenvolvimento das mesmas.

## ***OBJETIVOS***

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Aprofundar o estudo da quantificação em modelos de corrosão vascular associados à microscopia eletrônica de varredura, por meio de sistemas de morfometria bidimensional e tridimensional e dos princípios hemodinâmicos ideais.

### **2.2 Objetivos Específicos**

#### *2.2.1 Artigo I*

Revisar a literatura científica disponível sobre as diversas técnicas de quantificação dos sistemas circulatórios, ainda pouco utilizadas no Brasil, fornecendo maior suporte a estudos posteriores utilizando a técnica de modelos de corrosão vascular associada à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

#### *2.2.2 Artigo II*

Comparar valores obtidos pela aplicação das ferramentas digitais (i) laço magnético do programa Adobe Photoshop<sup>®</sup> 7.0 (San Jose, California, EUA) e (ii) threshold, do ImageTool<sup>®</sup> 3.0 (UTHSCSA, Texas, EUA) na quantificação de áreas vasculares em imagens por microscopia eletrônica de varredura de modelos de corrosão vascular.

Avaliar a reprodutibilidade e acurácia das mensurações obtidas a partir de cada método, comparando-as com um padrão-ouro.

### *2.2.3 Artigo III*

Medir ângulos de ramificações e diâmetros em todas as bifurcações arteriais e capilares da árvore principal de glândulas salivares submandibulares de ratos Wistar.

Comparar dados mensurados com predições de princípios teóricos ideais para identificar quais deles governam o sistema de redes vasculares de glândulas submandibulares normais.

# ***ARTIGO I***

---

Métodos de análise quantitativa aplicados a modelos de corrosão vascular: revisão de literatura.

*Methods of quantitative analysis applied to vascular corrosion casts: a literature review.*

Aderson Gegler<sup>1</sup>, Juliana Gazolla<sup>2</sup>, Maria A.L. de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutorando em Odontologia, Área de concentração Estomatologia, Hospital São Lucas, PUCRS

<sup>2</sup>Mestre em Periodontia, ULBRA

<sup>3</sup>Doutora em Estomatologia, Professora e Coordenadora do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Faculdade de Biociências, PUCRS

Análises quantitativas em modelos de corrosão vascular

Aderson Gegler

adersongegler@hotmail.com

R Dario Pederneiras 41/703 Porto Alegre RS 90630-090

## RESUMO

Os modelos de corrosão vascular propiciam um poderoso entendimento morfológico da microarquitetura dos vasos sanguíneos quando associados à microscopia eletrônica de varredura. Diversos sistemas de morfometria bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D) têm sido propostos para a sua quantificação, bem como modelos matemáticos com o objetivo de entender os princípios ideais hemodinâmicos que governam estes sistemas circulatórios. Este artigo se propõe a realizar uma revisão de literatura desta evolução, desde as primeiras teses sobre os princípios ideais, fundamentais para o entendimento da hemodinâmica vascular, até o estado da arte dos sistemas de morfometria 3D.

## PALAVRAS-CHAVE

Molde por corrosão; Microscopia Eletrônica de Varredura; Análise Quantitativa; Vasos Sanguíneos; Morfologia

## ABSTRACT

Vascular corrosion casts combined with scanning electron microscopy provide a powerful morphologic understanding of the vascular microarchitecture. Several bidimensional (2D) and threedimensional (3D) systems, as well as mathematical models have been proposed aiming at the quantification of vascular models, in order to study the hemodynamic optimality principles ruling those circulatory systems. This paper aims to accomplish a literature review of this evolution from the foremost thesis about optimality principles, vital to the knowledge of vascular hemodynamics, up to the state-of-the-art 3D morphometry systems.

## KEY WORDS

Corrosion casting; Microscopy, Electron, Scanning; Quantitative Analysis; Blood Vessels; Morphology

## INTRODUÇÃO

O sistema circulatório é responsável pela condução e distribuição de oxigênio e dióxido de carbono para os tecidos, produtos do sistema endócrino, das trocas metabólicas com as células, transporte dos componentes inflamatórios e do reparo tecidual, além de ser coadjuvante na termorregulação (vasodilatação e vasoconstrição). Assim, o interesse pelo estudo desse sistema é bastante antigo. Em 1926, a partir da biologia teórica, foram desenvolvidas séries de cálculos para encontrar a energia total da circulação sanguínea em uma determinada seção do sistema.<sup>1,2</sup> Sugeriu também a existência de uma lei teórica para a formação de ramificações arteriais com ângulos específicos.

Com o avanço científico e tecnológico, houve a possibilidade de aprimoramento e teste de tais teorias, inclusive permitindo a observação da circulação capilar. Em grande parte isso se deveu ao fato de os modelos de corrosão vascular começarem a ser analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura.<sup>3</sup> Além disso, com o desenvolvimento da microinformática, avanços dos sistemas de computação e das máquinas tiveram papel imprescindível para o aprimoramento de técnicas de análise quantitativa dos sistemas vasculares. Ainda assim, até os dias atuais existem algumas dificuldades tecnológicas para a execução de estudos quantitativos, fazendo com que grande parte das publicações na área seja de pesquisas com ênfase na análise qualitativa destes sistemas.

A importância das análises quantitativas fica evidente pela necessidade de conhecimento dos sistemas circulatórios. A partir deste conhecimento é possível comparar diferentes tecidos, órgãos, espécies, bem como respostas a tratamentos diferentes de



determinada doença ou ainda a relação de desenvolvimento dessas doenças com o sistema circulatório. Esses dados juntamente com estudos de fatores de crescimento vasculares e tumorais podem ser uma informação extremamente útil para a evolução da pesquisa do câncer, já que existe uma correlação entre angiogênese e progressão tumoral.<sup>4</sup> Desta forma, este estudo tem por objetivo revisar a literatura científica disponível sobre as diversas técnicas de quantificação dos sistemas circulatórios, ainda pouco utilizadas no Brasil, dando maior suporte a estudos posteriores utilizando a técnica de modelos de corrosão vascular associada à microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## REVISÃO DA LITERATURA

A lei de Poiseuille,<sup>5</sup> de 1840, relativa à mecânica dos fluidos, foi utilizada como base na formulação de teorias e equações matemáticas<sup>1,2</sup> na tentativa de explicar as leis dos sistemas vasculares. Essa lei permite determinar, matematicamente, o fluxo laminar de um fluido viscoso através de um tubo cilíndrico de secção transversal circular. A energia total envolvida na circulação sangüínea em um segmento arterial foi equacionada e posteriormente foi desenvolvido um princípio hipotético sobre a ramificação arterial.<sup>1,2</sup> Supondo que a energia total do sistema circulatório em questão seja mínima, a soma dos cubos dos raios das ramificações arteriais será igual ao cubo do raio da artéria da qual eles derivam ( $r_0^3 = r_1^3 + r_2^3$ ). Nesse contexto, também foi publicado que, quanto maior o diâmetro da ramificação arterial, menor o ângulo entre o ramo e a direção da artéria principal e que dois ramos de igual diâmetro terão ângulos iguais formados com o prolongamento da artéria mãe.<sup>1,2</sup> Referente a esse conceito, é importante ressaltar que existe um razoável consenso de que o modo mais freqüente de ramificação arterial é o dicotômico, onde a artéria mãe se divide em somente duas artérias filhas.<sup>6</sup>

Em outra frente de estudos relacionada a sistemas circulatórios, surgiu a técnica de corrosão vascular, inicialmente utilizada em estudos macroanatômicos.<sup>7,8,9</sup> Porém, já em 1971 Murakami<sup>3</sup> descreveu pela primeira vez esta técnica, inicialmente com intuito de observação da microanatomia vascular em MEV. Este autor utilizou uma resina à base de metil metacrílico, a qual era injetada no sistema vascular do animal em estudo. Após a injeção e polimerização da resina, o órgão injetado era imerso em uma solução de hidróxido de sódio para a corrosão dos tecidos orgânicos, obtendo-se uma cópia fiel do sistema circulatório

moldado. Posteriormente, a estrutura era coberta com camadas de carbono e ouro, em uma câmara de evaporação, para permitir a visualização no microscópio eletrônico de varredura. Com essa técnica o autor pôde obter e visualizar modelos vasculares de quase todo o animal sem a quebra de vasos, incluindo as circulações arterial, venosa e capilar. Além disso, a técnica permitiu um grande avanço no estudo anatômico microvascular, devido à grande profundidade de campo e alta resolução da MEV. A técnica de corrosão vascular foi sendo modificada ao longo dos anos. Novos materiais foram testados e os parâmetros das diversas fases do processo foram adaptados para diferentes animais, órgãos e tecidos. Uma visão completa da técnica, com as características das resinas, montagem dos espécimes, metalização, parâmetros físicos para a MEV e todas as fases para realização da técnica podem ser vistos em revisões específicas sobre o assunto.<sup>10,11,12,13</sup>

A partir do início dessa associação entre a técnica de corrosão vascular e a MEV,<sup>3</sup> tornou-se viável o aprimoramento e o teste da validade de princípios fisiológicos sobre o desenvolvimento dos sistemas vasculares. Em 1976<sup>14</sup> e 1978<sup>15</sup> foi compilado que o ângulo formado entre o prolongamento da artéria principal com as ramificações é tal que a superfície ou o volume luminal dos vasos envolvidos em uma junção arterial são mínimos. Por conseguinte, o ângulo ideal dessa ramificação é determinado pelo raio dos vasos envolvidos. Outros dois princípios propõem que o ângulo da ramificação é tal que a força de bombeamento requerida para levar o fluxo ou a força de atrito entre o sangue e as superfícies endoteliais é mínima. Desta forma, o ângulo ideal depende tanto do fluxo quanto do raio dos vasos envolvidos. A justificativa para atingir esses princípios ideais é dada pela liberdade de crescimento dos vasos durante sua formação. Entende-se por “ideais” valores de ângulos e diâmetros nos quais uma bifurcação possa ser eficiente, ou seja, apresentando uma das possíveis características que regem cada um dos diferentes “princípios ideais”. Para a

obtenção das fórmulas matemáticas desses princípios,<sup>15</sup> foi utilizado o conceito de razão de área  $\beta$ , ou seja, a razão da soma das áreas da seção transversal dos vasos filhos pela área do vaso mãe, gerando a seguinte fórmula:

$$\beta = \frac{r_1^2 + r_2^2}{r_0^2},$$

onde  $r_0$  é o raio do vaso principal,  $r_1$  da ramificação maior e  $r_2$  da menor. Utilizou-se ainda, o conceito de índice de bifurcação  $\alpha$ :

$$\alpha = \frac{r_2}{r_1},$$

sendo que o índice  $\alpha$  pode variar de próximo de 0 (zero), muito assimétrico, a 1 (um), simétrico. Desta forma, quanto maior o índice  $\alpha$ , maior a simetria da bifurcação.

Considerando que o fluxo na artéria principal é igual a soma do fluxo nos dois ramos ( $f_0 = f_1 + f_2$ ) e este sendo proporcional ao cubo do raio ( $f \propto r^3$ ), então  $r_0^3 = r_1^3 + r_2^3$ .

Por meio de deduções matemáticas e utilizando princípios trigonométricos,<sup>15,16</sup> foram propostas equações para prever os ângulos ideais das bifurcações governadas por cada um dos quatro princípios ideais, ao qual um sistema vascular pode estar submetido (maiores detalhes em Zamir (1978<sup>15</sup> e 1988<sup>16</sup>)). Em um princípio ideal baseado em minimizar o volume luminal e a força de bombeamento necessária temos

$$\cos \theta_1 = \frac{(1 + \alpha^3)^{4/3} + 1 - \alpha^4}{2(1 + \alpha^3)^{2/3}} \text{ e } \cos \theta_2 = \frac{(1 + \alpha^3)^{4/3} - 1 + \alpha^4}{2\alpha^2(1 + \alpha^3)^{2/3}},$$

enquanto que num princípio baseado em minimizar superfície luminal e a força de atrito temos

$$\cos \theta_1 = \frac{(1 + \alpha^3)^{2/3} + 1 - \alpha^2}{2(1 + \alpha^3)^{1/3}} \text{ e } \cos \theta_2 = \frac{(1 + \alpha^3)^{2/3} - 1 + \alpha^2}{2\alpha(1 + \alpha^3)^{1/3}}.$$

Uma bifurcação sob as características de um dos quatro princípios ideais gera um custo de energia mínimo para o sistema, contudo, qualquer desvio geométrico gera um custo mais alto, devido a perda de eficiência hemodinâmica.<sup>17</sup> É notável que, mesmo com uma considerável mudança nos ângulos das ramificações, o custo para o sistema não é linearmente proporcional e está dentro de uma faixa de até 2%.<sup>17</sup> Os princípios ideais já foram utilizados, também, para prever ângulos de ramificações em árvores,<sup>18</sup> explicar a geometria do vérmis cerebelar humano<sup>19</sup> e a geometria de drenagem dos leitos fluviais<sup>20</sup>.

Outro conceito discutido na literatura refere-se ao tipo de sistema vascular, o qual pode ser de distribuição ou de entrega.<sup>21</sup> As características de um sistema de distribuição mostram um vaso que não entra em uma região específica, mas transporta o sangue para várias zonas diferentes. Já um sistema de entrega, adentra uma pequena região exatamente para prover o suprimento sanguíneo dela. Assim, um sistema de distribuição terá um resultado de razão de ramificação mais baixo e mostrará menor número de bifurcações, enquanto que o sistema de entrega mostrará uma razão de ramificação mais alta e será possível observar vasos se dividindo mais profusamente, porém terminando mais rapidamente. Geralmente, vasos de distribuição têm um calibre maior do que os de entrega, porém não para todos os casos. Esses conceitos podem ser relevantes quando se necessita determinar o grau de importância funcional de um sistema.

A análise quantitativa também seguiu outro caminho, com um foco mais anatômico e não tão fisiológico, realizando diversas formas de mensurações sobre as fotomicrografias resultantes da MEV. Um método proposto foi o de contagem de pontos, o qual emprega os princípios da estereologia, sendo utilizado na avaliação de redes vasculares

planas ou seccionadas.<sup>22</sup> Uma grade-teste é sobreposta à micrografia ou diretamente à tela do microscópio eletrônico de varredura para, então, serem feitos os cálculos, utilizando-se as fórmulas estereológicas. Já a estereofotogrametria necessita de um estereoscópio equipado com um sistema de medidas que aplique o princípio da paralaxe para a aquisição de imagens na MEV.<sup>23</sup>

A proposta da planimetria, associada a um computador, é um método simples destinado à análise bidimensional. Consiste na mensuração do comprimento dos vasos traçando-se uma linha longitudinal no centro dos mesmos. O tamanho final desses vasos é calculado por um programa de computador.<sup>24</sup> Ainda, outra forma bidimensional de morfometria vascular é realizada por meio da análise de imagens que estão ou não em foco. As imagens dos vasos que estão em foco são desenhadas em branco e os vasos que se apresentam fora de foco, em preto.<sup>25</sup> Analogamente, isso foi realizado também utilizando um programa de computador,<sup>26</sup> onde visualmente foi escolhido um ponto de corte para os níveis de cinza da imagem resultante da MEV (*threshold*). Os níveis de cinza superiores a este ponto seriam ajustados para brancos (referem-se à área vascular) e inferiores, para pretos (referem-se à área avascular), criando assim uma imagem binária. A partir dessas duas metodologias, que fornecem a proporção de área vascular e avascular, é calculada a razão entre a área branca e a área total, obtendo-se um índice de densidade vascular.<sup>25,26</sup>

Em alguns estudos que empregam o princípio de análise de tons de cinza,<sup>27,28</sup> a seleção das áreas foi feita com a ferramenta *threshold* de um programa de edição de imagens. Da mesma forma, o princípio de diferença nos tons de cinza entre imagens em foco e fora dele foi utilizado. Com o intuito de minimizar o problema da representatividade dos níveis de cinza quanto à profundidade das camadas vasculares, foi sugerido o uso de outra ferramenta

digital de tratamento de imagem, o laço magnético.<sup>29</sup> Neste caso, um operador deve selecionar o contorno dos vasos a serem analisados, antes de transformar a imagem em binária, para se realizar o cálculo da densidade vascular. Neste estudo foram testados diversos algoritmos para ajuste das imagens, com o objetivo de encontrar uma forma que mais se aproxime do padrão-ouro também calculado.<sup>29</sup>

Todas essas técnicas de morfometria referidas têm limitações, seja pela forma de mensuração e tipo de resultado, seja pelo grau de fidelidade que guardam com o objeto real. Dessa forma, sistemas tridimensionais (3D) de morfometria foram desenvolvidos,<sup>30,31,32</sup> possibilitando a obtenção de medidas lineares e angulares acuradas. A diferença destes para os sistemas bidimensionais é a correção das medidas obtidas por algoritmos específicos utilizando-se do princípio da paralaxe (genericamente  $[1/\cos(\text{ângulo de inclinação})]$ ).<sup>33</sup> Em uma análise bidimensional, necessita-se de duas coordenadas para cada ponto (X';Y'), porém em análises tridimensionais, necessita-se de três (X';Y';Z'), sendo a terceira coordenada a profundidade do conjunto. Para que isso seja possível, é necessária uma modificação nos padrões de aquisição das imagens no MEV. São adquiridas duas imagens do mesmo sítio, com um intervalo angular de 6°<sup>30,32</sup> ou 8°<sup>31</sup> entre as mesmas, com a mesma distância de trabalho (10mm). Essas imagens são rotadas em 90° no sentido anti-horário, como correção ao plano de orientação da visão humana. As imagens são coloridas, com intuito de uma visualização qualitativa, uma de verde e outra de vermelho, através de modificação dos canais *RGB* (*Red, Green, Blue*). Estas imagens são, então, sobrepostas por um programa de computador, gerando uma imagem estereopareada passível de visualização com óculos verde/vermelho.<sup>32</sup> Outra forma de observação de imagens anaglíficas é através de óculos estéreo com as imagens não sobrepostas, permitindo que cada olho visualize apenas uma imagem, ou ainda a visualização do par em uma tela, alternando-as rapidamente.<sup>30</sup>

Para a obtenção de medidas lineares e angulares, um dos sistemas<sup>30</sup> propôs em seus algoritmos o uso dos princípios do Teorema de Pitágoras. Neste caso, uma distância  $d$  entre dois pontos  $P1$  e  $P2$  pode ser encontrada pelo uso das coordenadas ( $X'$ ,  $Y'$ , e  $Z'$ ), na equação  $d = \sqrt{[(P1_x + P2_x)^2 + (P1_y + P2_y)^2 + (P1_z + P2_z)^2]}$ , desde que se conheça o ângulo de inclinação entre as duas imagens ( $6^\circ$ ). O ângulo  $\psi$  formado entre as ramificações pode ser calculado pela regra dos cossenos, com a equação  $\psi = \arccos[(b^2 + c^2 - a^2)/(2 \cdot b \cdot c)]$ , onde  $b$  e  $c$  são segmentos mensurados dos vasos em questão e  $a$ , a distância entre eles na extremidade oposta à ramificação. Este método permite um erro dimensional máximo de 2,5%.

Com o mesmo objetivo, no programa 3D-Morphometry® (Minnich & Muska, OEG, Salzburg, Áustria),<sup>32</sup> um operador marca pontos correspondentes em cada uma das duas imagens separadamente. Considere um ponto  $P$ , com suas coordenadas planas ( $X$ ,  $Y$ ) na primeira imagem (inclinação  $0^\circ$ )  $P_0(u, v)$  e suas coordenadas correspondentes na segunda imagem (inclinação  $6^\circ$ )  $P_6(s, t)$ . No caso de uma projeção assim chamada central, ou seja, em magnificações menores ou iguais a 500X, quando a relação entre distância de trabalho e magnificação da imagem é tal que uma maior área do espécime é concebida no campo de visão do observador (câmera CCD – *charge coupled device* – do MEV) e o ângulo de visão é maior, obtém-se as coordenadas espaciais ( $X'$ ,  $Y'$  e  $Z'$ ) dos pontos pelos seguintes algoritmos:

$$X = \frac{10}{N} \cdot (4sv(\sin(\gamma)\sin(\rho/2))^2 + s \sin(2\gamma)\sin(\rho)),$$

$$Y = \frac{10}{N} \cdot ((t + v)\sin(\gamma)\sin(\rho)),$$

$$Z = \frac{10}{N} \cdot (4tv(\sin(\gamma)\sin(\rho/2))^2 + (t - v)\cos(\gamma)\sin(\rho)),$$



sendo que  $N = \text{sen}(2\gamma)(1 + \cos(\rho)) + t\nu \text{sen}(2\gamma)(1 - \cos(\rho)) + (t - \nu)\cos(2\gamma)\text{sen}(\rho)$ , onde  $\gamma$  é o ângulo de inclinação entre as imagens e  $\rho$  o ângulo da largura do campo. Já para projeções chamadas paralelas, consequência de magnificações maiores de 500X, onde se observa uma menor área do espécime no mesmo campo de visão, os algoritmos são:

$$X = \frac{\mu s}{2}, Y = \mu \frac{t + \nu}{4 \cos(\gamma)}, Z = \mu \frac{t - \nu}{4 \text{sen}(\gamma)}$$

onde  $\mu$  é o comprimento lateral do campo de visão, em  $\mu\text{m}$  (tabela de valores em Minnich, 1999).<sup>32</sup> Uma vez obtidas as coordenadas dos pontos das estruturas em questão, princípios básicos de trigonometria permitem calcular ângulos e distâncias entre eles. Nenhum outro sistema de morfometria 3D relata a correção para esse erro de perspectiva, ressaltando-se o fato de que ele trabalha com um erro dimensional consideravelmente baixo, de no máximo 1%.<sup>32,34</sup>

Até o momento, mais dois sistemas de morfometria tridimensional para aplicação em modelos de corrosão vascular foram introduzidos. Mexx® (Alicona, Alemanha)<sup>34</sup> e outro publicado por Manelli *et al.* (2007),<sup>35</sup> porém não há informações detalhadas disponíveis sobre sua acurácia e algoritmos utilizados. Existem ainda outros métodos de quantificação e morfometria tridimensional para uso diverso dos modelos de corrosão vascular associada à MEV. A exemplo disso cita-se a microtomografia,<sup>36,37</sup> em que é injetada uma substância de contraste no sistema vascular, não sendo necessária a corrosão dos tecidos orgânicos. Os algoritmos utilizados nestes programas são bastante poderosos podendo, inclusive, calcular o volume de estruturas. Porém a resolução permanece menor do que a alcançada com a MEV, 20 $\mu\text{m}$  (referente às dimensões laterais de 1 *voxel*) e 3,5nm (Philips ESEM XL30®, FEI Company, Eindhoven, Holanda), respectivamente. Há ainda o método semi-automatizado de delineamento,<sup>38</sup> que necessita um marcador para o plasma, como substância de contraste, antes da aquisição das imagens. Contudo, estes métodos não são aplicados a modelos de

corrosão vascular associados à MEV. Da mesma forma, outros métodos de avaliação da macroarquitetura vascular para modelos de corrosão vascular relatados na literatura não serão abordados neste estudo, pois fogem do escopo desta revisão.

## DISCUSSÃO

Desde as significativas contribuições para o estudo hemodinâmico e anatomo-funcional dos sistemas vasculares introduzidos por Murray em 1926<sup>1,2</sup> até os grandes avanços teóricos da década de 70 e 80,<sup>6,14,15,16,17</sup> não havia a possibilidade de se testar ou utilizar essas teses, devido a uma lacuna entre conhecimento e tecnologia disponível. As possibilidades eram o uso de análises bidimensionais como a contagem de pontos,<sup>22</sup> estereofotogrametria,<sup>23</sup> planimetria,<sup>24</sup> mensuração de razão de área por níveis de cinza,<sup>25,26,27,28,29</sup>. Estes métodos porém, não propiciavam respaldo matemático para testar ou aplicar tais teorias em sistemas circulatórios. Essa possibilidade surgiu a partir do vínculo entre a técnica de modelos de corrosão vascular e a MEV,<sup>3</sup> juntamente com o avanço tecnológico das últimas décadas (sistemas de lentes de alta precisão, aquisição digital de imagens, computadores com maior capacidade de processamento, desenvolvimento de programas de computador,<sup>30,31,32</sup> armazenamento de dados). Então sim, foi possível o teste<sup>37</sup> e a possibilidade de aplicação destas teorias e princípios hemodinâmicos.<sup>37,39,40,41,42</sup>

Com a formulação e desenvolvimento dos princípios hemodinâmicos houve, grandes contribuições para o campo de estudo dos sistemas circulatórios. Passou-se a ter um melhor entendimento fisiológico sobre a dinâmica do suprimento sanguíneo, seu sistema de irrigação, desenvolvimento e comportamento dentro de órgãos ou tecidos específicos.<sup>6,16,17,36,37,40,41,42,43</sup> Estudos quantitativos simples, sem a análise ou comparação das razões de área ou de assimetria, ou entre os princípios ideais, fornecem uma contribuição mais anatômica e estática desses sistemas,<sup>26,39,44,45</sup> o que algumas vezes pode ser alcançado por sistemas bidimensionais.

Um aspecto importante a considerar é que, como se tratam de métodos de avaliação quantitativa, os modelos devem refletir o melhor possível o estado do sistema vascular *in vivo*. Assim, o material de moldagem deve ter algumas propriedades ideais, como viscosidade semelhante à do sangue, capacidade de cópia de impressões das células endoteliais e uma contração de polimerização não significativa, para que seja possível a realização de mensurações confiáveis.<sup>10,11</sup> Nenhum material preenche plenamente todos esses critérios. Entretanto, a resina utilizada mais frequentemente (Mercocox, Ladd Research, Burlington, EUA) demonstra características aceitáveis para todos esses quesitos, permitindo que a contração de polimerização possa ser desconsiderada, por não interferir significativamente nas dimensões finais.<sup>10,11</sup> Nesse sentido, ressalta-se, também, que as camadas de carbono e ouro utilizadas na metalização, para tornar o modelo condutível e visível ao MEV, não influenciam nas medidas realizadas, já que são da ordem de 15 a 400nm.<sup>11</sup>

De acordo com os recursos de pesquisa disponíveis hoje, seria uma grande contribuição ao estudo hemodinâmico das espécies, órgãos ou tecidos e principalmente da angiogênese, a união dos conhecimentos disponíveis pela técnica de corrosão vascular associada à MEV, sistemas morfométricos 3D digitais e princípios fisiológicos ideais, ao estudo dos fatores de crescimento. Isso devido ao fato de que, com o auxílio de teorias matemáticas sobre esses princípios ideais dos sistemas circulatórios, que começaram a surgir já em 1926,<sup>1,2</sup> também são possíveis pesquisas que contribuam para o entendimento da anatomia funcional e desenvolvimento de sistemas circulatórios<sup>36</sup>. Assim como do custo de energia necessário para o organismo e a diferenciação entre sistema de distribuição ou entrega.

Alguns estudos<sup>37,40,42</sup> mapearam em gráficos o resultado das mensurações das ramificações arteriais, para avaliar se as mesmas se inserem ou não em áreas consideradas ideais pelos princípios fisiológicos. Tal procedimento permite estabelecer quantitativamente o grau de envolvimento do sistema pesquisado em relação aos princípios ideais, conforme sugerido anteriormente.<sup>15</sup> Porém, existem limitações no modelo matemático que devem ser consideradas. A natureza pulsátil do fluxo sanguíneo, a elasticidade e a não uniformidade da espessura da parede dos vasos e a sua curvatura longitudinal, são fatores não considerados. Entretanto, a ausência de modelos matemáticos mais sofisticados justifica o uso dos disponíveis,<sup>14</sup> visto que ainda hoje estes são utilizados<sup>37,40,41,42,44</sup> por falta de novas alternativas.

Sobre a eficiência dos métodos bidimensional e tridimensional, foi realizada uma análise comparativa na mensuração do comprimento vascular.<sup>46</sup> Foi verificado que os comprimentos medidos na avaliação bidimensional sempre eram menores que os medidos na tridimensional, diferindo, em média, 12,89%. Tal achado justifica-se pelo fato de que, para uma análise bidimensional, necessita-se de duas coordenadas para cada ponto ( $X'$ ;  $Y'$ ) e, para análises tridimensionais, de três ( $X'$ ;  $Y'$ ;  $Z'$ ), sendo a terceira coordenada que determina a profundidade do conjunto. Assim, análises morfométricas confiáveis somente são alcançadas com sistemas tridimensionais, que dependem da coordenada  $Z'$ , ou seja, a orientação espacial do conjunto. Isso não impede que, dependendo do tipo de dado que se busque, como por exemplo, a densidade vascular de uma região, seja possível a utilização de sistemas bidimensionais.

Levando-se em conta a evolução, tanto dos programas, quanto dos computadores, alguns desses métodos relatados na literatura são, hoje, obsoletos. Porém, a dificuldade na

obtenção de recursos para análises tridimensionais em alguns centros de pesquisa justifica o desenvolvimento de ferramentas alternativas que possam suprir as necessidades das pesquisas nesta área. Esse fator fez com que surgissem métodos simples e confiáveis para análises quantitativas da vascularização em diferentes tecidos ou regiões anatômicas, quando da utilização da técnica de corrosão vascular.<sup>29</sup>

Há que se considerar, em relação à comparação entre MEV e microtomografia, que existem hoje microtomógrafos que alcançam uma resolução (dimensão de *voxel*) de até 150nm (SkyScan2011®, Skyscan, Kontich, Bélgica, 2007).<sup>47</sup> Isto deixa precedentes para um grande campo de pesquisas, porém é importante considerar o custo desse tipo de equipamento. Outros microtomógrafos que alcançam uma resolução espacial considerada alta, dimensões do *voxel* de em torno de 1µm a 2µm (SkyScan1172®, Skyscan, Kontich, Bélgica, 2007),<sup>48</sup> continuam com resultados inferiores ao MEV, onde ela é de até 2nm (EVO®WDS, Carl Zeiss SMT AG, Oberkochen, Alemanha)<sup>49</sup> ou 3,5nm (Philips ESEM XL30®, FEI Company, Eindhoven, Holanda)<sup>50</sup>. Sabe-se que, quando se utiliza uma magnificação de 250X a 500X, padrão nas aquisições de imagens de capilares para morfometria, essa resolução não é tão alta. Ainda assim, a MEV proporciona resultados bastante superiores para os casos em que o diâmetro total do capilar pode chegar em níveis próximos de 4µm a 11µm.<sup>42</sup> Isto certamente traria uma visualização prejudicada,<sup>40</sup> se a resolução máxima do equipamento fosse de 3µm, quando se tem por objetivo priorizar a morfometria.

Ainda, tecnicamente, é necessário considerar a relação entre magnificação e menor profundidade de campo, para o uso dos sistemas 3D. Como o objetivo são análises tridimensionais, isso implica em avaliação também da profundidade do conjunto. Será de fundamental importância para que se possa ter uma boa visualização desse conjunto, uma

profundidade de campo razoável. Isso é alcançado com a combinação de algumas variáveis físicas no MEV, como a distância de trabalho, abertura e voltagem. Assim, o ajuste desses parâmetros permite que diversas camadas de vasos sejam visualizadas em uma mesma imagem.<sup>29</sup>

Assim, podemos considerar que uma grande quantidade de conhecimento, bem como sistemas de morfometria poderosos, estão disponíveis para aplicação no campo da hemodinâmica dos sistemas circulatórios, seu desenvolvimento, comparações entre diferentes tecidos, órgãos ou espécies e ainda entre tecidos saudáveis e doentes. A partir disto, se poderá buscar um melhor entendimento relativo ao desenvolvimento da angioarquitetura e suprimento nutricional de tumores e outras doenças.

## AGRADECIMENTOS

O autor (A.G.) foi financiado por bolsas da CAPES no Programa de Doutorado em Odontologia PUCRS (42005019022D9) e Estágio de Doutorado no Exterior (BEX1335-06-5).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Murray CD. The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1926 Mar;12(3):207-14.
2. Murray CD. The Physiological Principle of Minimum Work: II. Oxygen Exchange in Capillaries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1926 May;12(5):299-304.
3. Murakami T. Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch Histol Jpn*. 1971 Feb;32(5):445-54.
4. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.
5. Poiseuille L. Poiseuille's law. 1840 [cited 12/09/2007]; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Poiseuille's\\_law](http://en.wikipedia.org/wiki/Poiseuille's_law)
6. Zamir M, Phipps S. Network analysis of an arterial tree. *J Biomech*. 1988;21(1):25-34.
7. Taniguchi Y, Ohta Y, Tajiri S. [New improved method for injection of acrylic resin.]. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1952 Oct;24(4):259-67.
8. Taniguchi Y, Ohta Y, Tajiri S, Okano H, Hanai H. Supplement to new improved method for injection of acrylic resin. *Okajimas Folia Anat Jpn*. 1955 Dec;27(6):401-6.
9. Batson OV. Corrosion specimens prepared with a new material. *Anatomical Records*. 1955;121:425.
10. Weiger T, Lametschwandtner A, Stockmayer P. Technical parameters of plastics (Mercor CL-2B and various methylmethacrylates) used in scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Scan Electron Microsc*. 1986;1(Pt 1):243-52.



11. Lametschwandtner A, Lametschwandtner U, Weiger T. Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts--technique and applications: updated review. *Scanning Microsc.* 1990 Dec;4(4):889-940; discussion 1.
12. Verli FD, Kraether Neto L, Cherubini K, Souza MALd. Emprego da técnica de modelo de corrosão vascular em pesquisa odontológica. *RFO UPF.* 2006;11(1):7-12.
13. Verli FD, Rossi-Schneider TR, Schneider FL, Yurgel LS, de Souza MA. Vascular corrosion casting technique steps. *Scanning.* 2007 May-Jun;29(3):128-32.
14. Zamir M. The role of shear forces in arterial branching. *J Gen Physiol.* 1976 Feb;67(2):213-22.
15. Zamir M. Nonsymmetrical bifurcations in arterial branching. *J Gen Physiol.* 1978 Dec;72(6):837-45.
16. Zamir M. The branching structure of arterial trees. *Comments Theor Biol.* 1988;1:15-37.
17. Zamir M, Bigelow DC. Cost of departure from optimality in arterial branching. *J Theor Biol.* 1984 Aug 7;109(3):401-9.
18. Murray CD. A relationship between circumference and weight in trees and its bearing on branching angles. *J Gen Physiol.* 1927 May 20, 1927;10(5):725-9.
19. Turner RS. The geometry of the human cerebellar vermis. *Anat Rec.* 1968 Apr;160(4):691-6.
20. Leopold LB. Trees and streams: the efficiency of branching patterns. *J Theor Biol.* 1971 May;31(2):339-54.
21. Zamir M. Distributing and delivering vessels of the human heart. *J Gen Physiol.* 1988 May;91(5):725-35.
22. Weibel ER. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1979 Sep-Oct;15(5):999-1013.

23. Mönning B, El-Gammal S, Witsch P, Stanka P. Computer-aided three-dimensional reconstruction of terminal blood spaces in the proximal tibia metaphysis of the growing rat. VIII Intern Symp Morphol Sciences; 1988; Rome; 1988. p. 274.
24. Kratky RG, Roach MR. Scanning electron microscopy of early atherosclerosis in rabbits using aortic casts. *Scanning Microsc.* 1988 Mar;2(1):465-70.
25. Schraufnagel DE. Microvascular corrosion casting of the lung. A state-of-the-art review. *Scanning Microsc.* 1987 Dec;1(4):1733-47.
26. Nelson AC. Study of rat lung alveoli using corrosion casting and freeze fracture methods coupled with digital image analysis. *Scanning Microsc.* 1987 Jun;1(2):817-22.
27. Borba MG. Angioarquitetura pulpar de incisivos de rats pela técnica de corrosão vascular. [Tese de Doutorado], Porto Alegre: Faculdade de Odontologia - PUCRS; 2004.
28. Kraether Neto L. Angioarquitetura da superfície dorsal da língua de rats pelo método de corrosão vascular. [Tese de Doutorado], Porto Alegre: Faculdade de Odontologia - PUCRS; 2005.
29. Gegler A, Lametschwandtner A, Cherubini K, Borba M, Souza M. Estimation of vascular areas in scanning electron micrographs of microvascular corrosion casts by 2D-morphometry: a comparison of the magnetic lasso tool (Adobe Photoshop® 7.0) and the threshold tool (UTHSCSA ImageTool® 3.0). Em publicação 2008.
30. Malkusch W, Konerding MA, Klaphor B, Bruch J. A simple and accurate method for 3-D measurements in microcorrosion casts illustrated with tumour vascularization. *Anal Cell Pathol.* 1995 Jul;9(1):69-81.
31. Komatsu F, Tsubusaki K, Miyoshi M. Measurement of geometrical dimensions using scanning electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo).* 1999 January 1, 1999;48(4):407-15.

32. Minnich B, Leeb H, Bernroider EW, Lametschwandtner A. Three-dimensional morphometry in scanning electron microscopy: a technique for accurate dimensional and angular measurements of microstructures using stereopaired digitized images and digital image analysis. *J Microsc.* 1999 Jul;195(Pt 1):23-33.
33. Kratky RG, Roach MR. Endothelial cell morphometry near branch junctions of rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987 Sep;65(9):1864-71.
34. Minnich B, Krautgartner W, Lametschwandtner A. Quantitative 3D-Analyses in SEM: A Review. *Microscopy and Microanalysis.* 2003;9(Supplement S03):118-9.
35. Manelli A, Sangiorgi S, Binaghi E, Raspanti M. 3D analysis of SEM images of corrosion casting using adaptive stereo matching. *Microsc Res Tech.* 2007 Apr;70(4):350-4.
36. Gössl M, Malyar NM, Rosol M, Beighley PE, Ritman EL. Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Nov;285(5):H2019-26.
37. Gössl M, Rosol M, Malyar NM, Fitzpatrick LA, Beighley PE, Zamir M, et al. Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003 Jun;272(2):526-37.
38. Barber PR, Vojnovic B, Ameer-Beg SM, Hodgkiss RJ, Tozer GM, Wilson J. Semi-automated software for the three-dimensional delineation of complex vascular networks. *J Microsc.* 2003 Jul;211(Pt 1):54-62.
39. Fait E, Malkusch W, Gnoth S-H, Dimitropoulou C, Gaumann A, Kirkpatrick CJ, et al. Microvascular Patterns of the Human Large Intestine: Morphometric Studies of Vascular Parameters in Corrosion Casts Scanning Microscopy. 1998;12(4):641-51.
40. Lametschwandtner A, Minnich B, Kachlik D, Setina M, Stingl J. Three-dimensional arrangement of the vasa vasorum in explanted segments of the aged human great saphenous vein: scanning electron microscopy and three-dimensional morphometry of

- vascular corrosion casts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Dec;281(2):1372-82.
41. Stottinger B, Klein M, Minnich B, Lametschwandtner A. Design of cerebellar and nontegmental rhombencephalic microvascular bed in the sterlet, *Acipenser ruthenus*: a scanning electron microscope and 3D morphometry study of vascular corrosion casts. *Microsc Microanal.* 2006 Oct;12(5):376-89.
42. Kachlik D, Baca V, Stingl J, Sosna B, Lametschwandtner A, Minnich B, et al. Architectonic arrangement of the vasa vasorum of the human great saphenous vein. *J Vasc Res.* 2007;44(2):157-66.
43. Aharinejad S, Schreiner W, Neumann F. Morphometry of human coronary arterial trees. *Anat Rec.* 1998 May;251(1):50-9.
44. Cecon S, Minnich B, Lametschwandtner A. Vascularization of the brains of the Atlantic and Pacific hagfishes, *Myxine glutinosa* and *Eptatretus stouti*: a scanning electron microscope study of vascular corrosion casts. *J Morphol.* 2002 Jul;253(1):51-63.
45. Minnich B, Bartel H, Lametschwandtner A. How a highly complex three-dimensional network of blood vessels regresses: the gill blood vascular system of tadpoles of *Xenopus* during metamorphosis. A SEM study on microvascular corrosion casts. *Microvasc Res.* 2002 Nov;64(3):425-37.
46. Minnich B, Lametschwandtner A. Lengths measurements in microvascular corrosion castings: two-dimensional versus three-dimensional morphometry. *Scanning.* 2000 May-Jun;22(3):173-7.
47. SkyScan. SkyScan2011. 2007 [cited 2007 Set 28]. Available from: <http://www.skyscan.be/products/2011.htm>
48. SkyScan. SkyScan1172. 2007 [cited 2007 Set 29]. Available from: <http://www.skyscan.be/products/1172.htm>

49. EVO-WDS. Carl Zeiss, SMT AG. 2007 [cited 2007 Set 29]. Available from:  
<http://www.smt.zeiss.com>
50. ESEM-XL30. Philips, FEI Company 2007 [cited 2007 Set 29]. Available from:  
<http://prism.mit.edu/facilities/XL30/xl30home.htm>

## FIGURA



Fig. 1: Bifurcação arterial de glândula submandibular de rato,  $d_0$  representa o diâmetro do vaso mãe,  $d_1$  do maior vaso filho e  $d_2$  do menor vaso filho.  $\theta_1$  e  $\theta_2$  são os ângulos com os quais os vasos filhos, respectivamente, maior e menor, ramificam-se do vaso mãe. 350X, distância de trabalho 10mm.

## ***ARTIGO II***

---

Estimation of vascular areas in scanning electron micrographs of microvascular corrosion casts by 2D-morphometry: a comparison of the magnetic lasso tool (Adobe Photoshop® 7.0) and the threshold tool (UTHSCSA ImageTool® 3.0)

<sup>+</sup>Gegler A, <sup>\*</sup>Lametschwandtner A, <sup>+</sup>Cherubini K, <sup>+</sup>Borba MG, <sup>+</sup>Souza MAL

<sup>+</sup> Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, São Lucas Hospital, Stomatology, Porto Alegre, Brazil

<sup>\*</sup>University of Salzburg, Department of Organismic Biology, Division of Zoology and Functional Anatomy, Vascular and Muscle Research Unit, Hellbrunnerstrasse 34, A-5020 Salzburg, Austria (Europe)

Running title: Estimation of vascular areas in SEM micrographs by the magnetic lasso and threshold tool.

Address for correspondence:

Aderson Gegler, R. Cel. João Correa 97/307, Porto Alegre, RS, 91350-190, Brazil

adersongegler@hotmail.com



## ABSTRACT

The magnetic lasso tool from Adobe Photoshop<sup>®</sup> 7.0 (San Jose, California, USA) and the threshold tool from ImageTool<sup>®</sup> 3.0 (UTHSCSA, Texas, USA) were tested in respect to their usability and accuracy to estimate vascular areas in scanning electron microscopical images of microvascular corrosion casts of the adult rat dental pulp. For comparison of data surgical suture material (Ethicon, Prolene, 10-0) was imaged as a gold standard and analyzed by these two tools and by 3D-morphometry as a method independent from the other tools. Data showed that both tools overestimate vascular areas whereby the use of the magnetic lasso tool with ~6% overestimation is indicated rather than the threshold tool which overestimated vascular areas by ~22%.

## KEY WORDS

Magnetic lasso tool – threshold tool – vascular corrosion cast – Scanning Electron Microscopy -3D-morphometry

## INTRODUCTION

For a long time scanning electron microscopy of vascular corrosion casts (Murakami, 1971; Ohtani *et al.*, 1983; Lametschwandtner *et al.*, 1990; Hossler *et al.*, 1984) was used to study the angioarchitecture of normal and pathological changed tissues and organs in descriptive (qualitative) terms. Then (i) **point counting methods** which apply the principles of stereology (Weibel, 1979), (ii) **stereophotogrammetry** which uses stereopaired images and the parallax resulting from the tilting angle between stereopairs (Boyde, 1973; Mönnig *et al.*, 1988), (iii) **planimetry**, a method applicable for two-dimensional vascular networks (Lametschwandtner *et al.*, 1989), (iv) **gray level image analysis** which serves to estimate vascular densities (Schraufnagel, 1987), (v) **PC-based 3D-morphometry** which enables linear and angular measurements in the 3D-space (Malkusch *et al.*, 1995; Minnich *et al.*, 1999, 2000), and (vi) **gray scale analysis** which uses the threshold tool of an image editing program (Nelson, 1987; Borba, 2004; Kraether Neto, 2005), were applied to gain quantitative data from vascular corrosion casts. This data, ideally represented by vascular diameters, intervascular and interbranching distances, and branching angles, can be used to calculate (i) flow and pressure gradients within vascular networks and (ii) optimum vessel diameters and optimum branching angles to find out which of the four optimality principles – minimum lumen volume, minimum pumping power, minimum lumen surface, minimum endothelial shear force (Murray, 1926a, 1926b) – is achieved in the vascular network under consideration.

Though in quantification of vascular corrosion casts **PC-based 3D-morphometry** has proven to be a very powerful tool, we consider it as justified to test alternative tools for

## MATERIAL AND METHODS

Digital images of incisor dental pulps vascular corrosion casts of adult male and female Wistar rats (250–300grams) recorded by a XL-30 scanning electron microscope (SEM; FEI Company, Netherlands) in the secondary electron imaging (SEI) mode were used. Images recorded at an initial magnification of 750 times, a resolution of 75 dpi and 8-bit depth, and saved in the Tagged Image File Format (TIFF) were randomly selected from an image archive (Borba, 2004). Images were opened by Photoshop® 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) and displayed on a 15-inch color monitor with an active matrix flat screen having a resolution of 1280 by 1024 pixels. Each displayed image was virtually subdivided into four quadrants (Fig. 1A) and a test area of 212 by 212 pixels (corresponding to 10 000  $\mu\text{m}^2$ ; Fig. 1B), was randomly selected from a quadrant, copied, and attributed to groups A, B, C and D. The quadrant from which the test area was chosen was changed clockwise at each new image opened from the image archive. Because of the data bar, the images copied from the fourth quadrant had the selected area copied two thirds from the fourth quadrant and one third from the first quadrant (Fig 1).

### *Reproducibility of the application of the threshold tool of ImageTool®*

The person who was proposed to perform the thresholding was tested for the reproducibility of the procedure in respect to the selection of pixels of the superficial vascular layers with minimal inclusion of pixels of deeper vascular layers. In practice, the operator applied the threshold tool to five test areas and repeated the session in a weekly interval until it gained a Pearson correlation coefficient of 0.6 or higher and data subjected to a paired t-test

(Susin & Rösing, 1999; Zar, 1999) revealed no significant differences between weekly sessions.

#### *Determination of the number of test areas (sample size) needed per group*

Previously to this research, we made a pilot study in order to determine the number of test areas needed to reach a significance level of 5% and a study power of 80%. In the pilot study we used five images in each group (A to D) and used the same method as in this research. The images were applied to the magnetic lasso tool of Photoshop® and to the threshold tool of the UTHSCSA *ImageTool* (developed at the University of Texas Health Science Center at San Antonio, Texas and available from the Internet by anonymous FTP from maxrad6.uthscsa.edu). Then, obtained means and standard deviations were imported into the nQuery Advisor® (Statistical Solutions, Cork, Ireland) which advised a sample size of 24 images to meet a significance level of 5% and a study power of 80%. To slightly increase the study power we analyzed 25 images per group (A to D).

#### *Application of the magnetic lasso tool of Photoshop®*

The magnetic lasso tool was applied in images of group A. Tool parameters in the software were set to feather = 0, anti-alias = no, pixel width = 3, edge of contrast = 30%, and fastening point frequency = 100. In the screen, the program cursor was guided over the image by the mouse of a laptop along the contours of the most superficial layer of vascular corrosion casts whereby the cursor automatically adhered successively to those contours having the strongest edge contrast within the predefined width (3 pixels). As the gray levels of pixels inside these settings, corresponding to the area of the vascular cast, we converted them to zero, those outside to 255, resulting in a black and white TIFF image.

### *Application of the threshold tool of ImageTool®*

First, we automatically adjusted contrast in images of group B by the contrast tool of Photoshop® to map the brightest and darkest pixels as white and black whereby the tool ignored the first 0.5% of either extreme. Next, we applied the manual threshold tool of ImageTool® to images of group B and C and created black and white TIFF images. When processing images of group C those values of the histograms where the cut-off points occurred, separating the superficial (lighter) and the deep (darker) planes, were saved in an Excel sheet (Microsoft Inc., Redwood, CA, USA), the mean was calculated and this value was applied to the histograms of group D images when processed by the threshold tool of Photoshop® to obtain black and white TIFF images (Fig. 2).

After processing of all images of groups A-D (100 images) the number of black pixels (gray level = zero) of each image corresponding to the superficial vessels was calculated by the counting tool of the ImageTool®. Data was subjected to an ANOVA with a random block design ( $p \leq 0.05$ ) using SAS 8.0® (Cary, North Carolina, USA). At  $p = 0.05$  the power of the study was found to be 83%. To identify significant differences ( $p \leq 0.05$ ) in the measurement of superficial vascular areas between the two tools the Tukey's *post hoc* test was used. For the determination of the power of the study at a set  $\alpha = 5\%$  the nQuery Advisor® (Statistical Solutions, Cork, Ireland) was used.

### *Gold standard*

Several layers of short pieces of a fine monofilamentous suture material (Ethicon, Prolene polypropylene 10-0, Johnson & Johnson, Austria) mounted onto a specimen stub

this goal, as some laboratories still have difficulties to obtain resources for three-dimensional analyses. These tools should be inexpensive to implement, simple and reliable in their application, and should allow quantitative analyses of vascular corrosion casts.

Here we a) compare data gained by the application of (i) the **magnetic lasso tool** from Adobe Photoshop<sup>®</sup> 7.0 (San Jose, California, USA) and (ii) the **threshold tool** from ImageTool<sup>®</sup> 3.0 (UTHSCSA, Texas, USA) in the quantification of vascular areas in scanning electron micrographs taken from vascular corrosion casts, and b) evaluate reproducibility and accuracy of measurements gained by either method by comparing them with a gold standard.

served as gold standard (Fig. 3A). To simulate a vascular network the short pieces were orientated more or less parallel within the layers, but consecutive layers were rotated 90°. The standard was sputtered with gold and examined in the scanning electron microscope (Stereoscan 250; Cambridge, UK) at 10 kV. Five images were recorded from the gold standard in the same way as done for vascular corrosion casts. In selecting the 212x212 pixel images from one of the quadrants, care was taken to choose areas where the next deeper layer was seen as it was on our cast samples (see Fig. 3B). Finally, the magnetic lasso tool and the threshold tool were applied to these five images in the same way as done in the images of vascular casts. These images were transformed into a black and white TIFF image exactly like previously described.

Additionally, stereopaired images were taken from the gold standard and diameter and lengths of the suture material displayed in the images were measured by 3D-morphometry (Minnich *et al.*, 1999). Data served to (i) enable calculation of the area of the displayed suture material, and (ii) allow for a judgement if both tools tested a) both overestimate/underestimate vascular areas or (b) which of them overestimates and which underestimates.

## RESULTS

### *Vascular corrosion castings*

Analysis of variance with a randomized block design revealed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between groups. Tukey's *post hoc* test revealed significant differences ( $p < 0.05$ ) between measurements done with the **magnetic lasso tool of Photoshop®** (group A) and the **threshold tool of ImageTool®** with automatic contrast adjustment (group B), the **threshold tool of ImageTool®** without adjustment of contrast (group C), and the automatic **threshold tool of Photoshop®** using the mean threshold level of all 25 images of group C (group D). There were no significant differences between groups B, C and D. For details see table 1.

Utilizing a 5% level of significance, data gained by the threshold tool, when the measurements were repeated and compared, produced a Pearson correlation coefficient of 0.83 and a  $p > 0.05$ , when submitted to the paired *t*-test. At the same level of significance the magnetic lasso showed a Pearson correlation coefficient of 0.80 and a  $p > 0.05$ , when subjected to the paired *t*-test. Both tools showed a strong correlation between the repetitions, and values did not differ significantly between weekly measurements.

### *Gold standard*

Analysis of the uppermost layer of the gold standard images by the magnetic lasso tool revealed  $32.38 \pm 0.76$  % (mean  $\pm$  sd) black pixels and  $67.72 \pm 0.76$  % (mean  $\pm$  sd) white pixels, the threshold tool revealed in the same images  $37.15 \pm 1.45$  % (mean  $\pm$  sd) black



pixels and  $62.85 \pm 1.45$  % (mean  $\pm$  sd) white pixels.

When the percentage of black pixels representing the suture material displayed in the images analyzed by the magnetic lasso tool and the threshold tool was analyzed by 3D-morphometry a percentage of  $30.45 \pm 0.69$  % (mean  $\pm$  sd) black pixels was found. This calculation was possible because the field width of the images analyzed was  $100\mu\text{m}$  by  $100\mu\text{m}$  and the area occupied by the suture material could be estimated by the diameter and the lengths of the suture material.

When data gained by the magnetic lasso tool and data gained by 3D-morphometry was subjected to a t-test, a significant difference was found ( $p < 0.01$ ). A significant difference ( $p < 0.01$ ) also exists between data gained by the threshold tool and 3D-morphometry.

## DISCUSSION

Presently, 3D-morphometry is the most accurate method to quantify vascular corrosion casts (Malkusch *et al.*, 1995; Minnich *et al.*, 1999). As it relies on special hard- and software which is available in a few laboratories only, we tested a free (ImageTool®) and commercially available standard software (Photoshop®) in respect to its ability to quantify the vasculature of tissues and organs.

When quantifying SEM images by 2D-morphometry it has to be recalled that the depth of focus (depth of field) of an SEM image depends on working distance (WD), aperture size (AS), and accelerating voltage (AV) at which the SEM is operated. A large WD and a small AS lead to a great depth of focus. In respect to WD and AS used when taking images at a magnification of 750x (Figs. 1A and 1B) the depth of focus is in the range of ~100 µm. Thus several layers of capillaries may be within this depth of focus or a single vessel may traverse a space of this dimension and still be in focus. This means that vascular layers beneath the surface layer of vessels (capillaries) are also in focus but due to their location farther away from the detector, the signal resulting from this layer might be slightly lower finally leading to a slightly different gray level image than that of the top layer. If the difference between gray levels is high enough, the cut-off point can be set by thresholding, and this layer can be cut off.

Application of the automatic contrast adjustment in group B had no effect and resulted in the same histogram given before the application of the tool, the cut-off point for the threshold tool was therefore very similar to that of group C where automatic contrast

adjustment was not applied. The lack of a significant difference between group D and the other groups in which the threshold tool was used is explained by the fact that the cut-off point common for group D was the mean cut-off point in group C. Because gray levels of images varied, the mean cut-off point particularly impaired those images with a gray level farther away from the general mean, thereby increasing the standard deviation of the group.

Analysis of the gold standard confirmed the results obtained from vascular corrosion casts in the two methods used. The study clearly demonstrated that both tools overestimate the percentage of black pixels (vascular area), with the magnetic lasso tool overestimating about 6% and the threshold tool overestimating about 22%. Considering the reported (volume) shrinkage of the polymerizing resins Mercor (6%) and of Methylmethacrylate (20%) (Weiger *et al.*, 1986) used for vascular casting, the overestimation by the magnetic lasso tool may be tolerated when comparing vascular areas with great differences in between, but not if only small differences are presented.

## REFERENCES

- Borba, M.G. (2004) Angioarquitetura pulpar de incisivos de ratos pela técnica de corrosão vascular. PhD Thesis, PUCRS, Porto Alegre.
- Boyde, A. (1973) Quantitative photogrammetric and qualitative stereoscopic analysis of SEM images. *J. Microsc.* **98**, 452-471.
- Hossler, F.E. & Olson, K.R. (1984) Microvasculature of the avian eye: studies on the eye of the duckling with microcorrosion casting, scanning electron microscopy, and stereology. *Am. J. Anat.* **170**, 205-21.
- Kraether Neto, L. (2005) Angioarquitetura da superfície dorsal da língua de ratos pelo método de corrosão vascular. PhD Thesis, PUCRS, Porto Alegre.
- Lametschwandtner, A., Weiger, T. & Bernroider, G. (1989) Morphometry of corrosion casts. *Prog. Clin. Biol. Res.* **295**, 427-33.
- Lametschwandtner, A., Lametschwandtner, U. & Weiger, T. (1990) Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts--technique and applications: updated review. *Scanning Microsc.* **4**, 889-941.
- Malkush, W., Konerding, M.A., Klaphor, B. & Bruch, J. (1995) A simple and accurate method for 3-D measurements in microcorrosion casts illustrated with tumour vascularization. *Anal. Cell. Pathol.* **9**, 69-81.
- Minnich, B., Leeb, H., Bernroider, E.W.N. & Lametschwandtner, A. (1999) Three-dimensional morphometry in scanning electron microscopy: a technique for accurate dimensional and angular measurements of microstructures using stereopaired digitized images and digital image analysis. *J. Microsc.* **195**, 23-33.

- Minnich, B. & Lametschwandtner, A. (2000) Length measurements in microvascular corrosion castings: two-dimensional versus three-dimensional morphometry. *Scanning* **22**, 173-7.
- Mönnig, B., El-Gammal, S., Witsch, P. & Stanka, P. (1988) Computer-aided three-dimensional reconstruction of terminal blood spaces in the proximal tibia metaphysis of the growing rat. VIII Intern Symp Morphol Sciences, Roma, 274.
- Murakami, T. (1971) Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. *Arch. Histol. Jpn.* **32**, 445-54.
- Murray, C.D. (1926a) The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **12**, 207-14.
- Murray, C.D. (1926b) The Physiological Principle of Minimum Work: II. Oxygen Exchange in Capillaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **12**, 299-304.
- Nelson, A. (1987) Study of rat lung alveoli using corrosion casting and freeze fracture methods coupled with digital image analysis. *Scanning Microsc.* **1**, 817-822.
- Ohtani, O., Kikuta, A., Ohtsuka, A., Taguchi, T. & Murakami, T. (1983) Microvasculature as studied by the microvascular corrosion casting / Scanning electron microscope method. I. Endocrine and digestive system. *Arch. Histol. Jpn.* **45**, 1-42.
- Schraufnagel, D.E. (1987) Microvascular corrosion casting of the lung. A state-of-the-art review. *Scanning Microsc.* **1**, 1733-47.
- Susin, C. & Rösing, C.K. (1999) *Praticando odontologia baseada em evidências*. ULBRA, Canoas.
- Weibel, E.R. (1979) Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **15**, 999-1013.

Weiger, T., Lametschwandtner, A. & Stockmayer, P. (1986) Technical parameters of plastics (Mercox CL-2B and various methylmethacrylates) used in scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Scan. Electron. Microsc.* **1**, 243-52.

Zar, J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River.

## TABLE

Table 1: Area (pixels) of the superficial vascular layer. Means of the vascular area and their respective standard deviation for groups A, B, C and D.

Group	Superficial vascular area (pixels)	
	Mean	Standard deviation
A (Magnetic lasso)	19074.68 <sup>B</sup>	2766.51
B (Threshold with automatic contrast)	20593.24 <sup>A</sup>	2576.23
C (Threshold)	20619.08 <sup>A</sup>	2636.92
D (Threshold with fixed value)	20538.84 <sup>A</sup>	4368.01

Means followed by different letters differ significantly according to analysis of variance, utilizing a randomized block design, complemented by Tukey's multiple comparisons test, at the 5% level of significance ( $p < 0.05$ ).

## FIGURES

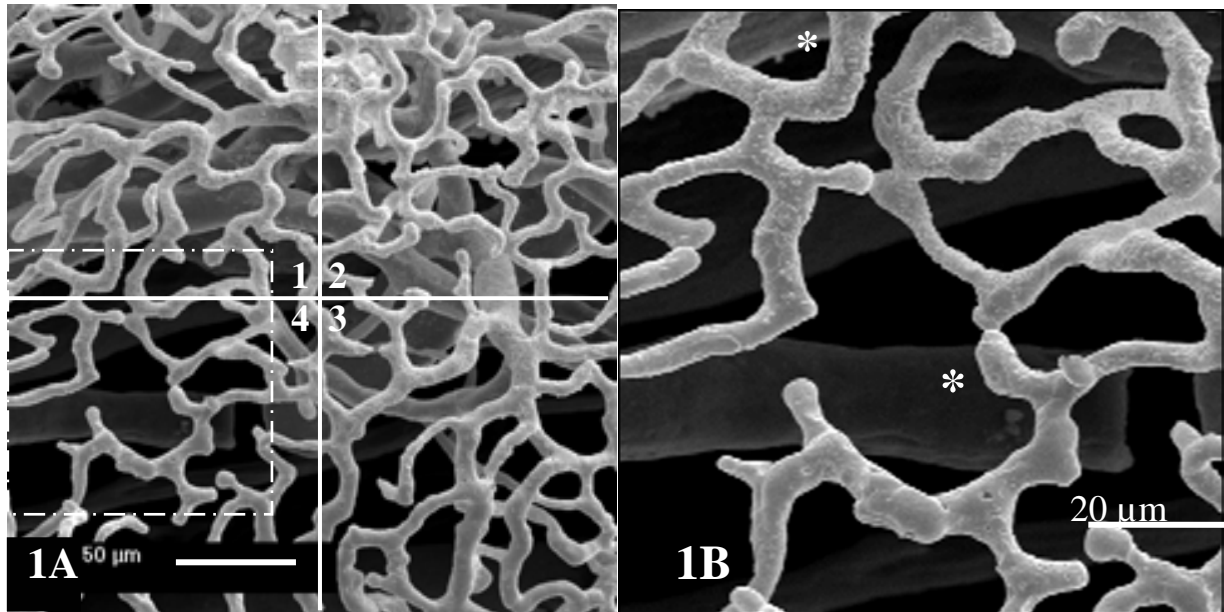


Fig. 1. Vascular network of the dental pulp of the adult Wistar rat. Vascular corrosion cast. Scanning electron micrograph. **A.** Low powered micrograph subdivided into four quadrants (1-4). Note that the test area (inboxed area) includes part of the upper left quadrant (quadrant 1). **B.** Test area. Detail, note vessels below the surface layer (\*).



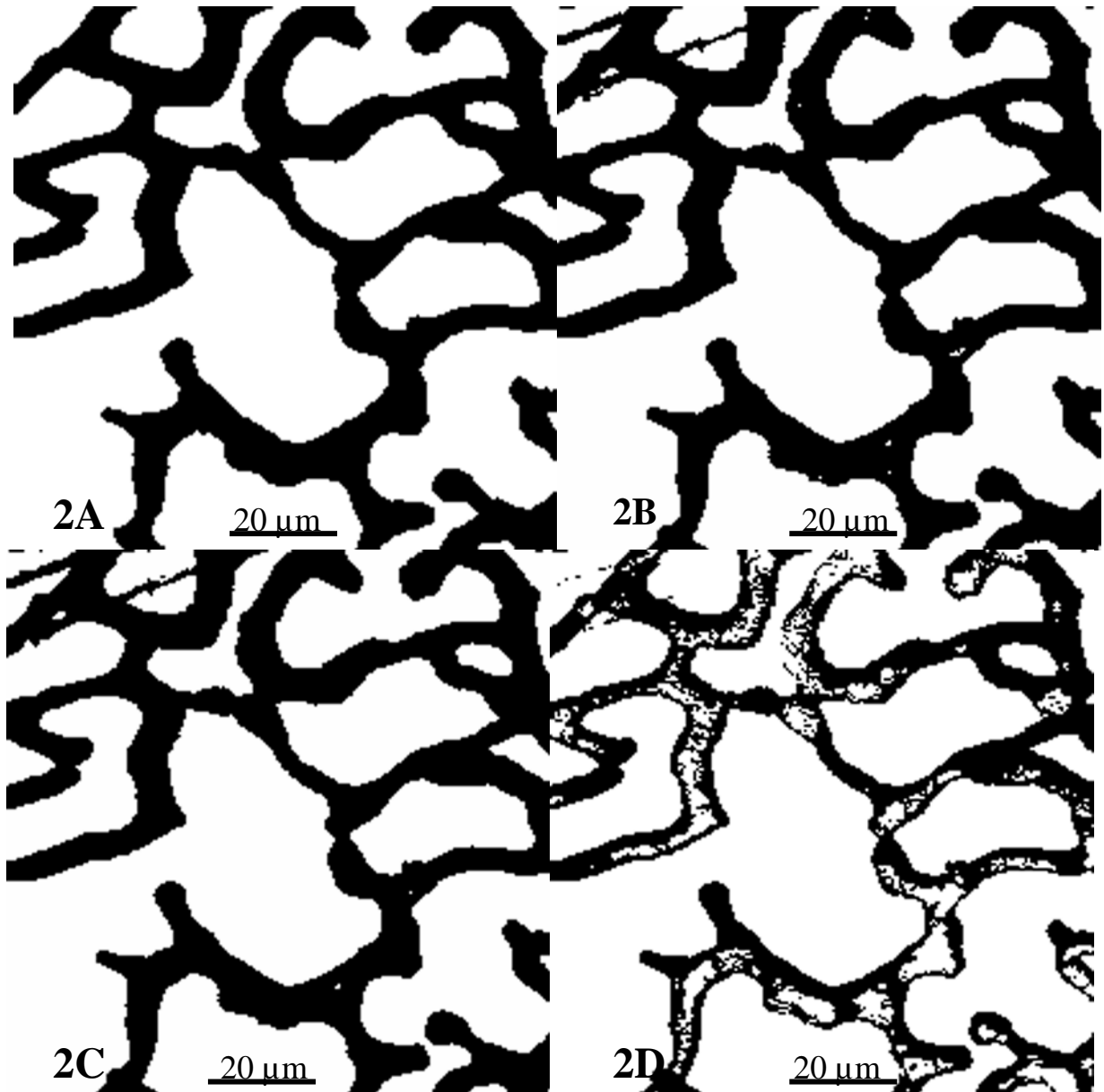


Fig. 2. **A.** Same as Fig. 1B, but after application of the magnetic lasso tool of Photoshop® 7.0 and conversion of gray levels of pixels within the vascular cast to zero (black) and those outside to 255 (white). **B.** Same as Fig.1B, but after automatic adjustment of contrast by the contrast tool of Photoshop® and application of the manual threshold tool of ImageTool® . **C.** Same as Fig. 1B, but after application of the manual threshold tool of ImageTool®. **D.** Same as Fig. 1B, but with the application of the mean of the cut-off-points of the histograms of Fig. 3C when processed by the threshold tool of Photoshop®.

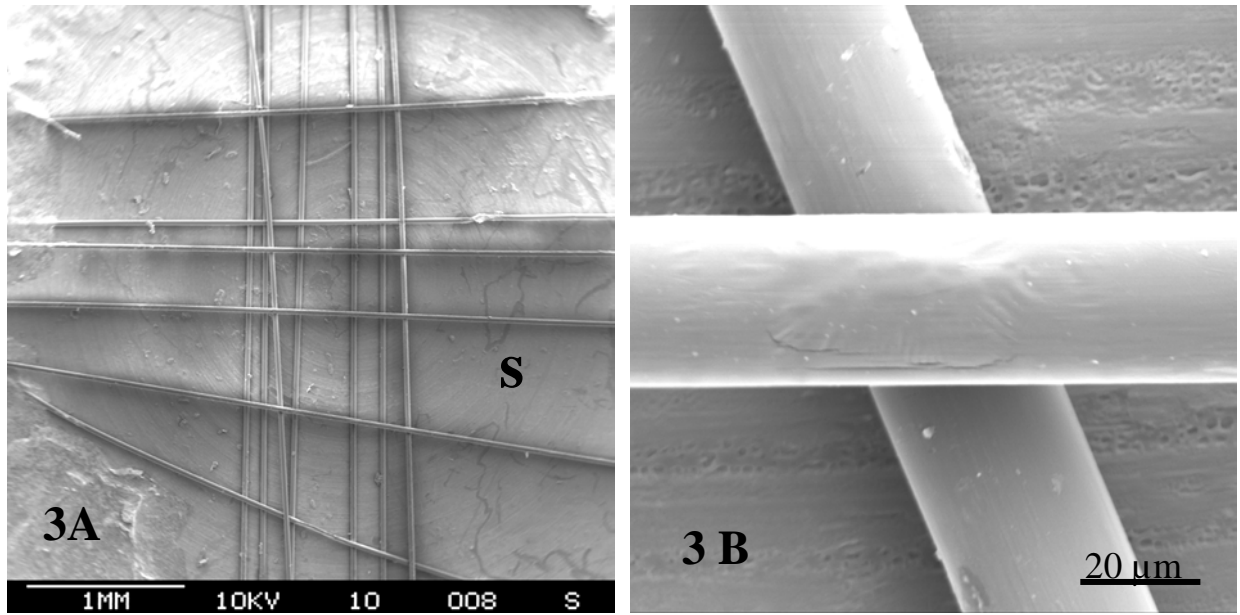


Fig. 3: “Gold standard”. **A.** Short pieces of surgical suture material (Ethicon, Prolene 10-0 metric; average diameter:  $30.45\mu\text{m}$ ) mounted to a specimen stub (s). Note the four layers of suture material simulating four layers of blood vessels. Scanning electron micrograph. **B.** Detail from A. 750x.

## ***ARTIGO III***

---

Three-dimensional arrangement and hemodynamic characteristics of the microvasculature of the rat submandibular gland: a scanning electron microscope and 3D-morphometry study of vascular corrosion casts

<sup>1</sup>Aderson Gegler, <sup>2</sup>Alois Lametschwandtner, <sup>3</sup>Juliana Gazolla, <sup>1</sup>Leo Kraether Neto, <sup>1</sup>Maria Antonieta Lopes de Souza

<sup>1</sup>Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, São Lucas Hospital, Stomatology, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>University of Salzburg, Department of Organismic Biology, Division of Zoology and Functional Anatomy, Vascular and Muscle Research Unit, Hellbrunnerstrasse 34, A-5020 Salzburg, Austria (Europe)

<sup>3</sup>Periodontology – Private Clinic, Porto Alegre, Brazil

Address for correspondence:

Aderson Gegler, R. Dario Pederneiras 41/703, Porto Alegre, RS, 90630-090, Brazil

adersongegler@hotmail.com

Running title: Three-dimensional morphometry of the submandibular gland.

## ABSTRACT

Vascular corrosion casts of submandibular salivary glands of the Wistar rat were studied by scanning electron microscopy (SEM) 3D morphometry. Diameters and branching angles of arteries, arterioles and capillaries were measured and data were tested for underlying design (optimality) principles (minimum lumen volume and pumping power and minimum lumen surface and total shear force on endothelial tissue – minimum endothelial drag). Results show that intraglandular arteries bifurcate repeatedly without a significant decrease in diameters of daughter branches, identifying their distribution function. Non-dimensional parameters like bifurcation index  $\alpha$  and area ratio  $\beta$  reveal no significant differences between arteries and capillaries, or among salivary glands ( $p > 0.05$ ). Total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) show significant differences between two different salivary glands ( $p < 0.05$ ), but not for arteries and capillaries ( $p > 0.05$ ). Scattered data indicate that a) the blood vessels system of the submandibular salivary gland of the Wistar rats follows any of the four optimality design principles and b) these optimality principles allow a wide range of angles without loosing of energy cost for the whole system.

## KEY WORDS

Rat; Submandibular Gland; Blood Vessels; Corrosion Casting; 3D-Morphometry; Scanning Electron Microscopy

## INTRODUCTION

The blood vascular system of salivary glands besides its nutritive function also serves to deliver water, proteins and minerals for saliva production.

Under pathological conditions, e.g. in mucoepidermoid carcinomas (Dillard *et al.*, 2001) and adenoid cystic carcinoma (Ishibashi *et al.*, 2001; Zhang, Peng, Chen, 2005) angiogenesis is reported to occur in salivary glands and it is argued that the changed vascular bed contributes to the high incidence of aggressive metastatic dissemination (Ishibashi *et al.*, 2001). Furthermore, in patients suffering from diabetes mellitus the vascular volume of the salivary glands is significantly increased (Lindeberg, Andersen, 1987). In experimental studies where excretory ducts were ligated to simulate duct obstruction, both number and diameter of blood vessels increased significantly (Clough, Smaje, 1984) forming a highly anastomosing glandular network (Vág *et al.*, 2001).

In pleomorphic adenoma (Xu *et al.*, 2003; Swelam *et al.*, 2005), necrotizing sialometaplasia (Imbery, Edwards, 1996), alcoholic cirrhosis (Scott, Burns, Flower, 1988) or in late age (Scott, 1977; Kobayashi *et al.*, 2004) a decrease of the vasculature of salivary glands is reported. Moreover, patients treated by head and neck radiotherapy experience a decreased saliva production caused by glandular vessel occlusion (Liu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). Glandular ducts can become dilated (Scott, 1980) or acinar tissue can be partially replaced (Scott, Bodner, Baum, 1986). Finally, severe cases of *keratoconjunctivitis sicca* may be effectively treated with vascularized autogenous gland transplantation, and the

understanding of the vascular system is very important to the procedure success (Li *et al.*, 2007).

Presently, the microvasculature of the rat salivary gland is described qualitatively by scanning electron microscopy of vascular corrosion casts (Ohtani *et al.*, 1983a; 1983b). Quantitative data on vessels diameters, interbranching distances and branching angles are still lacking.

Here we study for the first time the vascular bed of the rat submandibular gland quantitatively by SEM of vascular corrosion casts and 3D-morphometry. We (i) measure diameters and branching angles of rat submandibular salivary gland arteries, arterioles and capillaries, (ii) subject data to published formulae (Murray, 1926a; 1926b; Zamir, 1978; 1988a; Gössl *et al.*, 2003a; 2003b), and (iii) test the given vascular geometry against predicted theoretical optimality principles (minimum pumping power, minimum lumen volume, minimum lumen surface, minimum endothelial shear force) to get first insights into the design principles underlying the construction of the vascular tree of the rat submandibular salivary gland.

## MATERIAL AND METHODS

### *Vascular casting*

Vascular corrosion casts of 5 submandibular salivary gland of 5 male Wistar (*Rattus norvegicus*) rats (250-300 grams), were studied by scanning electron microscopy (SEM). Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of 10 mg ketamine chloride and 1 mg xilazine chloride (Agribands, São Paulo, Brazil) per 100 g of weight. After exposure of the heart, 20 UI/ml heparin (per 100 g body weight) were injected in the left ventricle, the ventricle was incised and a nasal catheter #6 (Medplast, Piraquara, Brazil) was introduced into the ascending aorta. Then the descending aorta was ligated, the right atrium was opened, and the circulatory system was perfused with a phosphate buffer solution (0.2 M, pH 7.4 and 37°C) at physiological pressure. After clear reflux from the opened atrium, the head was perfused with 40 ml phosphate buffered paraformaldehyde (4%, 37°C) followed by a perfusion with 40 ml buffer solution. Then 5 ml of propolymerized resin (Mercox CL-2B; Ladd Research, Burlington, USA) were gently mixed with 0.5 ml of monomeric methylmethacrylic acid and injected using manual pressure. The injection was stopped when the resin escaping from the open atrium became highly viscous. Injected animals were left at room temperature (25°C) for 30 min to allow polymerization of the injected resin and then transferred into a water bath at 60°C for 2 hours. Afterwards the animals were decapitated, submandibular salivary glands (and other structures) were exposed by careful dissection, and specimens were macerated in sodium hydroxide (5%, 45°C). Vascular casts were rinsed several times in distilled water, cleaned in 5% formic acid (30 min), rinsed again in distilled water, and air-dried (25°C). Dry specimens were mounted onto specimen stubs with



conductive bridges (Lametschwandtner, Midonski, Simonberger, 1980), coated with carbon and gold, sputtered with gold and examined in a Stereoscan 250 (Cambridge Instruments, Cambridge, UK) at an acceleration voltage of 10 kV. For details on cast preparation see Aharinejad and Lametschwandtner (1992).

The protocol used for vascular casting was approved by the PUCRS Dentistry School Ethical Committee (0082/02).

### *Quantitative Measurements*

For quantitative 3D-measurements, stereopaired digitized SEM images (tilt angle:  $6^\circ$ ) were taken with the scanning electron microscope (Stereoscan 250, Cambridge, UK) equipped with a slow scan frame grabber (Orion 4.27, E.L.I. sprl. Brussels, Belgium) at an accelerating voltage of 10 kV, a working distance of 10mm, and magnifications ranging from 20X to 490X. Images were imported into the 3D-Morphometry software package (Minnich and Muska, OEG, Salzburg, Austria) and diameters ( $d$ ) of arterial and capillary parent and daughter vessels at bifurcations were measured, whereby the diameters of parent vessels were denoted  $d_0$ , those of the larger daughter vessel  $d_1$  and those of the smaller daughter vessel  $d_2$ . Furthermore, the branching angles between parent vessels and larger daughter vessels ( $\theta_1$ ) and between parent vessels and smaller daughter vessels ( $\theta_2$ ) were calculated (Fig. 1) (for detail see Minnich *et al.* (1999)). Capillaries were considered as vessels with diameter smaller than  $16 \mu\text{m}$  (Stöttinger *et al.*, 2006). Arterial and capillary bifurcations were discerned from venous mergings by the characteristic longitudinal endothelial cell nuclei imprints at the surface of the arterial casts, which are longish and are arranged parallel to the vessel long axis instead of veins which are oval to round with no preferred orientation (Midonski *et al.*, 1979).

### *Hemodynamic Characteristics and Calculation of Optimal Values*

Data were used to calculate the bifurcation index  $\alpha$ , which represents the asymmetry ratio of the diameter of the smaller daughter vessel (branch) to that of the larger one:

$$\alpha = \frac{d_2}{d_1}, \quad (1)$$

and the area ratios  $\beta$  of larger and smaller branches to the parent vessel:

$$\beta = \frac{d_1^2 + d_2^2}{d_0^2}. \quad (2)$$

For testing the optimality of consecutive arterial and capillary branchings,  $d_1$  and  $d_2$  were normalized in terms of the diameter of the parent vessel at each bifurcation. Optimally, the diameter of the two branches would be:

$$\frac{d_1}{d_0} = \frac{1}{(1 + \alpha^3)^{1/3}}, \quad (3)$$

$$\frac{d_2}{d_0} = \frac{\alpha}{(1 + \alpha^3)^{1/3}}. \quad (4)$$

(Zamir, 1988a; Zamir, Phipps, 1988; Gössl *et al.*, 2003a). By adding another non-dimensional parameter, the asymmetry ratio  $\alpha'$ ,

$$\alpha' = \frac{d_2^2}{d_1^2}, \quad (5)$$

it is possible to calculate the optimal area ratio  $\beta$

$$\beta = (1 + \alpha')(1 + \alpha'^{3/2})^{-2/3}, \quad (6)$$

Assuming that in a bifurcation the angles the two branches form with the parent vessel are such that they minimize the blood volume contained within the bifurcation and, at the same time, minimize fluid dynamic factors as the pumping power necessary to drive blood

through this bifurcation and keep shear force between blood and endothelium a minimum, then an optimum branching angle will exist for each selected optimality principle.

To find out which optimality principle(s) is (are) ruling the rat submandibular gland vascular bed, we used the formulas proposed by Zamir (1988a), Zamir, Phipps, (1988) and Gössl *et al.* (2003a) namely:

$$\cos \theta_1 = \frac{(1 + \alpha^3)^{4/3} + 1 - \alpha^4}{2(1 + \alpha^3)^{2/3}}, \quad (7)$$

$$\cos \theta_2 = \frac{(1 + \alpha^3)^{4/3} - 1 + \alpha^4}{2\alpha^2(1 + \alpha^3)^{2/3}}, \quad (8)$$

for the optimality principle based on minimizing lumen volume and pumping power, and

$$\cos \theta_1 = \frac{(1 + \alpha^3)^{2/3} + 1 - \alpha^2}{2(1 + \alpha^3)^{1/3}}, \quad (9)$$

$$\cos \theta_2 = \frac{(1 + \alpha^3)^{2/3} - 1 + \alpha^2}{2\alpha(1 + \alpha^3)^{1/3}} \quad (10)$$

for the optimality principle based on minimizing lumen surface and minimum total endothelial shear force (Zamir, 1988a).

In order to assess proximity of the measured values of total branching angles to those derived from theoretical values of the optimality principles, we calculated the mean of the difference between each measured point to the theoretical (optimal) value, namely the distance between both.

An important parameter of a vascular system are the diameter gradients along the tree, that is the rate at which the diameter of vessels decreases from the root to the periphery. An artery which gives off small secondary branches and maintains its diameter over many generations of bifurcations has a distribution function, whereas an artery which successively

gives symmetrical branches over the bifurcations generations, has a delivering function (Zamir, 1988b; Gössl *et al.*, 2003a). To evaluate the vascular tree of the rat submandibular gland in this respect, we calculated theoretical values by using the formulae proposed by Zamir (1988b) which assume an optimum relation between tree diameters, namely:

$$d_0^3 = d_1^3 + d_2^3. \quad (11)$$

In terms of bifurcation index, the equation could be written

$$\frac{d_1}{d_0} = (1 + \alpha^3)^{-1/3} = \lambda, \quad (12)$$

(Zamir, 1988b), whereby  $\lambda$  represents the decreasing diameter ratio at a bifurcation. Considering that the vessel has  $n$  bifurcations before it ends, the ratios can be calculated according the formula proposed by Zamir (1988b), namely:

$$\frac{d_n}{d_0} = (1 + \alpha^3)^{-n/3} = \lambda^n. \quad (13)$$

All mathematical calculation and graphs were done using the Microsoft® Excel 2002 (Microsoft Inc., Redwood, USA).

### *Statistical Analysis*

Data were first submitted to a Kolmogorov-Smirnov-test to test for normal distribution, and then analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) (normally distributed) and a Kruskal-Wallis rank test with *post hoc* Dunn's test (Zar, 1999) (not normally distributed). Pooled data were analyzed by independent  $t$  test (normally distributed) and Mann-Whitney rank sum test (not normally distributed). Differences among groups were considered significant within 95% of confidence intervals. The analysis were performed using

SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) and Stata 9.1 (Stata Corp LP, College Station, USA) and as referred by Zar, (1999).

## RESULTS

Arterial vessels of the submandibular gland revealed diameters of  $119.02 \pm 88.63$   $\mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SD) with diameters ranging from 16.12 to 418.93  $\mu\text{m}$ . Diameters of capillaries were  $13.45 \pm 3.67$   $\mu\text{m}$  with a diameter range from 7.38 to 15.74  $\mu\text{m}$  (see also Table 1).

The bifurcation index  $\alpha$  of arterial vessels ranged from 0.18 to 0.98 ( $0.66 \pm 0.20$ ), that of capillaries from 0.57 to 0.95 ( $0.74 \pm 0.12$ ). Mann-Whitney rank sum test revealed no significant differences ( $p = 0.175$ ) (Table 2). Bifurcation indexes  $\alpha$  of the five salivary glands studied (Table 3) did not differ significantly (Kruskal-Wallis rank test,  $p = 0.075$ ), the range of means was found to be from  $0.59 \pm 0.21$  to  $0.73 \pm 0.17$ .

Total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) showed no significant differences between arteries and capillaries (Mann-Whitney test,  $p = 0.292$ ). Angles ranged from  $30.00^\circ$  to  $247.09^\circ$  ( $81.63 \pm 27.20$ ) in arterial vessels and  $21.56^\circ$  to  $164.24^\circ$  ( $92.07 \pm 43.86$ ) in capillaries (see also Table 2). Significant differences, however, were found between the salivary glands (Kruskal-Wallis rank test,  $p = 0.013$  and Dunn *post hoc* test) with the differences just between the both extreme mean values ( $99.32^\circ \pm 38.38$  and  $65.84^\circ \pm 26.29$ ) from glands #2 and #5.

An independent  $t$  test revealed no significant differences ( $p = 0.066$ ) between the area ratio  $\beta$  of arterial vessels and capillaries, whereby  $\beta$  ranged from 0.68 to 1.85 ( $1.26 \pm 0.19$ ) in arteries and from 0.78 to 1.80 ( $1.29 \pm 0.26$ ) in capillaries (see also Table 2). No significant difference for area ratio  $\beta$  were found among the five salivary glands studied (one-

way ANOVA test,  $p = 0.837$ ) (see also Table 3). The minimum and maximum values were  $1.24 \pm 0.19/0.26$  and  $1.29 \pm 0.17$ .

Plots of total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) against bifurcation index  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations (Fig. 2) revealed a great dispersal of capillary data points. Data points from arterial vessels were less dispersed and tended to be more gathered around the full line representing the optimal values of the principles of minimum lumen surface and minimum drag rather than around the dashed line, representing the optimal values of the principles of minimum lumen volume and minimum pumping power. Considering optimal principles of minimum lumen volume (LV) and minimum pumping power (PP), the mean of the distances between each measured point and the theoretical predicted optimal values for the total bifurcation angle ( $\theta_1 + \theta_2$ ) were  $-1.83 \pm 32.97$  for arterial vessel and  $6.01 \pm 50.29$  for capillaries (see also Table 4). In respect to the optimality principle of minimum lumen surface (LS) and minimum shear force (SF) the means were  $-26.20 \pm 33.88$  for arterial vessels and  $-19.59 \pm 49.56$  for capillaries. Negative values indicate that the average data points lie below the line for the theoretical optimum, while positive values indicate that most data points are above this line.

Comparing plots of total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) against bifurcation indexes  $\alpha$  of each salivary gland (Fig. 3), a wide dispersal of data points is seen, but most of the points concentrate around the full line, representing the theoretical optimum for the principles of minimum pumping power and minimum lumen volume. Interestingly, salivary glands #2 and #5 differ significantly in this matter ( $p = 0.013$ ), while others do not. So the mean ( $99.32 \pm 38.38$ ) of total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of salivary gland #2 lies close to the dashed line, representing the theoretical optimum for the principles of minimum pumping power and

minimum lumen volume, while the corresponding mean of salivary gland #5 ( $65.84 \pm 26.29$ ) and the three other glands remained closer to the full line. Table 4 shows the means of the distances between measured total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) and the optimal values (full and dashed lines on Fig 2 and 3) for each salivary gland as they relate to a particular optimality principle. None of the means surmount the LS and SF optimum line, but all remain closer to the LV and PP optimum line.

Plot of diameter ratios of larger daughter branches to parent vessel ( $d_1/d_0$ ) against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial ( $0.93 \pm 0.07$ ) and capillary ( $0.90 \pm 0.08$ ) bifurcations (Fig. 4) revealed that both sets of data points (for arteries and for capillaries) concentrated near the optimum values represented by the full line. The same tendency is observed when the diameter ratios of the smaller daughter branches to parent vessel ( $d_2/d_0$ ) are plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial ( $0.60 \pm 0.17$ ) and capillary ( $0.67 \pm 0.12$ ) bifurcations (Fig. 5). Mann-Whitney rank sum test showed no significant differences between arterial vessels and capillaries for both parameters  $d_1/d_0$  ( $p = 0.098$ ) and  $d_2/d_0$  ( $p = 0.323$ ). The comparison among different salivary glands also did not show any significant difference neither for  $d_1/d_0$  (means ranged from  $0.89 \pm 0.10$  to  $0.94 \pm 0.5$ ) nor for  $d_2/d_0$  (means ranged from  $0.56 \pm 0.19$  to  $0.65 \pm 0.15$ ) (Kruskal-Wallis rank test,  $p = 0.088$  and  $p = 0.458$ , respectively).

Plotting area ratio  $\beta$  of arterial vessels and capillaries against bifurcation indexes  $\alpha$  demonstrated that data points for bifurcation indexes  $\alpha < 0.60$  remained close to the theoretical optimum line (Fig. 6). Interestingly, capillaries did not show bifurcation indexes lower than  $\sim 0.55$ .



When plotting decreasing diameter ratios of arterial vessels of each submandibular gland over all bifurcation levels and the lines for the theoretical optimum values it became evident that calculated diameter gradients remained over theoretical data indicating that these vessels rather have a distributive than a delivering function (Fig. 7).

## DISCUSSION

Quantitative studies of the vascular tree by means of 3D-morphometry and scanning electron microscopy (SEM) of vascular corrosion casts are still few (Malkusch *et al.*, 1995; Cecon, Minnich, Lametschwandtner, 2002; Kachlik *et al.*, 2006; Stöttinger *et al.*, 2006). Studies on the salivary glands done by SEM of vascular casts focused in great detail on vascular patterns of intra- and interlobular vessels, but remained descriptive (Ohtani *et al.*, 1983a, 1983b). Here we present for the first time quantitative data on the rat submandibular glands microvascular tree and gain first insights into the spatial geometry of the arterial tree and capillary bed in terms of dimensional and angular relations between parent and daughter vessels at consecutive bifurcations.

When subjecting vascular corrosion casts to linear measurements (e.g. vessel diameters, intervascular and interbranching distances) by an accurate 3D-morphometry system (Malkusch *et al.*, 1995; Minnich *et al.*, 1999) shrinkage of the resin used has to be taken into account (Kratky, Roach, 1984; Weiger, Lametschwandtner, Adam, 1982). If dimensional data (diameters, intervascular and/or interbranching distances) is to be compared, e.g. between different experimental protocols, then the absolute numbers have to be corrected. If, however, data is used to gain non-dimensional relations like the bifurcation index  $\alpha$  or the area ratio  $\beta$ , then the linear shrinkage can be neglected assuming it to be the same in all directions. For other sources of errors inherent to the SEM vascular corrosion casting technique see Lametschwandtner, Lametschwandtner, Weiger (1990).

Absolute dimensions of (luminal) diameters of arteries primarily relate to the size of the organ and the number of the arteries supplying the organ, while for capillaries the metabolic activity of the organ under consideration matters with capillary diameters decreasing during vertebrate evolution. While we find mean capillary diameters in the rat submandibular gland around  $13.45\mu\text{m}$  (Table 1) Stöttinger *et al.* (2006) in the brain of the Pacific hagfish, *Eptatretus stouti* report mean capillary diameters of  $15.93\ \mu\text{m}$ .

The bifurcation index  $\alpha$  is an important non-dimensional parameter which characterizes the symmetry of a bifurcation. The closer  $\alpha$  comes to 1 the more symmetric a bifurcation is. In the rat submandibular gland inter- and intralobular arteries always revealed a lower  $\alpha$  than did capillaries. This clearly indicates that arterial bifurcations are non-symmetrical with larger daughter vessels that maintain the main flow over several branching orders. For details see Table 2.

Bifurcation indexes  $\alpha$  of capillaries never were smaller than  $\sim 0.55$  (for data see Figs. 4-6). These capillary bifurcations and the resulting capillary meshwork closely correspond with salivary gland microanatomy (Ohtani *et al.*, 1983a, 1983b).

When comparing diameter ratios of larger daughter vessels and parent vessels, i.e.  $d_1/d_0$  (Fig. 3) and smaller daughter vessel and parent vessel, i.e.  $d_2/d_0$  (Fig. 4) in arteries and in capillaries, no significant differences ( $p > 0.05$ ) were found. Interestingly, data remain impressively close to the theoretical optima lines, demonstrating that inter- and intralobular arteries of the rat submandibular salivary glands follow the branching diameters law which states that as within a defined vascular portion more symmetrical branches are, the more the larger branch diameters will decrease and the diameter of the smaller branch will become

similar to that of the parent vessel. The same behaviour was described for arterial bifurcations of the human retina (Zamir, Medeiros, Cunningham, 1979), the human and rat cardiovascular system (Zamir, Wrigley, Langille, 1983; Zamir, 1986), the arterial vasa vasorum of porcine coronary arteries (Gössl *et al.*, 2003), and for the cerebellum and rhombencephalon of the starlet (Stöttinger *et al.*, 2006). The finding that there exist no significant differences ( $p > 0.05$ ) among data from different salivary gland of the rats studied indirectly reflects the homogenous group of Wistar rats studied.

Other than the diameter ratios of arterial and capillary bifurcations which gather rather close around the lines representing the theoretical optima, data points of total branching angles scatter considerably around the theoretical optimum (see Figs. 2 and 3) a situation reported also by Zamir, Bigelow (1984). If this reflects a greater variability of the branching angles in general or if the casting procedure causes random changes in the geometry of bifurcations, remains a matter for further studies. In the adult rat submandibular salivary gland, means of total branching angles of arteries and capillaries tend to locate between the lines representing the optima for LV/PP and LS/SF. The observation that means located neither above nor even close to the line for LS/SF resembles the situation reported for arterial bifurcations in the retina by 2D-morphometry measurements (Zamir, Medeiros, Cunningham, 1979) and for total bifurcation angles of arteries and capillaries in the brain of hagfishes by 3D-morphometry (Cecon, Minnich, Lametschwandtner, 2002), where also lower total branching angles were found. In contrast, total bifurcation angles of vasa vasorum of porcine coronary arteries are reported to lie commonly above the LS/SF line (Gössl *et al.*, 2003). From the wide scattering of total branching angles reported here (see Figs. 2 and 3) and those reported by others (Zamir, Medeiros, Cunningham, 1979; Zamir, Bigelow, 1984; Cecon, Minnich, Lametschwandtner, 2002; Lametschwandtner *et al.*, 2004; Stöttinger *et al.*, 2006;

Kachlik *et al.*, 2007) we conclude that none of the optimality principles we tested (LV, PP, LS or SF) dominates the design of arterial and capillary bifurcations of the Wistar rat submandibular glands. The penalty costs for scattering of total bifurcation angles demonstrated in the cardiovascular system, is reported to be around 2% and thus is very low (Zamir, Bigelow, 1984). Further studies on vascular casts of rat salivary glands should focus on the energetic costs of this scattering.

The bifurcation indexes of the arterial tree of the adult Wistar rat submandibular salivary glands reflect the distribution function of these vessels (Fig 7). The indexes mirror that these arteries have many branching levels whereby at each branching site the larger daughter vessel ( $d_1$ ) maintains an almost constant diameter and conducts the majority of the blood over many bifurcation levels, whereas the reduction of the diameter of the smaller daughter vessel ( $d_2$ ) is much steeper leading to a steeper decrease in blood flow. While the larger daughter vessels continue as interlobular vessels and thus conduct blood towards the distant gland lobules, the smaller daughter vessels ( $d_1$ ) enter the lobules to become the intralobular arteries which deliver blood towards the capillary bed. This is in agreement with anatomical records of others studies (Ohtani, 1983a, 1983b).

As we found significant differences between the extreme values of the total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) only, but not between individual glands (Table 3) we conclude that the submandibular glands we studied had a similar healthy structure. Data gained will provide a reference database for future research on the vascular tree of pathologically changed salivary glands. Such situations may include Sjögren Syndrome, any kind of tumor, salivary glands irradiated during radiotherapy of head and neck, or just any situation where substantial increases or decreases in tissue mass and composition deserve adequate changes in blood

supply to cover the new metabolic demands. If these needs pose new rules on the design principles and force the vascular tree in this situation to deviate from optimality principles remains to be studied.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks Prof Felipe Luis Schneider (Laboratory of Neuroanatomy, Department of Morphological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul) for allowing access to the Laboratory of Neuroanatomy, Prof Bernd Minnich and Prof Wolf-Dietrich Krautgartner (Department of Organismic Biology, Division of Zoology and Functional Anatomy, University of Salzburg) for indispensable technical help on the SEM and to Ms. Synnöve Tholo (Department of Organismic Biology, Division of Zoology and Functional Anatomy, University of Salzburg) and Mr. Antônio Generoso Severino (Laboratory of Neuroanatomy, Department of Morphological Sciences, UFRGS) for assistance on the laboratory work. The author (A.G.) was supported by grants from the CAPES Foundation, DF, Brazil (42005019022D9 and BEX1335-06-5).

## REFERENCES

- Aharinejad, S. & Lametschwandtner, A. (1992) *Microvascular Corrosion Casting in Scanning Electron Microscopy*, Springer-Verlag, Vienna.
- Cecon, S., Minnich, B. & Lametschwandtner, A. (2002) Vascularization of the brains of the Atlantic and Pacific hagfishes, *Myxine glutinosa* and *Eptatretus stouti*: a scanning electron microscope study of vascular corrosion casts. *J Morphol*, **253**, 51-63.
- Clough, G. & Smaje, L. H. (1984) Exchange area and surface properties of the microvasculature of the rabbit submandibular gland following duct ligation. *J Physiol*, **354**, 445-456.
- Dillard, D. G., Muller, S., Cohen, C., Bloch, D., Del Gaudio, J. M. & Gal, A. A. (2001) High tumor grade in salivary gland mucoepidermoid carcinomas and loss of expression of transforming growth factor beta receptor type II. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **127**, 683-686.
- Gössl, M., Rosol, M., Malyar, N. M., Fitzpatrick, L. A., Beighley, P. E., Zamir, M. & Ritman, E. L. (2003a) Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, **272**, 526-537.
- Gössl, M., Malyar, N. M., Rosol, M., Beighley, P. E. & Ritman, E. L. (2003b) Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**, H2019-2026.
- Imbery, T. A. & Edwards, P. A. (1996) Necrotizing sialometaplasia: literature review and case reports. *J Am Dent Assoc*, **127**, 1087-1092.
- Ishibashi, H., Shiratuchi, T., Nakagawa, K., Onimaru, M., Sugiura, T., Sueishi, K. & Shirasuna, K. (2001) Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland

carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol*, **37**, 77-83.

Kachlik, D., Baca, V., Stingl, J., Sosna, B., Lametschwandtner, A., Minnich, B. & Setina, M. (2007) Architectonic arrangement of the vasa vasorum of the human great saphenous vein. *J Vasc Res*, **44**, 157-166.

Kim, D. W., Huamani, J., Niermann, K. J., Lee, H., Geng, L., Leavitt, L. L., Baheza, R. A., Jones, C. C., Tumkur, S., Yankeelov, T. E., Fleischer, A. C. & Hallahan, D. E. (2006) Noninvasive assessment of tumor vasculature response to radiation-mediated, vasculature-targeted therapy using quantified power Doppler sonography: implications for improvement of therapy schedules. *J Ultrasound Med*, **25**, 1507-1517.

Kobayashi, S., Kamino, Y., Hiratsuka, K., Kiyama-Kishikawa, M. & Abiko, Y. (2004) Age-related changes in IGF-1 expression in submandibular glands of senescence-accelerated mice. *J Oral Sci*, **46**, 119-125.

Kratky, R. G. & Roach, M. R. (1984) Shrinkage of Batson's and its relevance to vascular casting. *Atherosclerosis*, **51**, 339-341.

Lametschwandtner, A., Lametschwandtner, U. & Weiger, T. (1990) Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts-technique and applications: updated review. *Scanning Microsc*, **4**, 889-940; discussion 941.

Lametschwandtner, A., Minnich, B., Kachlik, D., Setina, M. & Stingl, J. (2004) Three-dimensional arrangement of the vasa vasorum in explanted segments of the aged human great saphenous vein: scanning electron microscopy and three-dimensional morphometry of vascular corrosion casts. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, **281**, 1372-1382.

Lametschwandtner, A., Miodonski, A. & Simonsberger, P. (1980) On the prevention of specimen charging in scanning electron microscopy of vascular corrosion casts by attaching conductive bridges. *Mikroskopie*, **36**, 270-273.



- Li, L., Gao, X. L., Song, Y. Z., Xu, H., Yu, G. Y., Zhu, Z. H. & Liu, J. M. (2007) Anatomy of arteries and veins of submandibular glands. *Chin Med J (Engl)*, **120**, 1179-1182.
- Lindeberg, H. & Andersen, L. (1987) The size and composition of the submandibular glands in late-onset diabetes. *Arch Otorhinolaryngol*, **244**, 100-103.
- Liu, W. S., Kuo, H. C., Lin, J. C., Su, M. C., Lee, J. K., Chou, M. J., Chou, M. C. & Lee, H. (2006) Assessment of salivary function change in nasopharyngeal carcinoma treated by parotid-sparing radiotherapy. *Cancer J*, **12**, 494-500.
- Malkusch, W., Konerding, M. A., Klaphor, B. & Bruch, J. (1995) A simple and accurate method for 3-D measurements in microcorrosion casts illustrated with tumour vascularization. *Anal Cell Pathol*, **9**, 69-81.
- Minnich, B., Leeb, H., Bernroider, E. W. & Lametschwandtner, A. (1999) Three-dimensional morphometry in scanning electron microscopy: a technique for accurate dimensional and angular measurements of microstructures using stereopaired digitized images and digital image analysis. *J Microsc*, **195**, 23-33.
- Miodonski, A., Poborowska, J. & Friedhuber de Grubenthal, A. (1979) SEM study of the choroid plexus of the lateral ventricle in the cat. *Anat Embryol (Berl)*, **155**, 323-331.
- Murray, C. D. (1926a) The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **12**, 207-214.
- Murray, C. D. (1926b) The Physiological Principle of Minimum Work: II. Oxygen Exchange in Capillaries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **12**, 299-304.
- Ohtani, O., Kikuta, A., Ohtsuka, A., Taguchi, T. & Murakami, T. (1983a) Microvasculature as studied by the microvascular corrosion casting/scanning electron microscope method. I. Endocrine and digestive system. *Arch Histol Jpn*, **46**, 1-42.
- Ohtani, O., Ohtsuka, A., Lipsett, J. & Gannon, B. (1983b) The microvasculature of rat salivary glands. A scanning electron microscopic study. *Acta Anat (Basel)*, **115**, 345-356.

- Scott, J. (1977) Degenerative changes in the histology of the human submandibular salivary gland occurring with age. *J Biol Buccale*, **5**, 311-319.
- Scott, J. (1980) Qualitative and quantitative observations on the histology of human labial salivary glands obtained post mortem. *J Biol Buccale*, **8**, 187-200.
- Scott, J., Bodner, L. & Baum, B. J. (1986) Assessment of age-related changes in the submandibular and sublingual salivary glands of the rat using stereological analysis. *Arch Oral Biol*, **31**, 69-71.
- Scott, J., Burns, J. & Flower, E. A. (1988) Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J Clin Pathol*, **41**, 837-840.
- Söttinger, B., Klein, M., Minnich, B. & Lametschwandtner, A. (2006) Design of cerebellar and nontegmental rhombencephalic microvascular bed in the sterlet, *Acipenser ruthenus*: a scanning electron microscope and 3D morphometry study of vascular corrosion casts. *Microsc Microanal*, **12**, 376-389.
- Swelam, W., Ida-Yonemochi, H., Maruyama, S., Ohshiro, K., Cheng, J. & Saku, T. (2005) Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Arch*, **446**, 653-662.
- Vág, J., Hably, C., Keremi, B., Kovacs, E., Bartha, J. & Fazekas, A. (2001) Role of nitric oxide in the regulation of blood flow in the rat submandibular gland during carotid artery occlusion. *Arch Oral Biol*, **46**, 261-267.
- Weiger, T., Lametschwandtner, A. & Adam, H. (1982) Methylmethacrylat und Mercor CL in der Rasterelektronenmikroskopie von Korrosionspräparaten. *Mikroskopie*, **39**, 187-197.
- Xu, H., Shimizu, Y., Niki, T., Nagasaka, H., Kawamura, H. & Ooya, K. (2003) Pleomorphic adenoma of the submandibular salivary glands with marked ossification. *J Oral Pathol Med*, **32**, 499-501.

- Zamir, M. (1978) Nonsymmetrical bifurcations in arterial branching. *J Gen Physiol*, **72**, 837-845.
- Zamir, M. (1986) Cost analysis of arterial branching in the cardiovascular systems of man and animals. *J Theor Biol*, **120**, 111-123.
- Zamir, M. (1988a) The branching structure of arterial trees. *Comments Theor Biol*, **1**, 15-37.
- Zamir, M. (1988b) Distributing and delivering vessels of the human heart. *J Gen Physiol*, **91**, 725-735.
- Zamir, M. & Bigelow, D. C. (1984) Cost of departure from optimality in arterial branching. *J Theor Biol*, **109**, 401-409.
- Zamir, M., Medeiros, J. A. & Cunningham, T. K. (1979) Arterial bifurcations in the human retina. *J Gen Physiol*, **74**, 537-548.
- Zamir, M. & Phipps, S. (1988) Network analysis of an arterial tree. *J Biomech*, **21**, 25-34.
- Zamir, M., Wrigley, S. M. & Langille, B. L. (1983) Arterial bifurcations in the cardiovascular system of a rat. *J Gen Physiol*, **81**, 325-335.
- Zar, J. (1999) *Biostatistical analysis*, Prentice-Hall, Upper Saddle River.
- Zhang, J., Peng, B. & Chen, X. (2005) Expressions of nuclear factor kappaB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. *Clin Cancer Res*, **11**, 7334-7343.

## TABLES

Table 1: Luminal diameters ( $\mu\text{m}$ ) of arteries and capillaries of the submandibular gland of adult Wistar rats

<i>Area</i>	<i>n</i>	<i>Mean (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>sd</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Arteries	357	119.02	88.63	16.12	418.93
Capillaries	51	13.45	3.67	7.38	15.74

*n* = number of measured diameters

Table 2: Bifurcation index ( $\alpha$ ), total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) and area ratio ( $\beta$ ) of arteries and capillaries of the submandibular gland of adult Wistar rats

		<i>Arteries</i>	<i>Capillaries</i>
$\alpha$	<i>n</i>	119	17
	<b><i>Mean <math>\pm</math> sd</i></b>	<b>0.66 <math>\pm</math> 0.20</b>	<b>0.74 <math>\pm</math> 0.12</b>
	<i>Max – Min</i>	0.18 - 0.98	0.57 - 0.95
$\theta_1 + \theta_2(^{\circ})$	<i>n</i>	105	13
	<b><i>Mean <math>\pm</math> sd</i></b>	<b>81.63 <math>\pm</math> 27.20</b>	<b>92.07 <math>\pm</math> 43.86</b>
	<i>Max – Min</i>	30.00 – 247.09	21.56 – 164.24
$\beta$	<i>n</i>	119	17
	<b><i>Mean <math>\pm</math> sd</i></b>	<b>1.26 <math>\pm</math> 0.19</b>	<b>1.29 <math>\pm</math> 0.26</b>
	<i>Max – Min</i>	(0.68 – 1.85)	(0.78 – 1.89)

For  $\alpha$ , means do not differ significantly, Mann-Whitney rank sum test ( $p = 0.175$ )

For  $(\theta_1 + \theta_2)$ , means do not differ significantly, Mann-Whitney rank sum test ( $p = 0.292$ )

For  $\beta$ , means do not differ significantly, Independent  $t$  test ( $p = 0.066$ )

Table 3: Bifurcation index ( $\alpha$ ), total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) and area ratio ( $\beta$ ) of arteries and capillaries of five submandibular glands of adult Wistar rats

Gland #	$\alpha$			$\theta_1 + \theta_2(^{\circ})$			$\beta$		
	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
1	31	0.73	0.17	30	83.97	28.93	31	1.24	0.26
2	29	0.65	0.24	23	99.32*	38.38	29	1.26	0.19
3	28	0.59	0.21	26	79.78	19.39	28	1.24	0.19
4	28	0.66	0.15	24	83.51	26.10	28	1.29	0.17
5	20	0.72	0.17	17	65.84*	26.29	20	1.28	0.19

For  $\alpha$ , Kruskal-Wallis rank test shows no significant differences among groups,  $p = 0.075$

For ( $\theta_1 + \theta_2$ ), Kruskal-Wallis rank test followed by Dunn *post hoc* test shows that means followed by \* differ significantly from each other,  $p = 0.013$

For  $\beta$ , one-way ANOVA test shows no significant difference among groups,  $p = 0.837$

Table 4: Mean of distance between measured values of total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of arterial and capillaries bifurcations of the adult Wistar rats submandibular glands from the lines representing optimality principle of Minimum Lumen Volume (LV) and Minimum Pumping Power (PP) or Minimum Lumen Surface (LS) and Minimum Shear Force (SF)

Optimality Principle	LV and PP ( $\theta_1 + \theta_2$ )	LS and SF ( $\theta_1 + \theta_2$ )
Glands #	<i>Mean</i> $\pm$ <i>sd</i>	<i>Mean</i> $\pm$ <i>sd</i>
1	8.04 $\pm$ 28.81	-17.10 $\pm$ 29.20
2	4.42 $\pm$ 49.34	-18.77 $\pm$ 49.63
3	-1.75 $\pm$ 23.60	-26.85 $\pm$ 28.29
4	-1.89 $\pm$ 33.61	-26.24 $\pm$ 32.89
5	-19.08 $\pm$ 33.17	-44.02 $\pm$ 31.96
Arteries	-1.83 $\pm$ 32.97	-26.20 $\pm$ 33.88
Capillaries	6.01 $\pm$ 50.29	-19.59 $\pm$ 49.56
Total	-0.84 $\pm$ 35.46	-25.36 $\pm$ 36.06

Values close to "zero" represent means of groups closest to the line for the optimality principle

Negative values indicate that means locate below the line for the optimality principle, positive values indicate that means located above the line for the principle

## FIGURES

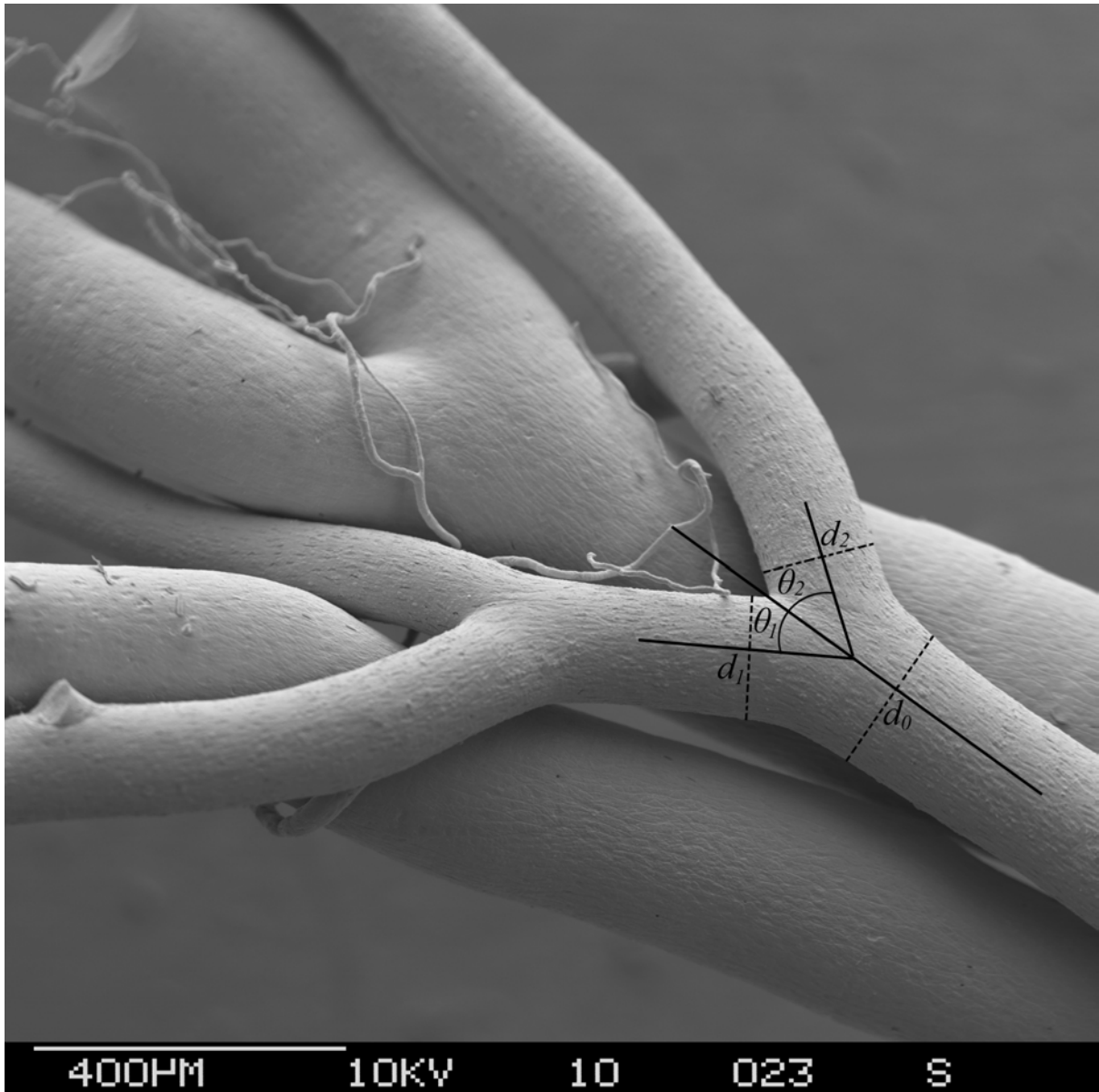


Figure 1: Dissected from the main vascular tree of a rat submandibular gland, an almost symmetrical bifurcation.  $d_0$  is the diameter of the larger (parent) vessel,  $d_1$  of the larger daughter vessel and  $d_2$  of the smaller daughter vessel.  $\theta_1$  and  $\theta_2$  are the branching angles at which the larger and the smaller branches, respectively, arise from the parent vessel. 60X, WD 10mm.

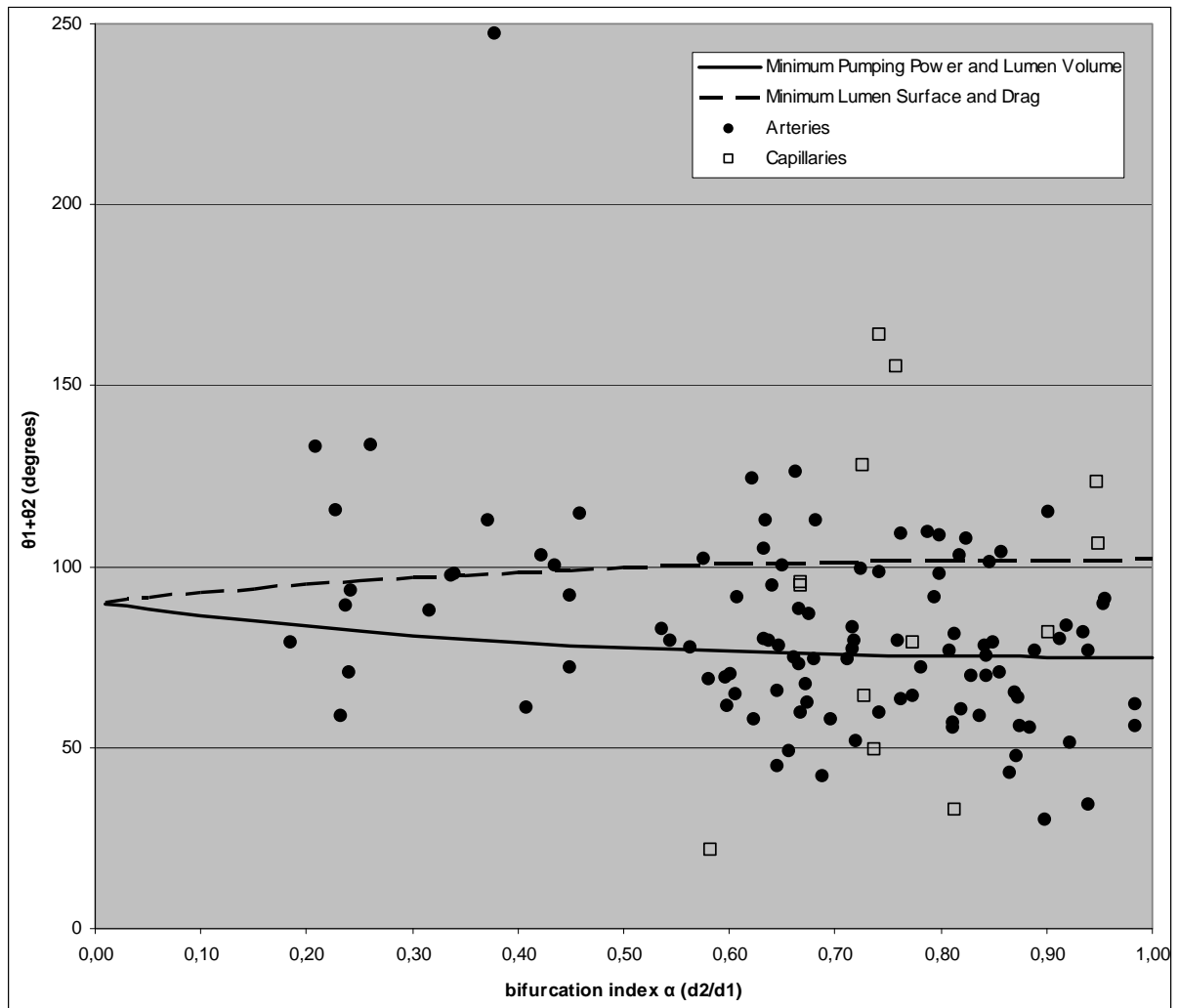


Figure 2: Bifurcation indexes  $\alpha$  plotted against total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of arteries and capillaries of submandibular glands in adult Wistar rats. The full and dashed lines represent the optimal values derived from equations (7) to (10). Means do not differ significantly ( $p = 0.292$ ).

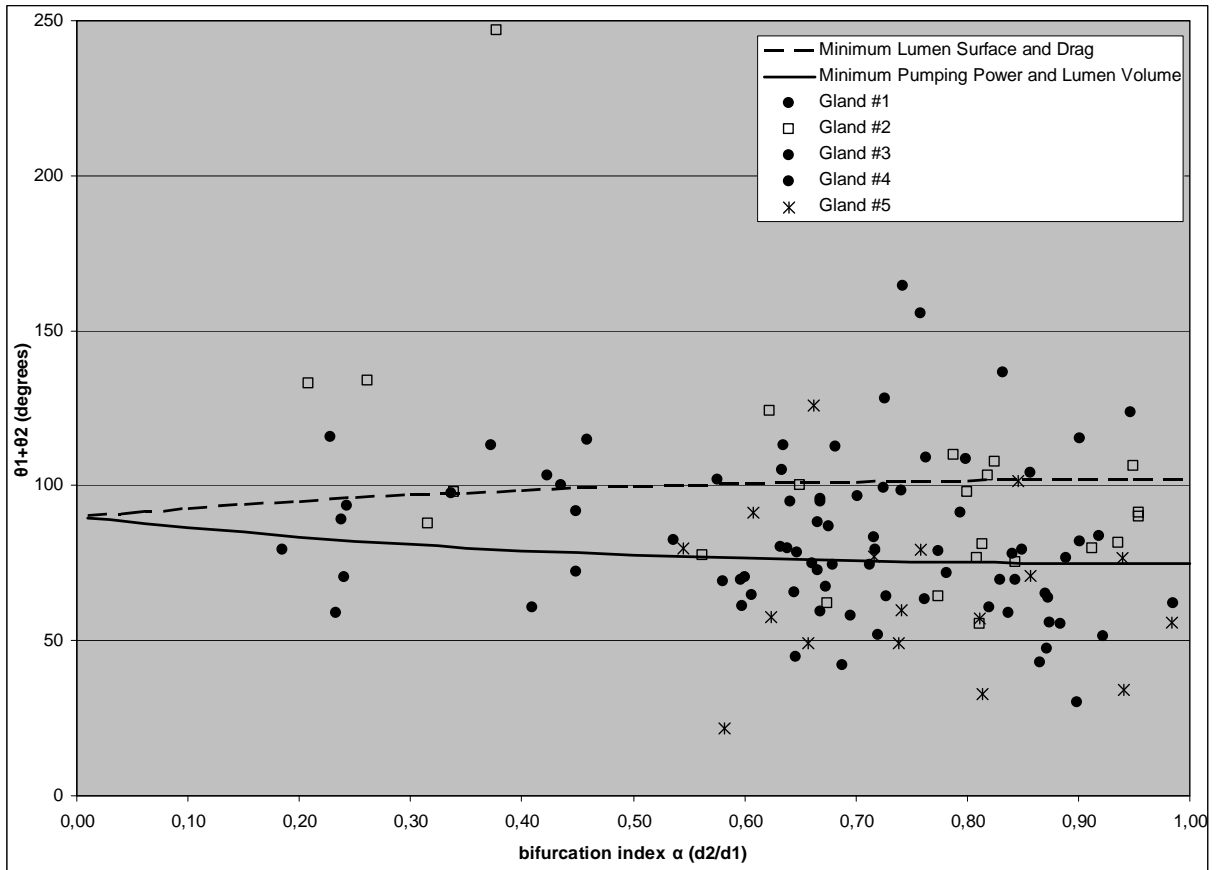


Figure 3: Bifurcation indexes  $\alpha$  plotted against total bifurcation angles ( $\theta_1 + \theta_2$ ) of five submandibular glands of adult Wistar rats. Glands #2 and #5 are significantly different from each other ( $p = 0.013$ ). The full and dashed lines represent the optimal values derived from equations (7) to (10).



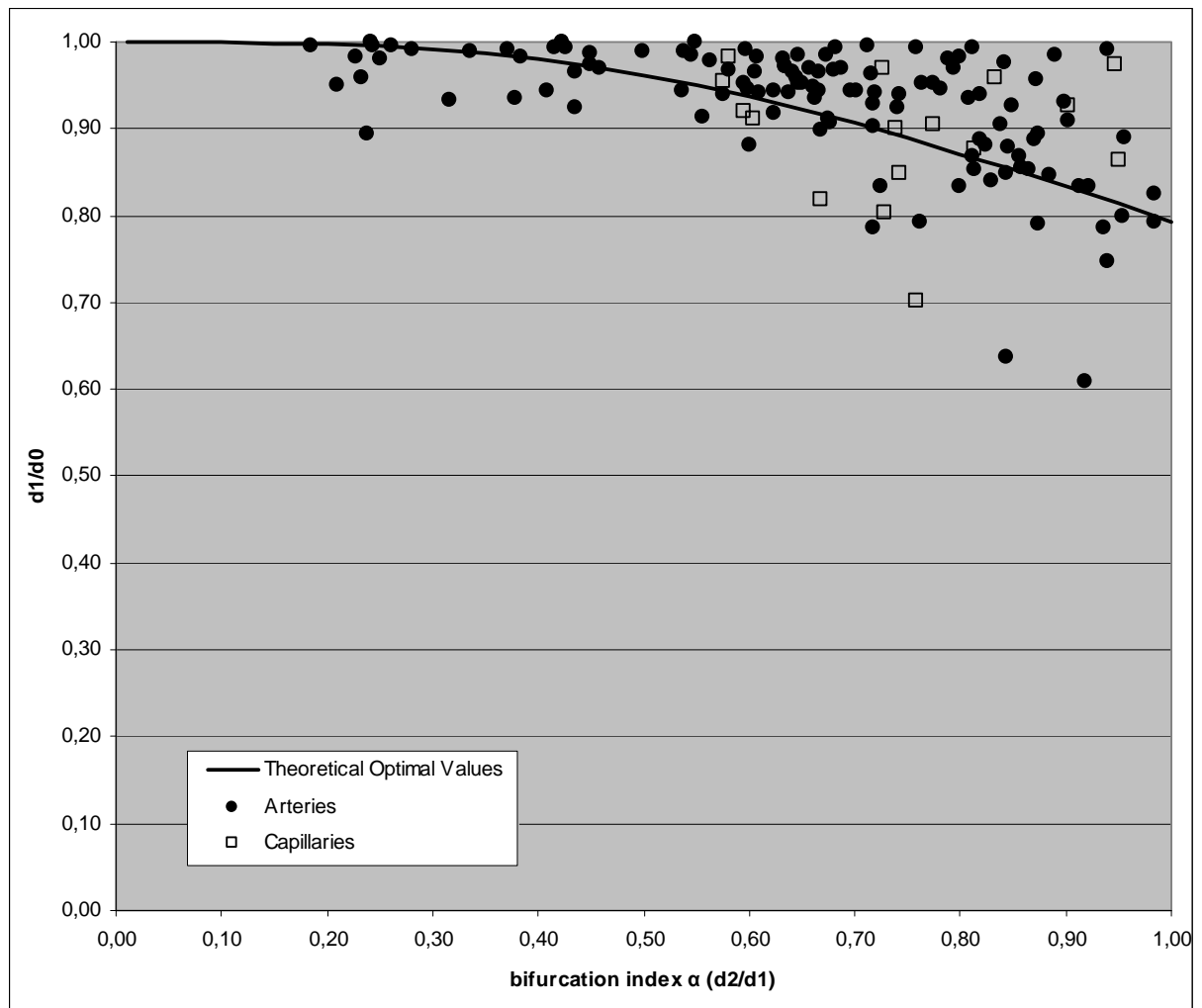


Figure 4: Diameter ratios of the larger branch to the parent vessel ( $d_1/d_0$ ) plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations of submandibular glands of adult Wistar rats. The full line represents the optimal values for vessel diameters derived from equation (3). Neither Mann-Whitney rank sum test shows a significant difference between arteries and capillaries ( $p = 0.098$ ) nor does Kruskal-Wallis rank test reveal a significant difference among salivary glands ( $p = 0.088$ ).

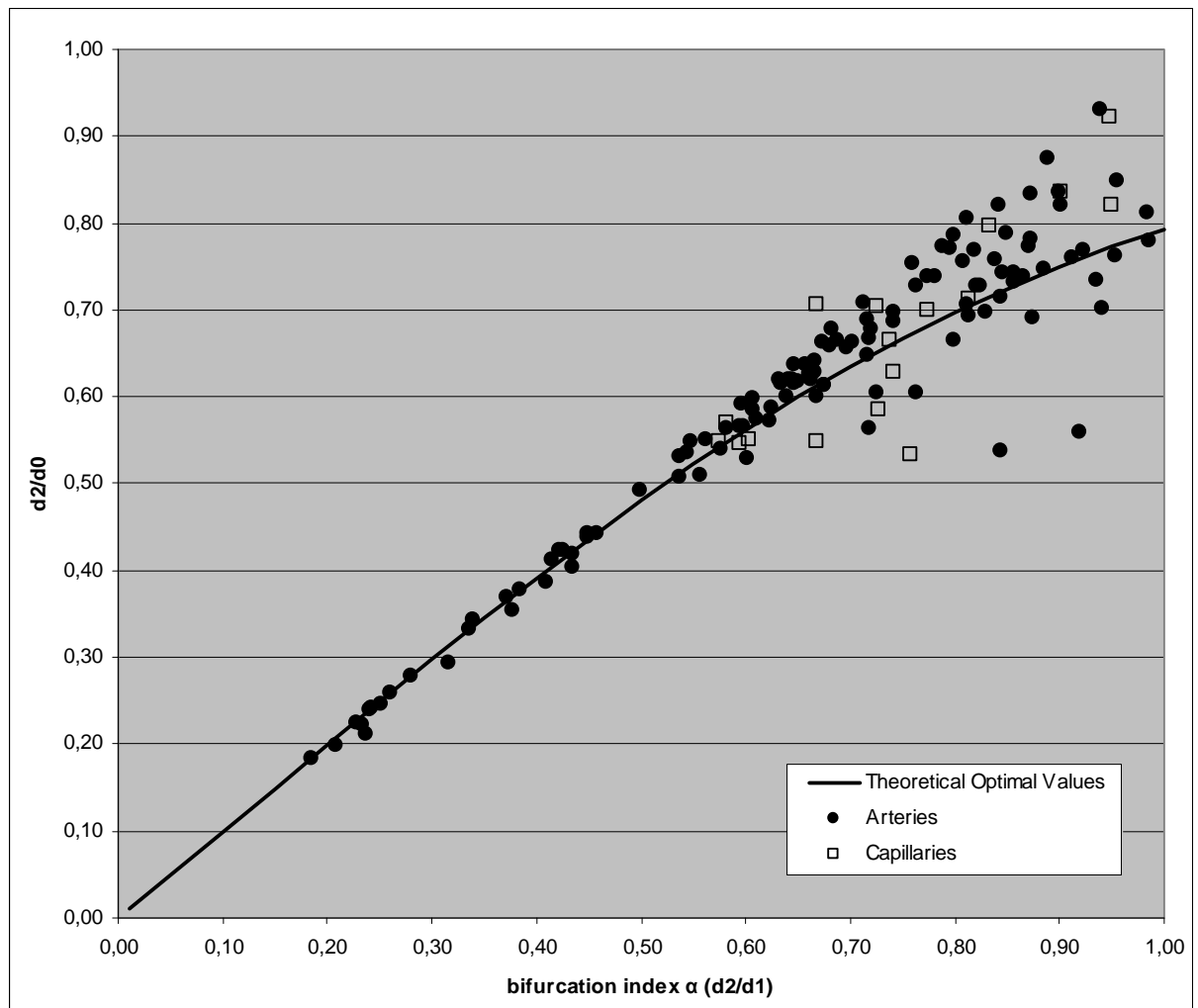


Figure 5: Diameter ratios of the smaller branch to the parent vessel ( $d_2/d_0$ ) plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations of the submandibular glands of adult Wistar rats. The full line represents the theoretical optimal values for vessel diameters derived from equation (4). Neither Mann-Whitney rank sum test shows significant difference between arteries and capillaries ( $p = 0.323$ ), nor does Kruskal-Wallis rank test shows a significant difference among salivary glands ( $p = 0.458$ ).

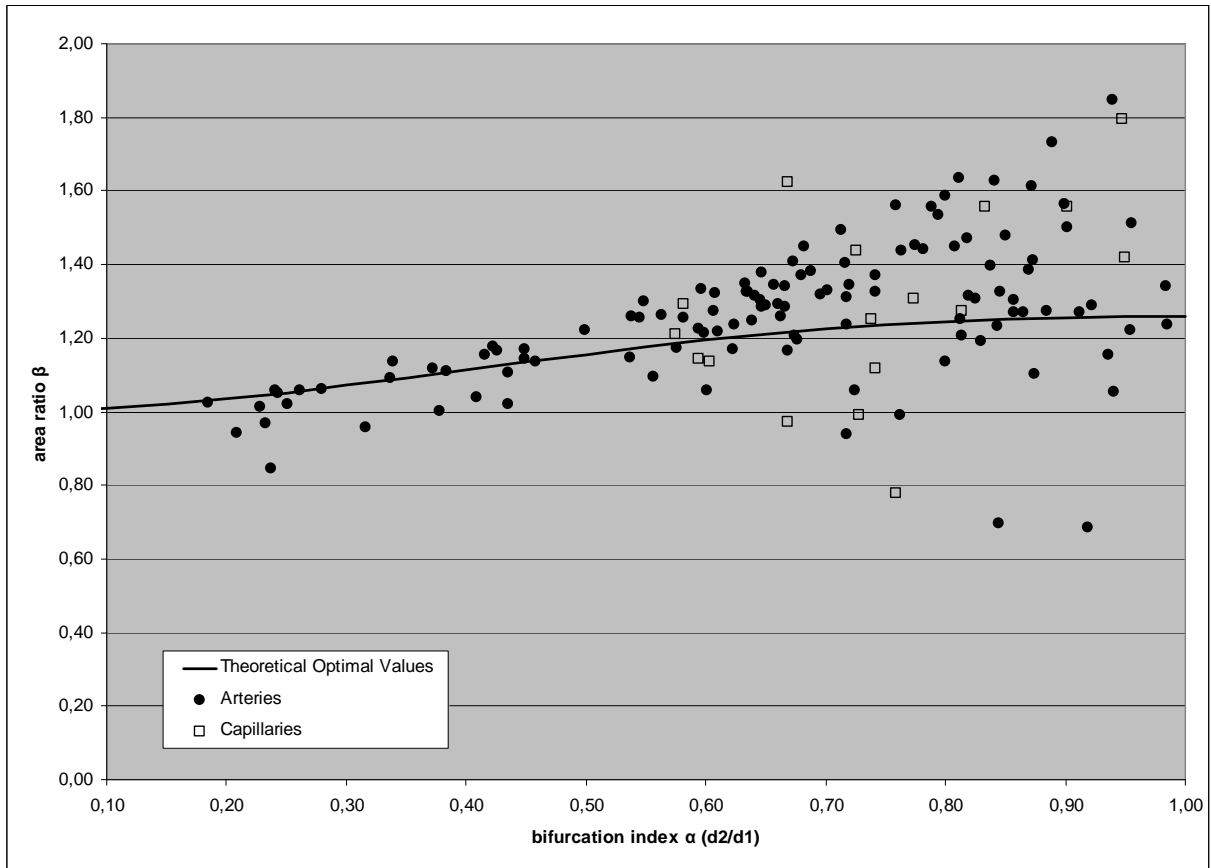


Figure 6: Area ratios  $\beta$  plotted against bifurcation indexes  $\alpha$  of arterial and capillary bifurcations of the submandibular glands of adult Wistar rats. The full line represents the theoretical optimal value for the area ratio derived from equation (6). Independent  $t$  test ( $p = 0.066$ ) shows no significant difference between arteries and capillaries.

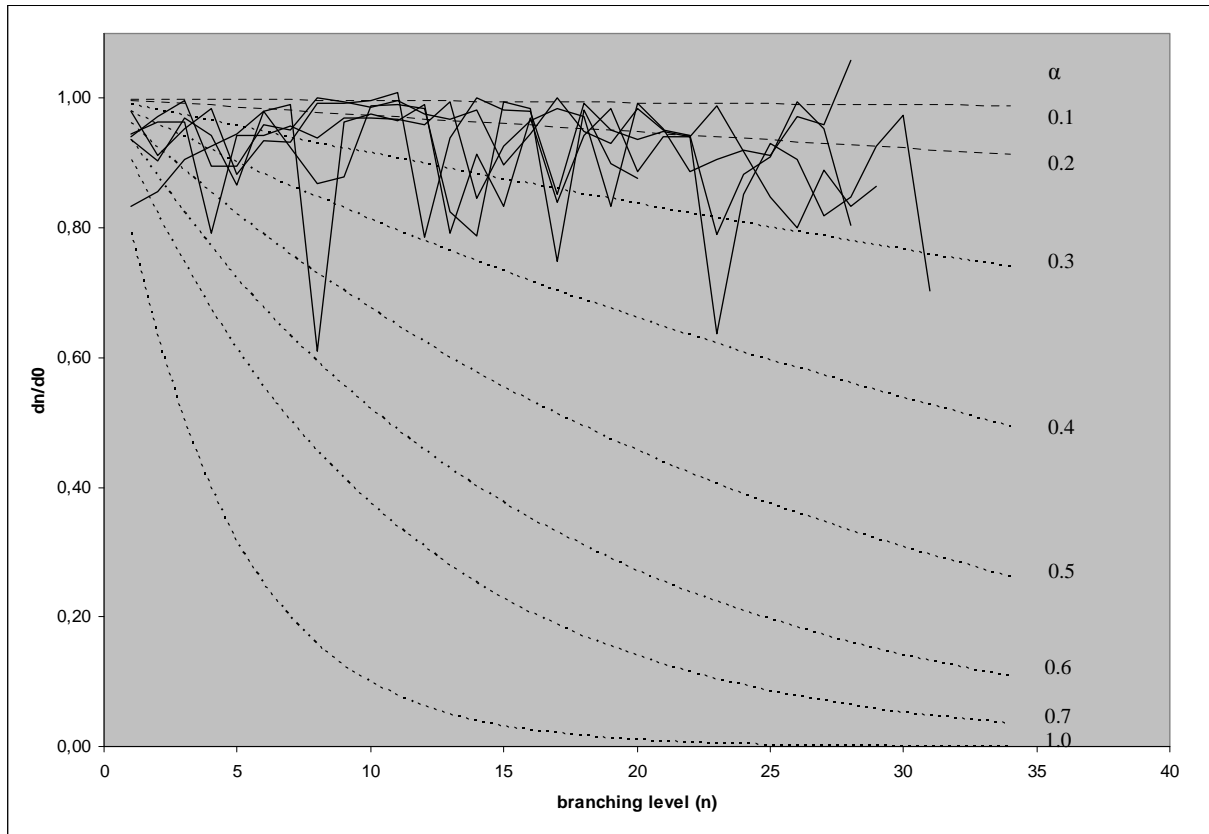


Figure 7: Diameter gradients of consecutive arterial bifurcation of the submandibular glands of adult Wistar rats plotted against bifurcation level, over theoretical optimal values (dashed lines) derived from equation (13). Each curve represents the course of an individual artery for a particular value of the bifurcation index  $\alpha$  and  $\lambda$ . Higher curves represent arteries whose diameters decrease slowly and whose branching indexes are low, characteristic for a distributive function. The lower curves indicate arteries with a delivering function.  $d_n$  denotes the diameter of a daughter vessel at the  $n$ -branching level.

# ***DISCUSSÃO***

---

## 6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de uma ferramenta alternativa aos sistemas tridimensionais (3D) ideais foi conseqüência da necessidade de comparar quantitativamente duas ou mais regiões em modelos de corrosão vascular e da dificuldade de acesso a esses sistemas. Dentre as duas ferramentas bidimensionais (2D) testadas (laço magnético e *threshold*), ambas forneceram uma área vascular maior do que o padrão-ouro (6% e 22% de incremento, respectivamente), porém o valor em que o laço magnético superestima a área coincide com a contração de polimerização da resina utilizada mais freqüentemente (Mercox, Ladd Research, Burlington, EUA), justificando seu uso em relação ao *threshold*. É consenso que a análise bidimensional claramente subestima medidas de comprimento dos vasos (MINNICH, LAMETSCHWANDTNER, 2000). Porém, quando a ferramenta bidimensional proposta (laço magnético) é utilizada para comparar áreas com características semelhantes, esse problema é minimizado, pois o viés será o mesmo para todas as áreas analisadas. Cabe ressaltar que este método foi testado e é indicado para redes vasculares planas, nas quais os vasos tendem a uma disposição horizontal em relação ao plano de aquisição da imagem.

Quanto à qualidade das imagens utilizadas para morfometria, os parâmetros elétricos do MEV devem estar plenamente ajustados, bem como a qualidade da montagem dos espécimes. A não observância destes fatores pode levar a formação de artefatos ou ao carregamento por elétrons dessas peças no momento da aquisição das imagens, gerando contornos mais claros que o normal. Esse fato coloca em risco confiabilidade de sistemas morfométricos 2D baseados em níveis de cinza. Esses artefatos podem ser contornados com a utilização da técnica de pontes condutivas (LAMETSCHWANDTNER, MIODONSKI, SIMONSBERGER, 1980), conforme utilizado no Artigo III, as quais permitem a fuga destes elétrons sem que os mesmos se concentrem no espécime (Figura 2).

Os dois tipos de sistemas de morfometria (2D e 3D) fornecem a possibilidade de se comparar tecidos sadios com doentes e, mesmo que com recursos diferenciados, ambos fornecem algum grau de informação. Desde que o sistema 2D seja corretamente indicado, ele pode prover comparações relativas à densidade vascular, também sendo possível sua

---

As referências bibliográficas relativas a este capítulo, bem como ao capítulo de Introdução, encontram-se ao final desta tese, no capítulo REFERÊNCIAS.

utilização em sistemas venosos, considerando que os princípios teóricos ideais foram desenvolvidos para uso apenas em sistemas arteriais e capilares. Novamente, o uso dos sistemas 2D fica limitado a redes vasculares planas, já que com a razoável profundidade de foco dos microscópios eletrônicos de varredura muitos planos são abrangidos em uma mesma imagem.

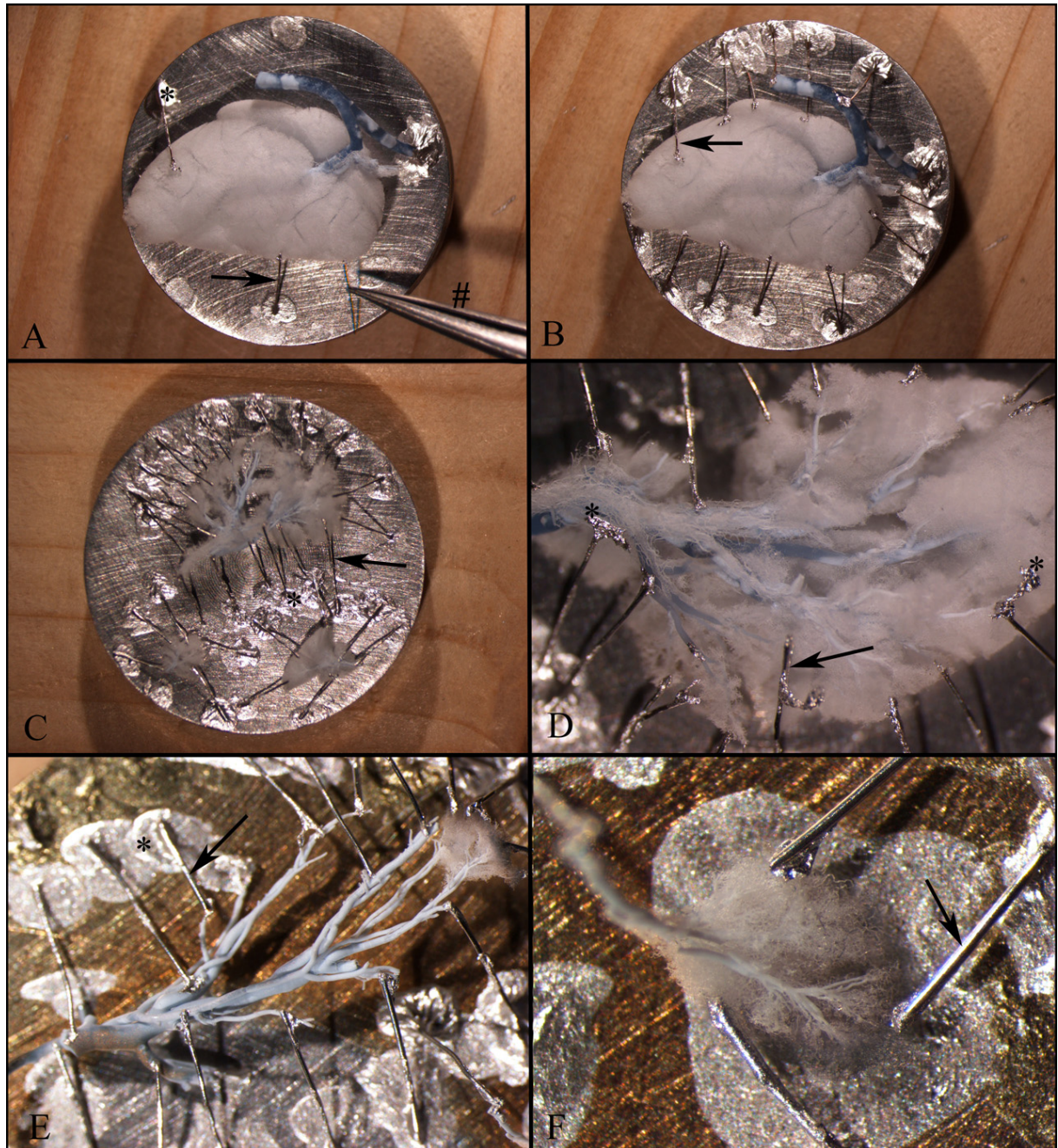


Figura 2: Processo de montagem de modelos de corrosão vascular pela técnica das pontes condutivas. Prata coloidal (\*), fios metálicos – pontes condutivas (setas) e # – pinça de trabalho. Dissecção de glândula submandibular de rato Wistar, A – início do processo de

montagem, B – pronta para metalização para avaliação externa do espécime, C, D – montagem após dissecação parcial, E – dissecação total de artérias e arteríolas e F – capilares.

Os sistemas de morfometria 3D, além de permitir a realização de mensurações dimensionais acuradas (MINNICH *et al.*, 1999) em imagens de modelos de corrosão vascular por MEV, permitem a realização de imagens anaglíficas, nas quais o pesquisador pode ter uma visão tridimensional mais acurada do sistema vascular analisado (Figura 3). Essa ferramenta facilita e fornece maior confiabilidade a estudos micro-anatômicos qualitativos desses sistemas vasculares.

Como os sistemas de morfometria 2D não permitem uma análise de sistemas circulatórios com relação aos princípios teóricos ótimos (baseados na economia de energia considerando o menor volume/bombeamento e superfície/atrito) e que as ferramentas para morfometria 3D tornaram-se disponíveis recentemente, poucas são os tecidos ou órgãos que foram analisados a esse respeito. É possível encontrar informações sobre a vascularização cerebral da enguia-de-casulo (CECON, MINNICH, LAMETSCHWANDTNER, 2002) do Oceano Atlântico (*Myxine glutinosa*) e do Oceano Pacífico (*Eptatretus stouti*), vascularização coronária (GÖSSL *et al.*, 2003b) e da *vasa vasorum* coronariana (GÖSSL *et al.*, 2003a) de porcos, da *vasa vasorum* da veia safena humana (LAMETSCHWANDTNER *et al.*, 2004; KACHLIK *et al.*, 2007) e da vascularização do cerebelo e do rombencéfalo de peixes sterlets (*Acipenser ruthenus*) (STÖTTINGER *et al.*, 2006). Nenhum estudo com glândulas salivares utilizando essa abordagem foi encontrado na literatura científica internacional, entretanto estudos qualitativos bastante completos sobre micro-anatomia de glândulas salivares de ratos por meio da técnica de corrosão vascular associada à microscopia eletrônica de varredura foram publicados já no início da década de 80 (OHTANI *et al.*, 1983a; OHTANI *et al.*, 1983b). Assim, o presente estudo é o primeiro que aborda a hemodinâmica e a anatomia funcional de glândulas salivares submandibulares, proporcionando uma fonte de dados para futuros estudos nesta área, comparando outras glândulas salivares ou glândulas alteradas (morfo/fisiologicamente).



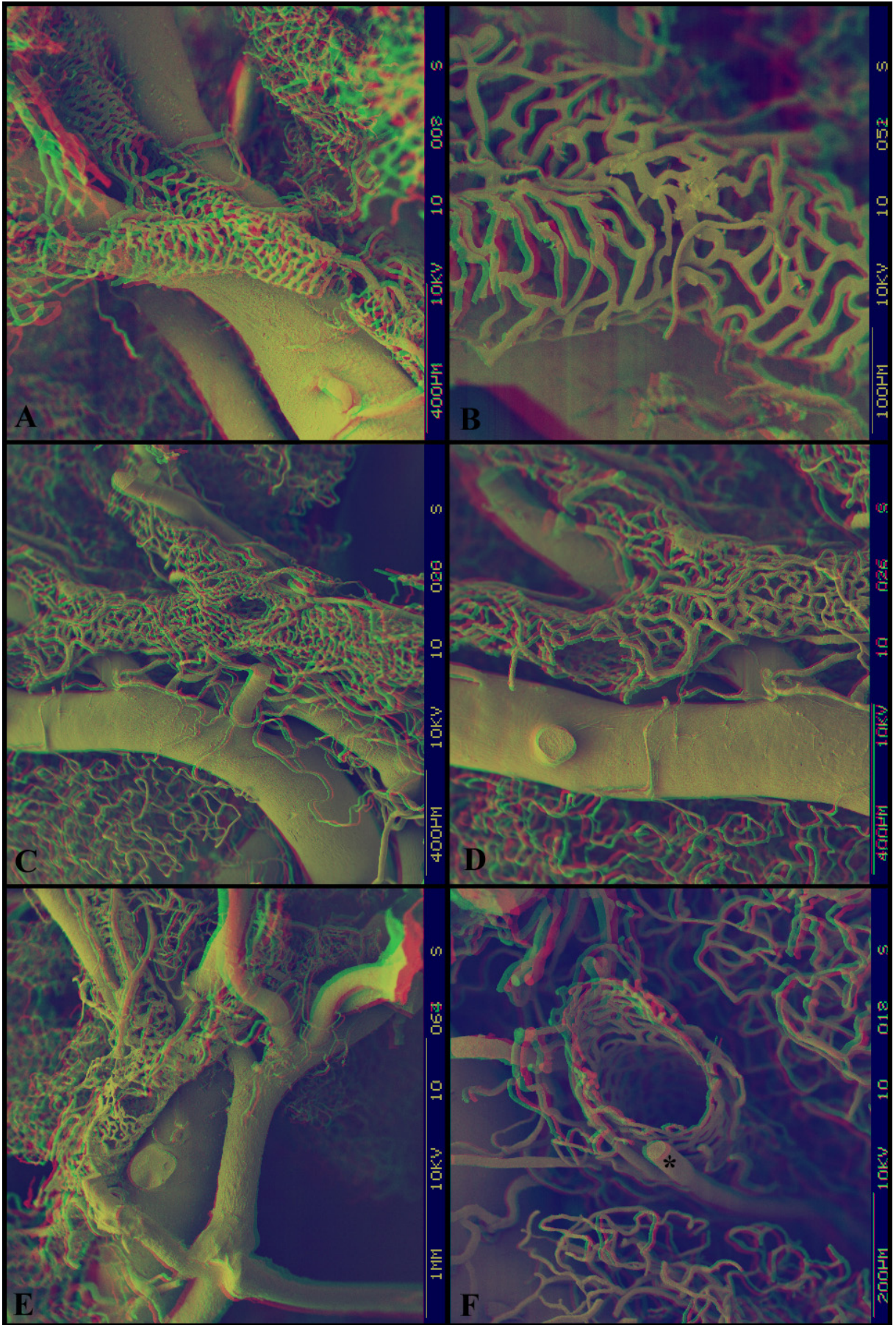


Figura 3: Imagens 3D (anaglíficas) de modelos de corrosão vascular de glândulas salivares submandibulares normais de ratos Wistar adultos, geradas pelo programa 3D-Morphometry. A – notar rede vascular correspondente ao ducto salivar. Observar estreita relação do ducto com a veia subjacente. B – maior aumento da região da bifurcação do ducto salivar. C, D e E – vascularização adjacente ao ducto salivar. Notar relação entre ducto e vasos adjacentes. F – Corte transversal do modelo por inclusão em água, congelamento, corte em criótomo e liofilização. Observar imagem de corte transversal do ducto salivar e artéria (\*) que o acompanha durante o percurso. Imagem melhor visualizada com o uso de óculos 3D verde/vermelho.

É importante ressaltar que no estudo sobre glândulas salivares foram utilizados parâmetros não dimensionais, como o índice de bifurcação e o razão de área. O uso de tais parâmetros têm como consequência uma minimização de erros na técnica. Os erros dimensionais que poderiam ocorrer (marcação de pontos, contração de polimerização da resina, perspectivas na obtenção das imagens anaglíficas), na operação matemática que gera a razão, serão divididos proporcionalmente gerando um fator de multiplicação próximo do valor 1 (um), consequentemente minimizando o erro.

Com relação à razão de área  $\beta$  (Tabelas 2-3 e Figura 6 do Artigo III), dados vindos de baixos índices de bifurcação  $\alpha$  mostram um notável grau de aderência à linha teórica ideal. Além disso, não há diferença significativa entre nenhum dos grupos comparados, permitindo concluir que não há variação significativa nos diâmetros entre os grupos.

A maioria dos estudos que abordaram os princípios teóricos ótimos relatam, assim como neste estudo (Figuras 2 e 3 do Artigo III), uma grande dispersão dos dados de soma dos ângulos de uma bifurcação (ZAMIR, MEDEIROS, CUNNINGHAM, 1979; ZAMIR, BIGELOW, 1984; CECON, MINNICH, LAMETSCHWANDTNER, 2002; LAMETSCHWANDTNER *et al.*, 2004; STÖTTINGER *et al.*, 2006; KACHLIK *et al.*, 2007). O que é possível concluir é que o sistema vascular das glândulas submandibulares de ratos não é regido por nenhum dos princípios teóricos ideais (mínimo volume luminal, força de bombeamento, superfície luminal e força de atrito), entretanto o custo de energia perdido relatado para sistemas que demonstram um desvio desses princípios ótimos é muito pequeno (ZAMIR, BIGELOW, 1984), fazendo com que esse desvio não seja considerado importante.

Um próximo passo para a pesquisa dos princípios hemodinâmicos ideais seria a comparação entre glândulas salivares normais e com alterações teciduais, as quais teriam necessidades de suprimento diversa de glândulas normais. Entretanto, não se tem conhecimento de que tipo de alteração ocorreria frente a este estímulo patológico, já que mesmo em glândulas normais observamos que o sistema vascular não é regido por nenhum dos quatro princípios ideais (mínimo volume luminal, força de bombeamento, superfície luminal e força de atrito). Ainda assim, é provável que hajam modificações neste sistema devido ao fato relatado (DJONOV, KURZ, BURRI, 2002), de que um incremento no fluxo sanguíneo induz remodelamento nas ramificações por meio de intussuscepção em menos de uma hora.

O fato de apenas duas das glândulas salivares estudadas demonstrarem diferenças significativas (os dois extremos) e apenas quanto à soma dos ângulos de bifurcação e mais nenhum outro parâmetro, mostra que estes dados podem ser utilizados de forma confiável para comparação com outros estudos relativos a glândulas salivares, de outras regiões anatômicas ou com alterações teciduais. Porém, novos estudos que investiguem as possíveis modificações hemodinâmicas em sistemas vasculares que estejam suprindo tecidos com alterações patológicas são necessários, já que poucas informações dessa natureza estão disponíveis.

Neste estudo, os princípios teóricos ideais não foram testados em veias por que essas leis foram inicialmente desenvolvidas para artérias (MURRAY, 1926a; 1926b; ZAMIR, 1988a; ZAMIR, PHIPPS, 1988). Entretanto, é possível encontrar na literatura científica internacional alguns estudos abordando tais vasos e é provável que aquelas leis também possam reger a circulação venosa (STÖTTINGER *et al.*, 2006).

Assim, vários métodos e sistemas de quantificação vascular estão disponíveis. Ferramentas para avaliações 2D, com limitações metodológicas, porém mais simples de serem utilizadas e com boa disponibilidade. Ferramentas para avaliações 3D, embora mais caras, fornecem uma ampla gama de informações sobre a hemodinâmica dos sistemas circulatórios, quando associadas às equações matemáticas disponíveis na literatura científica internacional para essa finalidade. Levando-se em consideração a tecnologia disponibilizada recentemente (sistemas de morfometria 3D) para este tipo de pesquisa e a quantidade de tecidos e órgãos até hoje estudados, é possível concluir que, com isso, existe a viabilidade para inúmeros estudos no campo da hemodinâmica de sistemas vasculares. Está disponível uma ferramenta que propicia o entendimento do início e do desenvolvimento da angioarquitetura em doenças nas

quais o suprimento sangüíneo é fundamental, como em tecidos tumorais e inflamatórios. Justamente por possuir uma abordagem bastante diversa, os dados advindos deste tipo de pesquisa podem ser associados aos de estudos de fatores de crescimento, o que permitiria uma soma de informações certamente benéfica no sentido de elucidar mecanismos até então desconhecidos.

## ***CONCLUSÕES***

---

## 7 CONCLUSÕES

### 7.1 Geral

Poderosas ferramentas de avaliação e comparação de sistemas vasculares estão hoje disponíveis, mesmo que ainda pouco utilizadas. Informações destes sistemas podem ser úteis para uma melhor compreensão do desenvolvimento de doenças nas quais se encontra um importante componente vascular nutricional, como por exemplo no caso de tumores.

### 7.2 Específicas

#### 7.2.1 Artigo I

Uma grande quantidade de conhecimento no campo da hemodinâmica dos sistemas circulatórios está disponível na literatura científica. Poderosos sistemas de morfometria são utilizados hoje na obtenção de informações sobre estes sistemas, desde seu desenvolvimento, comparações entre diferentes tecidos, órgãos ou espécies e ainda entre tecidos saudáveis e doentes, por meio dos quais se poderá buscar um melhor entendimento relativo ao desenvolvimento da angioarquitetura e suprimento nutricional de tumores e outras doenças.

#### 7.2.2 Artigo II

Ambas as ferramentas de morfometria 2D testadas são reprodutíveis, porém superestimam a percentagem de área vascular (laço magnético em torno de 6% e *threshold* em

torno de 22%). Considerando a contração de polimerização da resina utilizada (~6%), o resultado da ferramenta laço magnético pode ser tolerado.

### *7.2.3 Artigo III*

Aparentemente, o sistema vascular de glândulas submandibulares não cumpre os critérios teóricos necessários para ser classificado como ideal. Em contrapartida, os princípios teóricos ideais podem admitir uma grande oscilação de ângulos de bifurcação com uma perda de energia muito pequena para o organismo, assumindo valores ideais não tão rígidos.

## *REFERÊNCIAS*

---



## REFERÊNCIAS

- BATSON, O.V. Corrosion specimens prepared with a new material. **Anat Rec**, v. 121, p. 425. 1955.
- CECON, S.; MINNICH, B.; LAMETSCHWANDTNER, A. Vascularization of the brains of the Atlantic and Pacific hagfishes, *Myxine glutinosa* and *Eptatretus stouti*: a scanning electron microscope study of vascular corrosion casts. **J Morphol**, v. 253, n. 1, p. 51-63, Jul. 2002.
- DJONOV, V.G.; KURZ, H.; BURRI, P.H. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. **Dev Dyn**, v. 224, n. 4, p. 391-402, Aug. 2002.
- GEGLER, A. *et al.* Estimation of vascular areas in scanning electron micrographs of microvascular corrosion casts by 2D-morphometry: a comparison of the magnetic lasso tool (Adobe Photoshop® 7.0) and the threshold tool (UTHSCSA ImageTool® 3.0): 15 p. *Em revisão*.
- GÖSSL, M. *et al.* Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 272, n. 2, p. 526-537, Jun. 2003a.
- GÖSSL, M. *et al.* Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, n. 5, p. H2019-2026, Nov. 2003b.
- KACHLIK, D. *et al.* Architectonic arrangement of the vasa vasorum of the human great saphenous vein. **J Vasc Res**, v. 44, n. 2, p. 157-166. 2007.
- KOMATSU, F.; TSUBUSAKI, K.; MIYOSHI, M. Measurement of geometrical dimensions using scanning electron microscopy. **J Electron Microsc (Tokyo)**, v. 48, n. 4, p. 407-415, January 1, 1999.
- LAMETSCHWANDTNER, A.; MIODONSKI, A.; SIMONSBERGER, P. On the prevention of specimen charging in scanning electron microscopy of vascular corrosion casts by attaching conductive bridges. **Mikroskopie**, v. 36, n. 9-10, p. 270-273, Nov. 1980.
- LAMETSCHWANDTNER, A. *et al.* Three-dimensional arrangement of the vasa vasorum in explanted segments of the aged human great saphenous vein: scanning electron microscopy and three-dimensional morphometry of vascular corrosion casts. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 281, n. 2, p. 1372-1382, Dec. 2004.
- MALKUSCH, W. *et al.* A simple and accurate method for 3-D measurements in microcorrosion casts illustrated with tumour vascularization. **Anal Cell Pathol**, v. 9, n. 1, p. 69-81, Jul. 1995.

MANELLI, A. *et al.* 3D analysis of SEM images of corrosion casting using adaptive stereo matching. **Microsc Res Tech**, v. 70, n. 4, p. 350-354, Apr. 2007.

MINNICH, B.; LAMETSCHWANDTNER, A. Lengths measurements in microvascular corrosion castings: two-dimensional versus three-dimensional morphometry. **Scanning**, v. 22, n. 3, p. 173-177, May-Jun. 2000.

MINNICH, B.; KRAUTGARTNER, W.; LAMETSCHWANDTNER, A. Quantitative 3D-Analyses in SEM: A Review. **Microscopy and Microanalysis**, v. 9, n. Supplement S03, p. 118-119. 2003.

MINNICH, B. *et al.* Three-dimensional morphometry in scanning electron microscopy: a technique for accurate dimensional and angular measurements of microstructures using stereopaired digitized images and digital image analysis. **J Microsc**, v. 195, n. Pt 1, p. 23-33, Jul. 1999.

MÖNNIG, B. *et al.* Computer-aided three-dimensional reconstruction of terminal blood spaces in the proximal tibia metaphysis of the growing rat. **VIII Intern Symp Morphol Sciences**. Rome, 1988. 274 p.

MURAKAMI, T. Application of the scanning electron microscope to the study of the fine distribution of the blood vessels. **Arch Histol Jpn**, v. 32, n. 5, p. 445-454, Feb. 1971.

MURRAY, C.D. The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 12, n. 3, p. 207-214, Mar. 1926a.

MURRAY, C.D. The Physiological Principle of Minimum Work: II. Oxygen Exchange in Capillaries. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 12, n. 5, p. 299-304, May. 1926b.

NELSON, A.C. Study of rat lung alveoli using corrosion casting and freeze fracture methods coupled with digital image analysis. **Scanning Microsc**, v. 1, n. 2, p. 817-822, Jun. 1987.

OHTANI, O. *et al.* Microvasculature as studied by the microvascular corrosion casting/scanning electron microscope method. I. Endocrine and digestive system. **Arch Histol Jpn**, v. 46, n. 1, p. 1-42, Feb. 1983a.

OHTANI, O. *et al.* The microvasculature of rat salivary glands. A scanning electron microscopic study. **Acta Anat (Basel)**, v. 115, n. 4, p. 345-356, Apr. 1983b.

POISEUILLE, L. Poiseuille's law 1840. Disponível em:  
<[http://en.wikipedia.org/wiki/Poiseuille's\\_law](http://en.wikipedia.org/wiki/Poiseuille's_law)>. Acesso em: 12 Sep. 2007.

SCHRAUFNAGEL, D.E. Microvascular corrosion casting of the lung. A state-of-the-art review. **Scanning Microsc**, v. 1, n. 4, p. 1733-1747, Dec. 1987.

STOTTINGER, B. *et al.* Design of cerebellar and nontegmental rhombencephalic microvascular bed in the sterlet, *Acipenser ruthenus*: a scanning electron microscope and 3D morphometry study of vascular corrosion casts. **Microsc Microanal**, v. 12, n. 5, p. 376-389, Oct. 2006.

TANIGUCHI, Y.; OHTA, Y.; TAJIRI, S. New improved method for injection of acrylic resin. **Okajimas Folia Anat Jpn**, v. 24, n. 4, p. 259-267, Oct. 1952.

TANIGUCHI, Y. *et al.* Supplement to new improved method for injection of acrylic resin. **Okajimas Folia Anat Jpn**, v. 27, n. 6, p. 401-406, Dec. 1955.

WEIBEL, E.R. Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. **Bull Eur Physiopathol Respir**, v. 15, n. 5, p. 999-1013, Sep-Oct. 1979.

ZAMIR, M. The role of shear forces in arterial branching. **J Gen Physiol**, v. 67, n. 2, p. 213-222, Feb. 1976.

ZAMIR, M. Nonsymmetrical bifurcations in arterial branching. **J Gen Physiol**, v. 72, n. 6, p. 837-845, Dec. 1978.

ZAMIR, M.; MEDEIROS, J.A.; CUNNINGHAM, T.K. Arterial bifurcations in the human retina. **J Gen Physiol**, v. 74, n. 4, p. 537-548, Oct. 1979.

ZAMIR, M.; BIGELOW, D.C. Cost of departure from optimality in arterial branching. **J Theor Biol**, v. 109, n. 3, p. 401-409, Aug 7. 1984.

ZAMIR, M. Distributing and delivering vessels of the human heart. **J Gen Physiol**, v. 91, n. 5, p. 725-735, May. 1988a.

ZAMIR, M. The branching structure of arterial trees. **Comments Theor Biol**, v. 1, n. 1, p. 15-37. 1988b.

ZAMIR, M.; PHIPPS, S. Network analysis of an arterial tree. **J Biomech**, v. 21, n. 1, p. 25-34. 1988.

***ANEXOS***

---

## ANEXOS

### Anexo A

Documento relativo à concessão da bolsa de estudos do Programa de Doutorado no País com  
Estágio no Exterior – CAPES

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
Ministério da Educação - Anexos I e II - 2º Andar  
Caixa Postal 365  
70359-970 - Brasília, DF  
Brasil**

**Ilmo(a). Sr(a).**  
**Aderson Geglér**  
R. Dario Pederneiras, 41/703  
Petrópolis  
Porto Alegre - RS

BRASIL

Brasília, 18 de julho de 2006.  
Processo: BEX 1335/06-5

Prezado(a) Senhor(a),

A CAPES aprovou a sua solicitação de bolsa para estudos no exterior, nos seguintes termos:

. Até 6 parcela(s) de EUR 1100,00 no período de setembro de 2006 a fevereiro de 2007 (observar item 4.4 das Orientações para Bolsistas anexas).

. Auxílio instalação de EUR 600,00, cujo equivalente em reais será pago no Brasil (observar item 4.2 das Orientações para Bolsistas anexas).

. Seguro saúde no valor de EUR 420,00 anuais, cujo equivalente em reais será pago no Brasil ou no exterior junto com a primeira mensalidade (observar item 4.3 das Orientações para Bolsistas anexas).

. Passagens aéreas, trecho : PORTO ALEGRE(BR)/SALZBURG(AT)/PORTO ALEGRE(BR)

Os benefícios concedidos estão vinculados ao tempo da efetiva permanência no exterior, dentro do período acima estabelecido.

Os valores pagos no Brasil serão convertidos em reais, no dia do pagamento, com base na taxa de câmbio adotada pela Capes.

## Anexo B

### Documento relativo à concessão da bolsa de estudos do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – CAPES

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**  
**Ministério da Educação - Anexos I e II - 2º Andar**  
**Caixa Postal 365**  
**70359-970 - Brasília, DF**  
**Brasil**

**Ilmo(a). Sr(a). Prof(a).**  
Dr. Jorge Luiz Nicolas Audy  
PRÓ-REITOR  
UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA  
AV. IPIRANGA, 6.681 - PARTENON  
Caixa Postal 1.429 - PORTO ALEGRE  
90619-900 - RS

Brasília, 18 de julho de 2006.  
N.Ref: CBE/PDEE 0007/2006  
Processo: BEX1335/06-5

Senhor(a) Professor(a),


Informamos que a CAPES atendeu sua solicitação de concessão de bolsa de estudos, no âmbito do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior, a(o) pós-graduando(a) **Aderson Gegler**.

Encaminhamos, em anexo, os documentos abaixo relacionados:

- um exemplar do roteiro para elaboração dos relatórios;
- uma ficha para informações necessárias à emissão de passagens;
- instruções ao bolsista, pedimos que sejam lidas atentamente;
- duas vias do Termo de Compromisso **devendo uma delas ser assinada e devolvida à CAPES;**
- carta de concessão individual.
- ficha com informações para pagamentos no Brasil.

Esta aprovação somente terá efeito de concessão definitiva após a publicação em Diário Oficial, da autorização de afastamento, quando for o caso.

Atenciosamente,

  
Maria Luíza de Santana Lombas  
Coordenadora Geral de Programas com o Exterior

## Anexo C

### Documento relativo à concessão da bolsa de estudos do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior – CAPES

**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
Ministério da Educação - Anexos I e II - 2º Andar  
Caixa Postal 365  
70359-970 - Brasília, DF  
Brasil**

July 18, 2006.

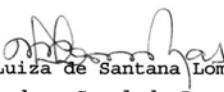
#### To Whom It May Concern

We hereby certify that **Mr. (s) Aderson Gegler** has been awarded a scholarship from the **CAPES Foundation**, a federal agency under the Ministry of Education of Brazil, to develop part of his PhD research as a Special Student at **UNIVERSITÄT SALZBURG**

The scholarship includes:

- a) stipend for the grantee's maintenance: EUR1100,00 per month
- b) settling-in allowance a one time: EUR600,00
- c) health insurance, paid directly to the grantee: EUR420,00/year
- d) international air ticket:  
PORTO ALEGRE (BR) / SALZBURG (AT) / PORTO ALEGRE (BR)

The scholarship is valid from September/2006 to February/2007.

  
Maria Luiza de Santana Lombas  
Coordenadora Geral de Programas com o Exterior

## Anexo D

Carta referente ao aceite do aluno do Programa de Doutoramento por parte do Co-orientador e  
 Chefe do Departamento de Biologia dos Organismos – Faculdade de Ciências Naturais –  
 Universidade de Salzburg, na Áustria

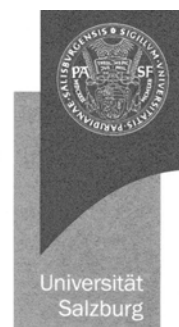
**UNIVERSITY OF SALZBURG**

**Department of  
 Organismic Biology**

**Chair:**  
 Mag. Dr. Alois Lametschwandner  
 Professor of Zoology

Hellbrunnerstrasse 34  
 A-5020 Salzburg

**Sekretaries**  
 Julia Wiesner, Karoline Fuchs  
 Tel. +43 (0)662 8044-5600, - 5500  
 Fax +43 (0)662 8044-5698  
 Alois.Lametschwandner@sbg.ac.at



Prof.  
 Dr. Maria Antonieta Lopes De Souza

Salzburg, 21.4. 2006

**Concerns:** Research stay of Mr. Aderson GEGLER at the Department of Organismic Biology, Vascular and Muscle Research Unit - Confirmation

**Dear Maria !**

This is to confirm that I am glad to accept Mr. Aderson GEGLER in my laboratory and that the working language will be English. As all the other students in the laboratory are familiar with English there will be no problem in communication and understanding. Moreover, the literature in the field is primarily in English.

With best regards

*A. Lametschwandner*

Alois Lametschwandner, Ph.D.  
 (Professor of Zoology and  
 Head of the Department)





## Anexo E

Aceite do Artigo I desta tese para publicação na Revista Medicina – Ribeirão Preto

Page 1 of 1

### Aderson Gegler

---

**From:** "Revista Medicina" <revmed@hcrp.fmrp.usp.br>  
**To:** "Aderson Gegler" <adersongegler@hotmail.com>  
**Sent:** segunda-feira, 12 de novembro de 2007 14:37  
**Subject:** artigo revista Medicina

Prezado Dr. Aderson,

Informo-lhe que o artigo de sua autoria:

**Métodos de análise quantitativa aplicados a modelos de corrosão vascular:  
revisão de literatura.**

Methods of quantitative analysis applied to vascular corrosion casts: a literature review.

Aderson Gegler, Juliana Gazolla, Maria A.L. de Souza

foi considerado apto a ser publicado na revista Medicina pelo sr. Revisor.  
O mesmo será publicado no vol. 41/2008.

Atenciosamente

Marlene

## Anexo F

### Situação atual do Artigo II desta tese junto ao *Journal of Microscopy*

Address 

Journal of  
**Microscopy**

Partially Submitted Manuscripts

Submitted Manuscripts

**For instructions on submitting manuscripts to this journal, please click on the "Instructions and Forms" icon located in the top right corner.**

- To submit a **New Manuscript** for review, click above on 'Submit First Draft of a New Manuscript'.
- To finish a **Partially Submitted** manuscript click on its Title.
- To view or print a Submitted manuscript, click on its Title.
- To delete the entire manuscript, click on the Trash Can.

**Successful submission** will automatically generate an email to you containing the number allocated to your paper. If you do NOT receive this **confirmation email**, your submission will have been executed incorrectly and you should retry. In case of continued difficulty, please contact ScholarOne Support.

- Prepare your manuscript using a word processing program and save it as a .doc, .pdf, .rtf or .ps file. You may also upload .xls or .ppt supplemental files as part of the manuscript submission process. All of these files will be converted to .pdf format. Image files such as .gif, .jpg, .eps, .png, and .tif may be uploaded. These will be converted to small .jpg files.
- The converted .pdf and .jpg files will be the files evaluated during the review process. All original files that you upload, as well as their associated converted files marked as Not for Review at the end of the manuscript submission process, will be available for access by the journal office if necessary.
- You may upload other file types such as LaTeX files, QuickTime movies, or other image types, but Manuscript Central will not convert these. The peer review participants will only be able to view these unconverted files if they have the appropriate software on their computers.

Partially Submitted Manuscripts			
Click on title to resume the submission.			
Manuscript ID	Title	Date Created	[delete]
No Manuscripts Found			

Submitted Manuscripts			
Click on title to view the submission.			
Manuscript ID	Title	Date Submitted	Processing Status & Executive Editor
JMI-2007-0033.R1	<a href="#">Estimation of vascular areas in scanning electron micrographs of microvascular corrosion casts by 2D-morphometry: a comparison of the magnetic lasso tool (Adobe Photoshop® 7.0) and the threshold tool (UTHSCSA ImageTool® 3.0)</a>	17 Aug 2007	Under Review Executive Editor <a href="mailto:journal@rms.org.uk">journal@rms.org.uk</a>
JMI-2007-0033	<a href="#">Estimation of vascular areas in scanning electron micrographs of microvascular corrosion casts by 2D-morphometry: a comparison of the magnetic lasso tool (Adobe Photoshop® 7.0) and the threshold tool (UTHSCSA ImageTool® 3.0)</a>	28 Feb 2007	Decision ( <a href="#">View Letter</a> ) Executive Editor <a href="mailto:journal@rms.org.uk">journal@rms.org.uk</a>

[Return to the Main Menu](#)

**Anexo G**

Aprovação do Projeto de Pesquisa do Artigo II desta tese junto à Comissão Científica e de  
Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

**Porto Alegre 11 de novembro de 2005**

**O Projeto de: Pesquisa**

**Protocolado sob nº:** 0115/05

**Intitulado:** *Métodos de análise quantitativa da vascularização em  
imagens de microscopia eletrônica de varredura*

**do(a) aluno(a):** Aderson Gegler

**Programa de:** *Estomatologia Clínica*

**do curso de:** *Estomatologia Clínica*

**Nível:** *Doutorado*

**Orientado pelo(a):** *Profa. Dra. Karen Cherubini, Profa. Dra. Maria Antonieta  
Lopes de Souza*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia  
da PUCRS em *04 de novembro de 2005*.

**Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**Anexo H**

Aprovação, junto à Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS, do Projeto de Pesquisa do estudo do qual foram aproveitados os órgãos utilizados no Artigo III desta tese



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 13 de março de 2003.

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0082/02

**Intitulado:** *Carcinogênese química em língua de ratos e avaliação da angiogênese tumoral através do método de corrosão.*

**do(a) aluno(a):** *Leo Kraether Neto*

**Programa de:** *Estomatologia Clínica*

**do curso de:**

**Nível:** *Doutorado*

**Orientado pelo(a):** *Profa. Dra. Maria Antonieta L. de Souza*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 14 de dezembro de 2002.

**Liliane Soares Yurgel**

Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

## Anexo I

Documento apresentado para a retirada dos modelos de corrosão vascular do país



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ESTOMATOLOGIA CLÍNICA

---

18 de Setembro de 2006.

A Quem Interessar Possa

Declaro que o aluno do Curso de Doutorado em Estomatologia Clínica da PUCRS, Aderson Gegler, regularmente inscrito e matriculado (04190397-2) no referido curso, recebeu uma bolsa de Estágio de Doutorado no Exterior (Doutorado Sandwich) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Ministério da Educação), sob o número de processo BEX1335/06-5 (conforme documentação em anexo). Para tanto está viajando para a Áustria, país no qual desenvolverá pesquisas científicas, e levando consigo material de pesquisa de pelo menos 5 (cinco) anos, para que seja analisada nos laboratórios da Universidade de Salzburg. Certifico que este material trata-se de espécimes de resina plástica MERCOX® (Williston – Vermont– EUA) sem qualquer quantidade de material orgânico biológico ou DNA. Este material destina-se única e exclusivamente para avaliações em Microscópio Eletrônico.

Dra Maria Antonieta Lopes de Souza  
Professora Orientadora  
e-mail: maria.antonietta@puccrs.br

**Anexo J**

Documento apresentado para a entrada dos modelos de corrosão vascular na União Européia



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM ESTOMATOLOGIA CLÍNICA

---

September 20, 2006.

To Whom It May Concern

I hereby certify that Aderson Gegler, regularly registered (04190397-2) on the *Clinical Stomatology Ph.D. Program of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul*, have received a scholarship grant from CAPES (a Brazilian foundation that Coordinates Higher Education and Graduate Training – Ministry of Education), process number BEX1335/06-5 (enclosure). Thereby he intends to develop a scientific research in Salzburg, Austria, and he is taking with him research material of at least 5 (five) work years, to be analyzed in Salzburg Universität Laboratories. I can certify that this material are casts made off a plastic resin MERCOX® (Williston – Vermont– EUA) with no organic or DNA material and certainly not hazardous. The purpose of this material is only and exclusively microscopic evaluations.

---

Maria Antonieta Lopes de Souza, PhD  
Advisor Professor  
e-mail: maria.antonieta@pucrs.br

## Anexo L

### Documento apresentado para a saída dos modelos de corrosão vascular na União Européia e entrada no Brasil

UNIVERSITY OF SALZBURG

Department of  
Organismic Biology

Chair:  
Univ.-Prof.Mag.  
Dr. Alois Lametschwandner

Hellbrunnerstrasse 34  
A-5020 Salzburg

Sekretariat  
Renate Heindl, Karoline Fuchs  
Tel. +43 (0)662 8044-5600, - 5500  
Fax +43 (0)662 8044-5698  
Alois.Lametschwandner@sbg.ac.at  
[http://www.zoologie.sbg.ac.at/lametschwandner\\_home.htm](http://www.zoologie.sbg.ac.at/lametschwandner_home.htm)

 UNIVERSITÄT  
SALZBURG

To whom it concerns

March 1, 2007

**Concerns:** Mr. Aderson Gegler- Scientific specimens

**Ladies and Gentleman !**

Mr. Aderson Gegler has been for five month a visiting researcher at the "Vessel and Muscle Research Group" of our department performing research for his doctoral thesis. Because he could not analyze all the specimens he prepared during his stay he carries them back to his home university at Porto Aleghre, Brazil for further analysis.

The specimens consist of an aluminium or brass stub onto which tiny resin made casts of blood vessels are mounted. These plastic specimens contain no organic matter at all, are neither infectious nor contagious and cause no hazard to men and animals. As they are very delicate they have to be carried in the hand luggage with the top upright.

Enabling Mr. Aderson Gegler to carry his specimens in his hand luggage is highly appreciated.

Yours Sincerely



Alois Lametschwandner, MS, Ph.D.  
(Professor of Zoology  
and

Director of the Department of Organismic Biology,  
University of Salzburg, Austria)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)