



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

Mecânica Morfofuncional dos pontos de Acupuntura Hegu (IG4) e zusanli (E36)
em cães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

JULIANA MOLINA MARTINS

PATOS-PB

2017



**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB**

**Mecânica Morfofuncional dos pontos de Acupuntura Hegu (IG4) e zusanli (E36)
em cães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

JULIANA MOLINA MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes

Co-orientadora: Dr. Ana Carolina Lyra de Albuquerque

PATOS-PB

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

M379m Martins, Juliana Molina
Mecânica morfofuncional dos pontos de Acupuntura Hegu (IG4) e zusanli (E36) em cães / Juliana Molina Martins. – Patos, 2017.
58f. : il., color.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes."

Referências.

1. Acuponto Hegu. 2. Ponto zusanli. 3. Acupuntura. 4. Biópsia. 5. Laserpuntura. I. Título.

591.4:599.742.2

CDU

JULIANA MOLINA MARTINS

**Mecânica Morfofuncional dos pontos de Acupuntura Hegu (IG4) e zusanli (E36)
em cães**

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes
Departamento de Morfologia Animal-UFRN
(Orientador)

Prof. Dr. Ana Carolina Lyra de Albuquerque
Departamento de Odontologia- UFCG
(Examinador I)

Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto
Departamento de Morfofisiologia Animal-USP
(Examinador II)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força, coragem, perseverança e fé para acreditar na realização deste trabalho de pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Osvaldo dos Santos e Izildinha Molina, por me apoiarem na realização dos meus desejos e depositar em mim toda confiança e carinho, aos meus irmãos, Rodrigo e Marco Aurélio Molina Martins, que me ajudaram na realização deste objetivo com seus incentivos de que eu conseguiria concluir este trabalho com sucesso.

Com alegria e gratidão deixo aqui consignados sinceros agradecimentos a todos os amigos e colegas colaboradores que vivenciaram e apoiaram na realização do experimento, em especial aos amigos Amana, Alick, Ruthiana, Rômulo Dias e João (graduandos da UFCG), Ediane e Artur Carreiro (mestrandos da área de Anatomia e Morfologia Animal da UFCG) a vocês muito obrigada pelo carinho e disposição.

À instituição UFCG e aos funcionários, em especial Joana Diniz (técnica do laboratório de histoquímica) que confeccionou as lâminas histológicas, Rômulo Soares (técnico e professor da anatomia e morfologia) que auxiliou no trabalho com a leitura das lâminas histológicas. Fico feliz em agradecer essas pessoas que sempre ajudaram quando precisei.

Aos professores, em especial meu orientador Danilo José Ayres de Menezes, que disponibilizou varias horas do seu tempo esclarecendo dúvidas que surgiam ao longo do experimento com os cães. A co-orientadora Ana Carolina Lyra de Albuquerque que disponibilizou o equipamento (Laser Duo) para o experimento, agradeço ao professor Otávio Brillhante que orientou na leitura histológica das lâminas de pele e ao professor Fernando Ladd da UFRN que esclareceu dúvidas da técnica utilizada para quantificação de estruturas histológicas da pele.

RESUMO

A acupuntura é uma forma de reflexoterapia na qual acredita-se que os acupontos tem estruturas histológicas capazes de captar os estímulos e enviá-los a pontos estratégicos, desempenhando funções específicas no corpo. O Capítulo I objetivou avaliar as estruturas do tecido da pele na tentativa de determinar diferenças estruturais que indiquem o mecanismo de captação do estímulo de acupuntura no ponto IG4. Foram coletadas biópsias de pele de 10 cães adultos hígdos, na área do acuponto Hegu (IG4) e fora do acuponto (controle), onde foram aplicados métodos estereológicos para avaliar a superfícies de vasos no acuponto, estimada em $1,06 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ e fora do ponto de $1,05 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$, respectivamente e a densidade de volume de fibras colágenas foi de 52,5% e 54,7% , estes resultados não diferiram significativamente ($p>0,05$). O objetivo do Capítulo II foi analisar o efeito sobre a estrutura histológicas da pele em acupontos estimulados por agulha e por laser. Foram coletas biópsias de pele de 10 cães adultos hígdos do acuponto Hegu (IG4) estimulado com agulha estática, o ponto Zusanli (E36) estimulado com laser de baixa potência e o acuponto IG4 não estimulado (controle). Os materiais foram processados para histologia e avaliados quanto à densidade de superfícies de vasos, estimada em $1,69 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ na acupuntura, $1,37 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ na laserpuntura e no controle de $1,06 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$, assim como respectivamente, a densidade de volume de fibras colágenas foi de 53.6%, 55.3% e 52.5%. Estes parâmetros estereológicos não apresentaram diferenças entre os grupos ($p>0,05$). Foi observada presença de proliferação celular do sistema imune da derme superficial estimulada por acupuntura, não observado no ponto estimulado com laser e no controle, porém indicando que a ação da acupuntura não é suficiente para desencadear um processo inflamatório expressivo ou mesmo de cicatrização tecidual, sendo métodos seguros para o cão.

Palavras chave: Acuponto Hegu, ponto zusanli, acupuntura, biópsia, laserpuntura, cão

ABSTRACT

Acupuncture is a form of reflection in the qualification of histological stimulation systems of stimulus capture and management of strategic points, performing specific functions in the body. Chapter I aimed to evaluate how structures of the skin tissue in an attempt to determine structural structures that induce the mechanism of acupuncture stimulation at IG4. Skin biopsies were collected from 10 healthy adult dogs in the Hegu acupoint area IG4 and outside the acupuncture area, where stereological methods were used to evaluate a non-acupunctured vessel surfaces, estimated at $1.06 \text{ mm}^2 / \text{mm}^3$ and one point $1.05 \text{ mm}^2 / \text{mm}^3$, respectively, a volume density of collagen fibers of 52.5% and 54.7%, for the non-differentiated results ($p > 0.05$). The purpose of Chapter II was to analyze the effect on the histological structure of the skin in acupoints stimulated by needle and by laser. (E36) stimulated with low power laser and non stimulated acupoint IG4 (control). The materials were processed for histology and vessel surface density, estimated at $1.69 \text{ mm}^2 / \text{mm}^3$ in acupuncture, $1.37 \text{ mm}^2 / \text{mm}^3$ in laser puncture and no control of $1.06 \text{ mm}^2 / \text{mm}^3$, as well as, respectively, a volume density Collagen fibers were 53.6%, 55.3% and 52.5%. These stereological parameters do not present differences between the groups ($p > 0.05$). It was observed presence of cellular proliferation of the superficial dermis immune system stimulated by acupuncture, not observed any point stimulated with laser and no control, but indicating that the action of acupuncture is not enough to trigger an expressive inflammatory process or even of tissue healing, being Safe methods for the dog.

Key words: Acupoint Hegu, zusanli point, acupuncture, biopsy, laserpuncture, dog

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

M.T.D- Membro Torácico Direito
M.T.E- Membro Torácico Esquerdo
M.P.D- Membro Pélvico Direito
M.T.C- Medicina Tradicional Chinesa
Mw- Miliwatts (potência)
S.R.D- Sem Raça Definida
D.P- Desvio Padrão
H.E- Hematoxilina Eosina
LLT- Low Level Therapy
Ga Al As- Arsenieto de Gálio e Alumínio
Ga As- Arsenieto de Gálio
M- Média
mm- milímetros
mm²- milímetros quadrados
mm³- milímetros ao cubo
μm- micrometro
P- Probabilidade Estatística
PMN- Polimorfonucleares
SURS- Seleccionados de Forma Aleatória
TAU- Cortes Transversais Aleatórios Uniformes

LISTA DE TABELAS**CAPÍTULO I**

Tabela 1. Comparação entre os parâmetros estereológicos do volume da biópsia, superfície de vasos sanguíneos e fibras colágenas do acuponto IG4 e da pele fora do ponto de acupuntura (controle) de cães adultos (média/erro padrão).....21

CAPÍTULO II

Tabela 1. Comparação entre os parâmetros estereológicos da pele nos acupontos estimulados e no acuponto controle de cães adultos (média/desvio padrão).....35

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1(a) Fotomicrografia no acuponto IG4 da epiderme (e), pode apresentar áreas mais espessas, mas com predominância delgada e levemente ondulada, Hematoxilina/Eosina. **(b)** Fotomicrografia no acuponto IG4 da derme, uma glândula sudorípara (seta branca) aparece próximo aos folículos pilosos do tecido subcutâneo, glândula sebácea (seta preta), com lóbulo sebáceo revestido por uma única camada de células, Hematoxilina/Eosina.....19

Figura 2(a) Fotomicrografia da derme da pele do acuponto IG4 do cão, mostrando vaso linfático (seta preta), veia (seta branca). **(b)** Fotomicrografia do acuponto IG4 do cão da derme e hipoderme mostrando artéria (seta branca) e tecido adiposo (seta preta), Hematoxilina/Eosina.....20

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1(a) Pele do acuponto IG4 M.T.D do cão estimulado com agulha com discreta hiperparaceratose da queratina (seta preta) no epitélio (e), com proliferação celular focal da derme superficial (circulo branco) adjacente aos folículos pilosos (setas brancas), Hematoxilina/Eosina. **(b)** Pele do acuponto E36 estimulado com aplicação de laser com proliferação celular discreta e difusa na epiderme e na derme superficial adjacente aos folículos pilosos (setas pretas), Hematoxilina/Eosina. **(c)** Pele do Acuponto IG4 do M.T.E não estimulado, camada de queratina no epitélio estratificado simples (e) com células dispersas na derme superficial próximo aos folículos pilosos (setas pretas), hematoxilina/Eosina. **(d)** Fotomicrografia da região do infiltrado inflamatório do ponto IG4 estimulado com agulha, observando plasmócito (seta branca), linfócitos (seta preta), mastócito (círculo preto) e fibroblastos (círculo branco) na derme superficial, Hematoxilina/Eosina.....34

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REFERÊNCIAS.....	12
3. CAPÍTULO I	13
Avaliação Histológica e Estereológica da Pele do Acuponto Hegu (IG4) do Cão....	14
Resumo	14
Introdução	15
Material e Métodos	16
Resultados	19
Discussão	21
Conclusão	22
Referências.....	23
4. CAPÍTULO II	27
Efeito sobre a estrutura da pele em acupontos comparando o uso de laser e de agulha.....	28
Resumo	28
Introdução	29
Material e Métodos	30
Resultados	33
Discussão	35
Conclusão	37
Referências.....	38
5. CONCLUSÃO GERAL	42
6. ANEXOS.....	43

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Medicina Tradicional Chinesa (MTC) é uma ciência com 4 milênios de existência (Paes, 2008). O sistema de circulação da energia pelos meridianos está vinculado ao equilíbrio energético (*Qi*) do *Yin* e *Yang* que é responsável pela manutenção da saúde dos seres vivos (jacques, 2001).

Os acupontos são pontos de acupuntura localizados em canais de energia denominados de meridianos, que apresentam disposição simétrica sobre a lateralidade direita e esquerda do corpo (Mann, 1994). Estes pontos estão presentes na superfície cutânea, onde as agulhas são inseridas (acupuntura), estas regiões são altamente sensíveis a estímulos de origem elétrico, mecânico, térmica ou eletromagnética e são encontrados na epiderme em uma profundidade máxima de 2cm (Valchinov e Pallikarakis, 2005).

De acordo com (Hashimoto, 2005) os acupontos tem propriedades histológicas que não são encontrados ou estão em menor quantidade na pele que rodeiam o ponto de acupuntura, pesquisas histológicas dos pontos de acupuntura e meridianos tem sido um assunto relevante para o entendimento da neurobiologia e dos mecanismos de ação que justificam a eficácia terapêutica da acupuntura, portanto é relevante a pesquisa histológica sobre as estruturas que determinariam os substratos histológicos dos acupontos e meridianos que desencadeiam a ação terapêutica.

Neste sentido, o Capítulo I da dissertação, teve o objetivo de estimar a quantificação dos vasos e fibras colágenas no acuponto Hegu (IG4) e fora do acuponto para avaliar a importância dessas estruturas histológicas nos acupontos. Devido à necessidade de visualizar alterações histológicas cutâneas, o Capítulo II descreve a padronização dos acupontos IG4 estimulados por agulha de acupuntura e o ponto E36 estimulado por laser de baixa potência, assim como, a quantificação dos vasos e fibras colágenas.

2. REFERÊNCIAS

HASHIMOTO, P.H. 2005. The perineurial vessel: a possible candidate for the structural basis of the meridian (Jing-Luo) in Chinese medicine. *Anatomical Science International*. 4: 177-180.

JACQUES, L. 2001. Medicina tradicional chinesa. Idéias e Conceitos in: 8. Seminário Nacional da Ciência e da Tecnologia. Rio de Janeiro.

MANN, F. 1994. Acupuntura: A arte chinesa de Curar. São Paulo: Hemus, 5-12.

PAES, C. M. 2008. The Spleen and Stomach According to the View of Traditional Chinese Medicine. 50f. Monograph, Center for Traditional Medicine and Traditional Chinese Studies, São Paulo.

VALCHINOV, E.S. & PALLIKARAKIS, N.E, 2005. Desing and testing of low intensity laser biostimulator. *BioMedical on Online*, 5: 1-10.

3. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E ESTEREOLÓGICA DA PELE DO ACUPONTO HEGU (IG4) DO CÃO

Manuscrito submetido à Revista
Anatomia, Histologia e Embryologia
(ISSN: 1439-0264)
Norte Americana / EUA qualis B2.

O estudo foi realizado na Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCCG).

Avaliação Histológica e Estereológica da Pele do Acuponto Hegu (IG4) do Cão

Juliana Molina Martins¹, Ana Carolina Lyra de Albuquerque^{1;4}, Otávio Brillhante de Sousa¹, Ruthyanna Camila Medeiros da Silva², Fernando Vagner Lobo Ladd³ & Danilo José Ayres de Menezes^{1;3*}

¹Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

²Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁴Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

*Autor para correspondência: UFRN/CB/DMOR, Caixa Postal 1524 - Campus Universitário Lagoa Nova, CEP 59078-970 | Natal/RN - Brasil, Brasil. Tel.: +55 84 3215.3431 / 3211.9207. Endereço de e-mail: danayres@uol.com.br

Com 2 figuras e 1 tabela

Resumo

Devido à falta de dados na literatura que comprovem o mecanismo de ação da acupuntura, esta pesquisa teve como objetivo avaliar as estruturas do tecido da pele do ponto IG4 que proporciona ação fisiológica analgésica, para a contribuição do esclarecimento do mecanismo de captação do estímulo de acupuntura. Foram coletadas biópsias de pele de 10 cães adultos hípidos do acuponto IG4 e fora do acuponto, processadas para histologia e avaliadas por método estereológico, para quantificar a superfícies de vasos, proporção volumétrica e fibras colágenas que são estruturas histológicas que podem contribuir na transmissão de energias dos meridianos. A densidade de superfície de vasos foi de 1,06 mm²/mm³ no acuponto e 1,05mm²/mm³ fora do ponto, assim como respectivamente, o volume de fibras colágenas 52,5% e

54,7%. Apesar do uso da estereologia como ferramenta mais precisa para identificar estruturas que possam estar envolvidas na mecânica da acupuntura, não foram observadas diferenças entre a pele do acuponto e fora dele para os parâmetros analisados com a estatística teste t de Student ($p > 0,05$), mostrando a necessidade de mais estudos que comprovem a plasticidade do mecanismo de ação da acupuntura.

Palavras chave: Acupuntura, acuponto IG4, superfícies de vasos e fibras colágenas

Introdução

A acupuntura faz parte da medicina tradicional chinesa (M.T.C) que é uma ciência milenar (Paes, 2008). É baseada na estimulação de pontos específicos do corpo denominados de acupontos, que estão presentes na superfície cutânea dentro de canais de energia chamados meridianos, que apresentam disposição simétrica sobre a lateralidade direita e esquerda do corpo (Mann, 1994).

Segundo Otero (2005) cada ponto de acupuntura é único, não só em sua localização, mas em seu efeito biofisiológico, a técnica da acupuntura é utilizada para tratamento de doenças e analgesia para o controle da dor. O acuponto Hegu (IG4) quando estimulado apresenta como benefício à analgesia, este acuponto está localizado entre o osso metacarpo I e II no meridiano do Intestino grosso, cujo o meridiano é constituído por 20 acupontos, conforme (Kim, 2013 & Shoen, 2006).

De acordo com a hipótese de (Hashimoto, 2005 & Otero, 2005) o substrato físico dos meridianos poderia incluir o sistema nervoso periférico (os feixes neurovasculares, terminações nervosas sensoriais, espaços perivasculares e vasos perineurais) como condutores do estímulo do acuponto para o sistema nervoso central. Uma das linhas de pesquisas mais recente da captação do estímulo do acuponto (Konofagou & Largevin, 2005) demonstrou a existência de uma grande proximidade anatômica e funcional entre a rede de tecidos conjuntivos que formam as fáscias que recobrem os músculos com a rede de meridianos e pontos de acupuntura. Esses pesquisadores propuseram que o conteúdo de colágeno do tecido conjuntivo teria propriedades elétricas condutoras que poderiam servir de meio para as comunicações elétricas dentro da rede de meridianos de energia (Ho & Knight, 1998), porém sem explicar qual o mecanismo envolvido.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar no acuponto IG4 a quantificação da superfícies de vasos e proporção volumétrica de fibras colágenas que são estruturas histológicas que podem contribuir na transmissão da energia dos meridianos, com o intuito de contribuir para o entendimento do mecanismo de ação da acupuntura no cão.

Material e Métodos

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos-PB, sob protocolo N° 279-2015. O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas Morfológicas da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da UFCG.

Animais

Foram utilizados 10 cães saudáveis de proprietários da cidade de Patos, sem raça definida (SRD), adultos, fêmeas, para a coleta das biópsias. Para identificação do acuponto Hegu (IG4) foi seguida pela descrição anatômica do acuponto do meridiano do intestino grosso de acordo com (Kim, 2013), confirmando com o aparelho point scanner¹ também conhecido como acupontoscópio.

Coleta da Pele

As coletas foram realizadas no setor de cirurgia de pequenos animais no hospital veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no campus de Patos, Paraíba da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária.

Os animais foram tranquilizados com 0,1mg/kg de acepran² e 0,3mg/kg de diazepam³ intravenoso e o bloqueio periférico do nervo radial com anestesia infiltrativa regional de lidocaína⁴ 0,2ml/kg sem vaso constrictor, conforme Otero (2005). Foram realizadas biópsias de 6mm, coletadas com “punch” estéreis descartáveis nos membros

¹ Pointer Scanner Model L 1154 - Acuponto, São Paulo, Brazil Ltda.

² Acepran 1% , 20 ml, Injectable, Vetnil[©], São Paulo, Brasil Ltda.

³ Diazepam 5 mg/ml, Injectable, Sac[©], São Paulo, Brasil Ltda.

⁴ Lidocaína 2%, Injectable, Sac[©], São Paulo, Brasil Ltda.

torácicos esquerdo. Para o procedimento da histotécnica foram coletadas as biópsias de pele dos animais, sendo os materiais organizados em grupos.

Grupo 1 (Acuponto): Coletou as amostras no ponto IG4 (entre o osso metacarpo I e II) do membro torácico esquerdo (M.T.E) do meridiano do intestino grosso.

Grupo 2 (Controle): Coletou as amostras fora do acuponto (1cm abaixo do carpo) do M.T.E no meridiano do intestino grosso.

Processamento Histológico da Pele

As amostras de pele foram fixadas em formol a 10% por um período de 24 horas, em temperatura ambiente e em seguida, conservadas em álcool 70%. O processamento do tecido foi realizado de acordo com Santos (1993), com desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina para obtenção de lâminas histológicas.

Foram obtidos cortes transversais aleatórios uniformes (TAU). Para tanto as biópsias foram colocadas em um orientador para posicionamento do corte do material, em que a direção do corte na biópsia foi obtida com o uso de uma escala circular numerada, para definir a angulação do corte do material, com auxílio de tabela randômica (Gentle, 2003). Definida a face para corte, a biópsia foi embloca em parafina de forma a obter cortes transversais, tomando a epiderme como plano horizontal, possibilitando avaliar todas as camadas da pele (Kampet al., 2009).

Os cortes foram realizados em micrótomo-YR2258 com espessura de 5µm, obtendo-se 06 cortes aleatórios uniformes por biópsias, dividindo-se por 06 o diâmetro da biópsia, obtido a partir da face de corte, determinando, assim, a distância entre os cortes. As lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina/Eosina. As imagens foram capturadas em microscópio de luz, (Olympus BX40) acoplado a terminal de computador e analisadas com auxílio do programa Imagem Pro-express v 6.0.

Estimativa do Volume da biópsia

Para a estimativa dos volumes das biópsias, foi utilizado o Princípio de Cavalieri (Mayhew & Olsen, 1991; Howard & Reed, 2010). Para tal, um sistema teste quadrático com área conhecida foi aplicado sobre as seções amostradas e a seguinte fórmula foi utilizada:

$$V := \sum p \times (a/p) \times t$$

Onde $\sum p$ é o somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada; (a/p) é a área associada a cada ponto do sistema teste, t é a espessura das secções.

Estimativa da densidade de volume das fibras colágenas

A densidade de volume das fibras colágenas (V_v) foi estimada de acordo com a seguinte equação (Carpentieri-Pípolo & Bruel, 2002):

$$V_v = \Sigma P(\text{F. colágenas}) / \Sigma P(\text{Pt})$$

Onde, $\Sigma P(\text{F. colágenas})$ é o número total de pontos (de um sistema teste quadrático) que tocam as fibras colágenas e $\Sigma P(\text{Pt})$ é o número total de pontos (do mesmo sistema teste) tocando em toda a estrutura da área seccional. O valor obtido foi multiplicado por 100 para expressão em percentual.

Estimativa da densidade de superfície dos vasos

As análises foram feitas em 15 campos microscópicos aleatórios por indivíduo, fotografadas na objetiva de 20x. A densidade de superfície dos vasos foi estimada por meio de sistema teste de cicloides, contando-se os pontos de intersecção da superfície do endotélio pelo sistema de cicloides, aplicando a seguinte fórmula (Horton & Reed, 2010):

$$S_v = (2 \cdot \Sigma I_{(n)}) / (l/p \cdot \Sigma P)$$

Onde: S_v – densidade de superfície do vaso; $\Sigma I_{(n)}$ - somatório das intersecções dos cicloides dentro do vaso; l/p – comprimento das linhas; ΣP - somatório dos pontos no espaço referência (tecido).

Análise estatística

Os resultados quantitativos das variáveis apresentaram distribuição normal, onde foi aplicado o teste t (de Student) para testar as médias dos resultados quantitativos de 2 amostras.

Resultados

A pele da região do acuponto e do controle apresentou-se sem diferença histológica marcante, com ambas mostrando predominância de uma área epidérmica delgada e levemente ondulada com um epitélio estratificado pavimentoso e fina camada de queratina, sendo o epitélio com alguns locais mais espessos (figura 1. a).

As células do estrato basal do acuponto Hegu estão dispostas em uma única fileira com formato das células cúbicas ou cilíndricas. Essa camada repousa sobre a membrana basal, cujo epitélio é sustentado pelo tecido conjuntivo denso, contendo vasos sanguíneos e abundantes fibras colágenas (figura 1.a). Próximo aos folículos pilosos foram observadas glândulas sudoríparas apócrinas tubulosas, enoveladas e simples (figura 1.b), que se abrem para dentro do folículo piloso distribuindo por toda a pele com pêlos. As glândulas sebáceas estão associadas a folículos pilosos que são classificadas em glândulas alveolares ramificadas simples, como modo de secreção holócrino (figura 1. b).

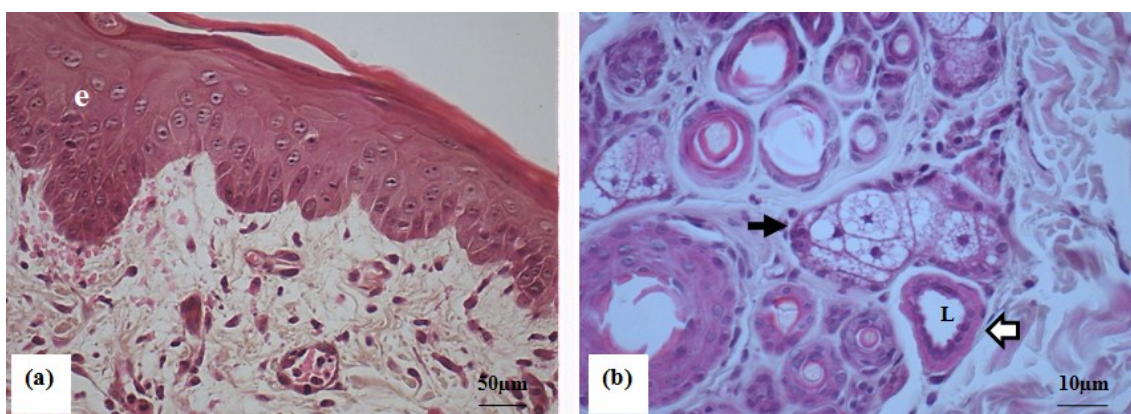


Figura 1 (a) Fotomicrografia no acuponto IG4 da epiderme (e), pode apresentar áreas mais espessas, mas com predominância delgada e levemente ondulada, Hematoxilina/Eosina. **(b)** Fotomicrografia no acuponto IG4 da derme, uma glândula sudorípara (seta branca) aparece próximo aos folículos pilosos do tecido subcutâneo, glândula sebácea (seta preta), com lóbulo sebáceo revestido por uma única camada de células, Hematoxilina/Eosina.

As células observadas nos acupontos e fora do mesmo foram fibroblastos, pequenas estruturas alongadas com citoplasma volumoso, os fibrócitos são semelhantes e menores aos fibroblastos, com citoplasma escasso. Observou-se linfócitos, estruturas

esferóides com citoplasma basofílico e núcleo com cromatina condensada, assim como os plasmócitos de aspecto parecido, com núcleo excêntrico com cromatina condensada.

Observou-se também nos acupontos e fora dos pontos de acupuntura, numerosos pequenos vasos sanguíneos no subcutâneo e nas vizinhanças das glândulas sebáceas e sudoríparas, sendo que artérias (figura 2.b) e veias foram mais freqüentes na hipoderme, assim como os vasos linfáticos (figura 2.a).

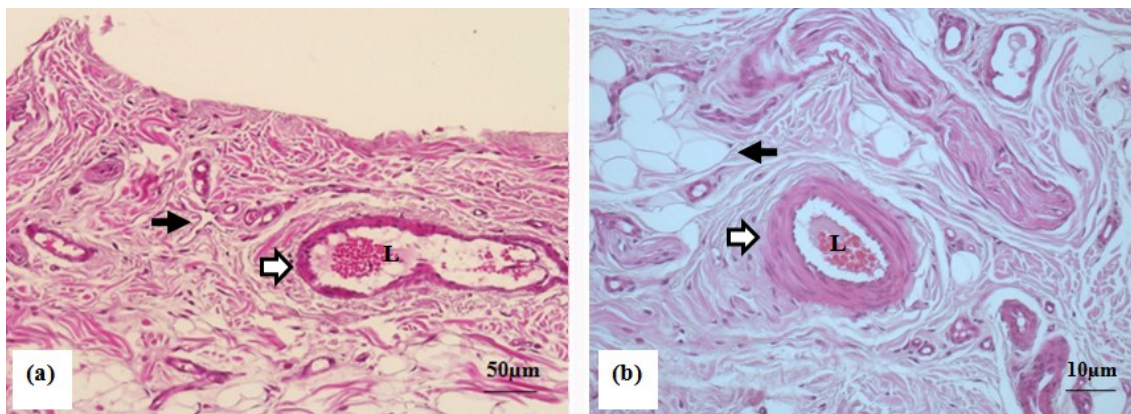


Figura 2(a) Fotomicrografia da derme da pele do acuponto IG4 do cão, mostrando vaso linfático (seta preta), veia (seta branca). **(b)** Fotomicrografia do acuponto IG4 do cão da derme e hipoderme mostrando artéria (seta branca) e tecido adiposo (seta preta), Hematoxilina/Eosina.

A tabela 1 mostra os dados estereológicos dos tecidos obtidos nas biópsias da pele no ponto IG4 e fora dele (controle).

Tabela 1 Comparação entre os parâmetros estereológicos do volume da biópsia, superfície de vasos sanguíneos e fibras colágenas do acuponto IG4 e da pele fora do ponto de acupuntura (controle) de cães adultos (média/erro padrão).

	Acuponto		Controle	
	Média	DP	Média	DP
V(mm ³)	35.02	11.9	34.77	10.48
Sv (mm ² /mm ³)	1.06	0.46	1.05	0.4
Vv (%)	52.5	4.9	54.7	7.1

V= volume da biópsia; Sv= densidade de superfície dos vasos; Vv= densidade de volume de fibras colágenas; DP=desvio padrão. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos avaliados pelo teste t de Student a 5% de significância.

Os vasos sanguíneos não demonstraram diferenças significativas nos parâmetros histológicos e estereológicos em ambos os grupos. As análises estereológicas de fibras colágenas demonstraram quantificações semelhantes nos acupontos e fora dos pontos de acupuntura.

Discussão

Os meridianos são caminhos precisos formados por diversos acupontos dotados de canais (20/50 milimícrons) que existem sob a superfície cutânea cheios de um fluido transparente e incolor, chamado de (*Qi*) que no ocidente é traduzido como energia, (Scilipoti, 1996). Esses canais analisados na histologia na região do acuponto IG4, bem como fora do acuponto no cão, em geral, mostrou-se semelhantes entre si, bem como também em biópsias de pele com pêlos em cães descritos na literatura (Webb e Calhoun, 1954; Lloyd & Garthwaite, 1982), assim como, em outras espécies foi observada as mesmas estruturas histológica de pele (Bacha & Wood, 1999; Banks, 1992; Monteiro-Riviere et al., 1993).

Na perspectiva da neurociência, pode-se considerar como ponto de acupuntura um local tanto receptor quanto efetor de sinais. Dados sugerem que a base estrutural dos acupontos está intimamente relacionada com a distribuição espacial dos nervos periféricos em torno dos vasos, músculos, tendões e outras estruturas, com os estímulos sendo captadas pelos nervos e transmitidos para o encéfalo (Zhou & Huang, 2010).

Segundo Otero (2005) a teoria que os meridianos estão dispostos paralelos aos grandes vasos do corpo do organismo, que eles representam linhas magnéticas de corrente induzidas criada pela circulação sanguínea, assim como (Janssens, 1991) admite que pontos de acupuntura têm um potencial elétrico mais elevado e irradiam mais calor o que supõem o carreamento da energia captada pela agulha através dos líquidos, os quais são excelentes condutores de corrente elétrica, porém, a quantificação a superfícies de vasos sanguíneos no acuponto (Hegu) $1.06 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ em comparação fora do acuponto (controle) $1.05 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ do meridiano do intestino grosso, não apresentaram nível de significância estatística ($p>0,05$) que pode corroborar com essa hipótese, no entanto, mais pesquisas são necessários para comprovar a real importância dos vasos na condução dos estímulos.

Os fibroblastos são células abundantes no corpo capazes de modular a atividade metabólica que originam as fibras colágenas e elásticas da pele Vieira et al., (2002), apesar de (Thomas & Rober, 2009) afirmarem que os meridianos e pontos de acupuntura podem estar relacionados diretamente com a fáscia superficial dos músculos cuja a eficácia da acupuntura desempenha interação com essas estruturas, a existência do conteúdo de colágeno do tecido conjuntivo teria propriedades elétricas condutoras que poderiam servir de meio para as comunicações elétricas dentro da rede de meridianos de energia, no entanto, as quantificações de densidade de fibras colágenas foram semelhantes no acuponto e fora do ponto, não apresentando em ambos os grupos resultados significativos,.

O número de estudos quantitativos estereológicos e alométricos sobre os acupontos e fora dos pontos de acupuntura continua sendo de pouca expressão na literatura científica. A comparação entre dados de indivíduos humanos e animais é importante para evitar distorções de interpretação, que podem ocorrer a partir dos estudos experimentais. Desta forma, os modelos morfométricos e estereológico são importantes para determinar tanto as variações morfológicas como as variações histológicas que ocorrem nos tecidos de acupontos e fora destes acupontos.

Conclusão

O presente estudo demonstrou os resultados dos parâmetros estereológicos de vasos sanguíneos e fibras colágenas não mostraram diferenças significativas no acuponto Hegu (IG4) e fora do ponto de acupuntura no meridiano do intestino grosso.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio de Joana Gomes Diniz, técnica de laboratório em histoquímica pela colaboração na preparação de lâminas histológicas e José Rômulo Soares dos Santos, técnico de laboratório, com seu inestimável papel na análise de dados de lâminas histológicas. Agradecer a Amana Fernandes, Rômulo Dias e Alick Sulliman pela colaboração no projeto da coleta das biópsias de pele e agradecer ao Comitê de Aperfeiçoamento do Pessoal de Educação Superior (CAPES) que financiou a pesquisa.

Conflito de interesses

Nenhum dos autores tem quaisquer relações financeiras ou pessoais que possam influenciar indevidamente ou viés o conteúdo do papel.

Fontes de financiamento

Esta pesquisa foi financiada pelo Comitê de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro de um mestrado.

Considerações éticas

Obteve-se o consentimento informado do proprietário dos animais para a retenção de tecidos e foi aprovado o projeto de pesquisa do Comitê de Ética da (UFCG) para o Uso de Animais sob o protocolo número 279-2015, Brasil.

Referencias

Bacha, W. & L. Wood, 1990: Color atlas of veterinary histology. Lea and Febiger, Philadelphia.

Banks, W. J. 1992: Applied Veterinary Histology. Manole, 2^a edition, São Paulo.

Carpentieri-Pipolo, V.; D.C. Bruel, 2002: Correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais em aceroleira. Revista Brasileira de Fruticultura, **24**, 115-119.

Gentle, J. E. 2003: Random Number Generation and Monte Carlo Methods. 2^a edition, Springer.

Hashimoto, P.H. 2005: The perineurial vessel a possible candidate for the structural basis of the meridian (Jing-Luo) in Chinese medicine. *Anatomical Science International*, **80**, 177-180.

Ho, M. & D. Knight, 1998: The acupuncture system and the liquid crystalline collagen fibers of the connective tissues. *American Journal of Complementary Medicine*, **26**, 251-63.

Howard, C.V. Reed, M.G. 2010: The tissue must be isotropic. *Unbiased Stereology Second Edition*, p. 34, Coleraine, U.K.

Horton, T. & H. Reed, 2010: Where the money goes: How we benefit from public services. London: Trades Union Congress.

Kamp, S., E. Jemec, K. Kemp, R. Kjeldsen, K. Stenderup, B. Pakkenberg & N. Dam, 2009: Application of stereology to dermatological research Methods review, **18**, 1001–1009.

Lloyd, D.H. & G. Garthwaite, 1982: Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Research in Veterinary Science*. **33**, 99-104.

Janssens, L. 1991: Acupuncture points, their palpability, the needling techniques and the practical use of needles. In: *Acupuncture in animals. Proceedings Postgraduate Veterinary Foundation, University of Sydney*. **167**, 99-100

Kim, C. H. 2013: Atlas of veterinary acupuncture: dogs and cats. Roca. São Paulo.

Konofagou, E. E & H. Largevin, 2005: Using ultrasound to understand acupuncture. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*. **24**, 41-46.

Mann, F. 1994: Acupuncture the Chinese art of Healing. Hemus. São Paulo.

Mayhew, T.M.; D.R. Olsen, 1991: Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the cavalieri principle. *Journal of Anatomy*, **178**, 133-144.

Monteiro-Riviere, N., W. Stinson and H. Calhoun, 1993: Integument. In: Dieter-Dellmann H. *Textbook of veterinary histology*. 4th edition, Philadelphia, Lea and Febig.

Otero, P. 2005: Pain evaluation and treatment in small animals. Interbook, São Paulo.

Paes, C. M. 2008: The Spleen and Stomach According to the View of Traditional Chinese Medicine. 50f. Monograph, Center for Traditional Medicine and Traditional Chinese Studies, São Paulo.

Santos N. M., 1993: Histoquímica. Universidade Federal de Santa Maria, Patologia Veterinária, 60-72, Santa Maria

Scilipoti, D. 1996: Moxibustion: Applications of Moxibustion in Medical Therapy. Ícone, São Paulo.

Shoen, Allen M. 2006: Veterinary acupuncture: from ancient art to modern medicine, Roca, São Paulo.

Sterio, D.C. 1984: The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.*; **134**, 127-36.

Thomas, F. & S. Robet, 2009: "Introduction," in *Fascia Research II*, Amsterdam Basic Science and Implications for Conventional and Complementary Health Care. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.

Vieira, C.S.C.A; Magalhães, E.S.B.; BajaI, H.M. 2002. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. **2**, p.52.

Zhou, F. & Huang, D. 2010: Neuroanatomic basis of acupuncture points. *Acupuncture Therapy for Neurological Diseases*. Springer Berlin Heidelberg, 32-80.

Webb A.J. & M.L, Calhoun. 1954: The microscopic anatomy of the skin f mongrel dogs. *Am. J. Vet. Res.* **15**:274-280.

1. CAPÍTULO II

EFEITO SOBRE A ESTRUTURA DA PELE EM ACUPONTOS COMPARANDO O USO DE LASER E DE AGULHA

Manuscrito submetido à Revista
Microscopy Research and Technique
(ISSN: 1097-0029)
Norte Americana / EUA qualis B1.

Efeito sobre a estrutura da pele em acupontos comparando o uso de laser e de agulha

Juliana Molina Martins¹, Ana Carolina Lyra de Albuquerque⁴, Alick Sulliman Santos de Farias², Fernando Vagner Lobo Ladd³, Amana Fernandes Maia² & Danilo José Ayres de Menezes^{1,3*}.

¹Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

²Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁴Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

*Autor para correspondência: UFRN/CB/DMOR, Caixa Postal 1524 - Campus Universitário Lagoa Nova, CEP 59078-970 | Natal/RN - Brasil, Brasil. Tel.: +55 84 3215.3431 / 3211.9207. Endereço de e-mail: danayres@uol.com.br

RESUMO

Os acupontos são constituídos por estruturas que desencadeiam o efeito da acupuntura e os estímulos em pontos específicos na pele são capazes de influenciar tratamento de enfermidades adquiridas no corpo. Nesse sentido, objetivou-se analisar a histologia da pele no ponto IG4 estimulado com acupuntura e no ponto E36 com laser de baixa potência (laserpuntura), que quando estimulados tem ação analgésica. Foram coletas biópsias de pele de 10 cães adultos hípidos do acuponto Hegu (IG4) estimulado com agulha 0,25x30 mm e o ponto Zusanli (E36) estimulado com laser de arsenieto de gálio e alumínio (AsGaAl) e do acuponto não estimulado (controle). Os materiais foram processados para histologia e quantificados quanto à densidade de superfície de vasos na acupuntura 1.69mm²/mm³, na laserpuntura 1.37mm²/mm³ e no controle 1,06mm²/mm³, assim como respectivamente, o volume de fibras colágenas 53.6%, 55.3% e 52.5%. Apesar de observar aumento visual microscópico de proliferação

celular do sistema imune da derme superficial estimulada por acupuntura, não foram observadas diferenças significativas na análise estatística ANOVA ($\alpha > 5\%$) entre a pele do acuponto estimulado com acupuntura, laserpuntura e o ponto não estimulado para os demais parâmetros estereológicos analisados.

Palavras chave: Acupuntura, laserpuntura, ponto IG4, ponto E36, parâmetros estereológicos

1 | INTRODUÇÃO

A acupuntura é uma ciência milenar (Paes, 2008) baseada na estimulação de pontos específicos do corpo denominados de acupontos que estão presentes na superfície cutânea dentro de canais de energia chamados meridianos, que apresentam disposição simétrica sobre a lateralidade direita e esquerda do corpo (Mann, 1994). O ponto de acupuntura são encontrados na epiderme em uma profundidade máxima de 2 cm (Valchinov & Pallikarakis, 2005) e os acupontos podem ser estimulados por acupressão, moxabustão, acupuntura, eletroacupuntura e laserpuntura (Luna, 2002 & Lin, 2006).

A aplicação da estimulação de acupontos com lasers de baixa potência ou *Low Level Therapy* (LLT) (Fridmann & Lubart, 1993) é um método não invasivo que consiste em estimular os acupontos com comprimento de onda infravermelho que variam entre 780 a 870nm e com rendimento de potência entre 20 a 100mW (*soft-laser*) (Wittaker, 2004), em geral os lasers são constituídos de Arsenieto de Gálio e Alumínio (Ga Al As) (Enwemeka, 1998). De acordo com (Nicolau et al., 2004) o laser de diodo têm depósito energético pouco absorvível pelo componente aquoso e hemoglobina, e por isso, a profundidade de penetração pode alcançar 2 a 3 cm na derme.

Segundo Otero (2005) cada ponto de acupuntura é único, não só em sua localização, mas em seu efeito biofisiológico, a técnica da acupuntura é utilizada para tratamento de doenças e controle da dor. O acuponto Hegu (IG4) quando estimulado apresenta como benefício à analgesia, este acuponto está localizado entre o osso metacarpo I e II no meridiano do Intestino grosso, cujo meridiano é constituído por 20 acupontos, conforme (Kim, 2013 & Shoen, 2006). Já o ponto Zusanli (E36) encontra-se no meridiano do Estômago formado com 45 acupontos (Shoen, 2006), localizado no membro pélvico, na face lateral da tíbia, a sua estimulação aumenta o limiar da dor,

proporcionando ação analgésica em dores abdominais e regulando a motilidade gastrointestinal (Draehmpael & Zohmann, 1997).

De acordo com a hipótese de (Hashimoto, 2005) e (Otero, 2005) o substrato físico dos meridianos poderia incluir o sistema nervoso periférico (os feixes neurovasculares, terminações nervosas sensoriais, espaços perivasculares e vasos perineurais) como condutores do estímulo do acuponto para o sistema nervoso central. Uma das linhas de pesquisas mais recente da captação do estímulo do acuponto (Konofagou & Largevin, 2005) demonstrou a existência de uma grande proximidade anatômica e funcional entre a rede de tecidos conjuntivos que formam as fâscias que recobrem os músculos com a rede de meridianos e pontos de acupuntura. Esses pesquisadores propuseram que o conteúdo de colágeno do tecido conjuntivo teria propriedades elétricas condutoras que poderiam servir de meio para as comunicações elétricas dentro da rede de meridianos de energia (Ho & Knight, 1998), porém sem explicar qual o mecanismo envolvido.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar a estrutura da pele no acuponto IG4 estimulado por agulha estática e E36 estimulado com laser de baixa potência, com o intuito de contribuir para o entendimento do mecanismo de ação da acupuntura no organismo do cão.

2 | MATERIALS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Patos-PB, sob protocolo Nº 279-2015. O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisas Morfológicas da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária da UFCG.

Foram utilizados 10 cães saudáveis de proprietários da cidade de Patos, sem raça definida (SRD), adultos, fêmeas, para a coleta das biópsias. Para identificação dos acupontos utilizados, foi seguida a descrição anatômica dos meridianos, de acordo com Kim, (2013) e foi confirmado com aparelho point scanner⁵, também conhecido como acupontoscópio

⁵Localizador tipo caneta Point Scanner modelo L 1154 – Acuponto, São Paulo, Brasil Ltda

2.1 | Coleta da Pele

As coletas foram realizadas no setor de cirurgia de pequenos animais no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), no Campus de Patos, Paraíba.

Os animais foram tranquilizados com 0,1mg/kg de acepran⁶ e 0,3mg/kg de diazepam⁷ intravenoso e o bloqueio periférico do nervo radial e safeno com anestesia infiltrativa regional com lidocaína⁸ 0,2ml/kg sem vaso constritor, de acordo com Otero (2005). Foram realizadas biópsias de pele de 6mm, coletadas com “punch” estéreis descartáveis, nos locais indicados, conforme a organização dos seguintes grupos:

Grupo 1: Pele do acuponto IG4 do membro torácico direito (MTD). O acuponto foi estimulado por 10 minutos por uma agulha de acupuntura⁹ 0,25mm de diâmetro por 30mm de comprimento (0,25x30). Foram realizados duas sessões de acupuntura, com intervalo de 3 dias. A biópsia foi realizada 30 minutos após a segunda estimulação.

Grupo 2: Pele do acuponto E36 do membro pélvico direito (M.P.D). O acuponto foi estimulado com Laser Duo (GaAlAs)¹⁰, ou laserterapia portátil, com fonte de diodo infravermelho com a potência de 100 mW/cm² com comprimento de onda de 808nm, com duração de tempo de 30 segundos sobre a pele tricotomizada do animal, em duas sessões com intervalo de 3 dias para a segunda estimulação. A biópsia foi realizada 30 minutos após a segunda sessão.

Grupo 3: Acuponto IG4 do membro torácico esquerdo (M.T.E), entre o osso metacarpo I e II, (Controle) do meridiano do intestino grosso coletado sem qualquer estimulação.

⁶Acepran 1%, 20ml, injetável, Vetnil[©], São Paulo, Brasil Ltda.

⁷Diazepam 5mg/ml, injetável, Sac[©], São Paulo, Brasil Ltda.

⁸Lidocaína 2%, injetável, Sac[©], São Paulo, Brasil Ltda.

⁹Agulha de Acupuntura, 25x30, DongBang[©]Ltda-Epp-Brasil.

¹⁰Laser Duo (GaAlAs), MMO[©], Ltda-Brasil

2.2 | Processamento Histológico da Pele

As amostras de pele foram fixadas em formol a 10% por um período de 24 horas, em temperatura ambiente e em seguida, conservada em álcool 70%. O processamento do tecido foi realizado de acordo com Santos, (1993), com desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina para obtenção de lâminas histológicas.

Foram obtidos cortes transversais aleatórios uniformes (TAU). Para tanto as biópsias foram colocadas em um orientador para posicionamento do corte do material, em que a direção do corte na biópsia foi obtida com o uso de uma escala circular numerada, para definir a angulação do corte do material, com auxílio de tabela randômica (Gentle, 2003). Definida a face para corte, a biópsia foi emblocada em parafina de forma a obter cortes transversais, tomando a epiderme como plano horizontal, possibilitando avaliar todas as camadas da pele (Kampet al., 2009).

Os cortes foram realizados em micrótomo-YR2258 com espessura de 5 μ m, obtendo-se 06 cortes aleatórios uniformes por biópsias, dividindo-se por 06 o diâmetro da biópsia, obtido a partir da face de corte, determinando, assim, a distância entre os cortes. As lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina/Eosina. As imagens foram capturadas em microscópio de luz, (Olympus BX40) acoplado a terminal de computador e analisadas com auxílio do programa Imagem Pro-express v 6.0.

2.3 | Estimativa do Volume da biópsia

Para a estimativa dos volumes das biópsias, foi utilizado o Princípio de Cavalieri (Mayhew & Olsen 1991; Howard & Reed, 2010). Para tal, um sistema teste quadrático com área conhecida foi aplicado sobre as secções amostradas e a seguinte fórmula foi utilizada:

$$V := \sum p \times (a/p) \times t$$

Onde $\sum p$ é o somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada; (a/p) é a área associada a cada ponto do sistema teste, t é a espessura das secções.

2.4 | Estimativa da densidade de volume das fibras colágenas

A densidade de volume das fibras colágenas (V_v) foi estimada de acordo com a seguinte equação (Carpentieri-Pípolo & Bruel, 2002):

$$V_v = \Sigma P(\text{F. colágenas}) / \Sigma P(\text{Pt})$$

onde, $\Sigma P(\text{F. colágenas})$ é o número total de pontos (de um sistema teste quadrático) que tocam as fibras colágenas e $\Sigma P(\text{Pt})$ é o número total de pontos (do mesmo sistema teste) tocando em toda a estrutura da área seccional. O valor obtido foi multiplicado por 100 para expressão em percentual.

2.5 | Estimativa da densidade de superfície dos vasos

As análises foram feitas em 15 campos microscópicos aleatórios por indivíduo, fotografadas na objetiva de 20x. A densidade de superfície dos vasos foi estimada por meio de sistema teste de cicloides, contando-se os pontos de intersecção da superfície do endotélio pelo sistema de cicloides, aplicando a seguinte fórmula (Horton & Reed, 2010):

$$S_v = (2 \cdot \Sigma I(n)) / (l/p \cdot \Sigma P)$$

Onde: S_v – densidade de superfície do vaso; $\Sigma I(n)$ - somatório das intersecções dos cicloides dentro do vaso; l/p – comprimento das linhas; ΣP - somatório dos pontos no espaço referência (tecido).

2.6 | Análise Estatística

Os resultados quantitativos das variáveis apresentaram distribuição normal, onde foi aplicado ANOVA para testar as médias dos resultados quantitativos de 3 amostras.

3 | RESULTADOS

Foram observadas diferenças histológicas características da reação tecidual para cada tipo de método de estimulação nos acupontos. Nas lâminas de acupontos IG4 estimulados com a agulha observou aglomeração da proliferação de células inflamatórias com disposição transversal na derme superficial (figura 1. a), diferente da disposição de infiltrado de células no acuponto E36 estimulado com laser, foi observado grupo de células mais dispersa próximo a epiderme (figura 1.b), não sendo indicativo de

manifestação dermatológica patológica. O ponto E36 apresentou semelhante ao acuponto IG4 não estimulado com relação a disposição celular à derme superficial (figura 1.c)

Em uma análise mais aproximada, foi possível identificar as células que se destacaram na região da pele dos pontos estimulados, com predomínio dos linfócitos, de aspecto esferóide com citoplasma basofílico e núcleo com cromatina condensada, mas também foram identificados plasmócitos de aspecto parecido com núcleo excêntrico com cromatina condensada e mastócitos ocasionais (figura 1.d).

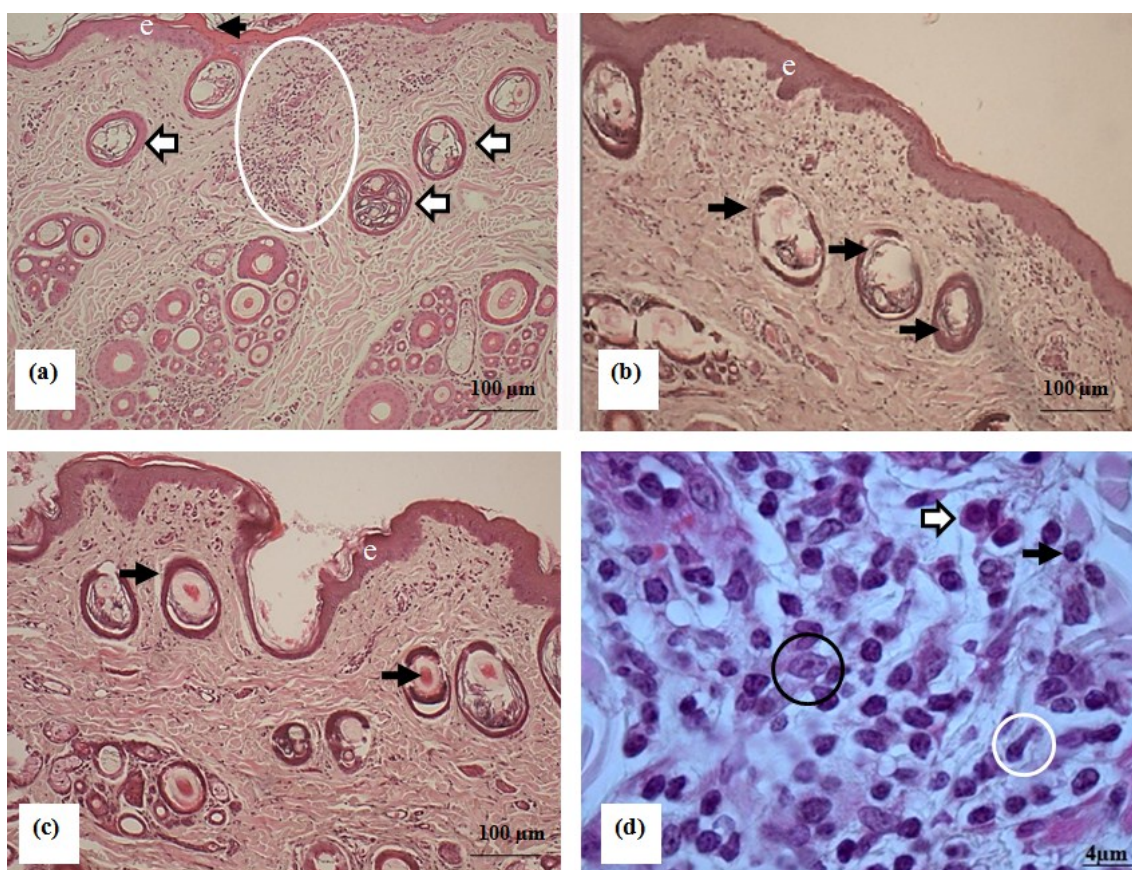


Figura 1 (a) Pele do acuponto IG4 M.T.D do cão estimulado com agulha com discreta hiperparaceratose da queratina (seta preta) no epitélio (e), com proliferação celular focal da derme superficial (circulo branco) adjacente aos folículos pilosos (setas brancas), Hematoxilina/Eosina. **(b)** Pele do acuponto E36 estimulado com aplicação de laser com proliferação celular discreta e difusa na epiderme e na derme superficial adjacente aos folículos pilosos (setas pretas), Hematoxilina/Eosina. **(c)** Pele do Acuponto IG4 do M.T.E não estimulado, camada de queratina no epitélio estratificado simples (e) com células dispersas na derme superficial próximo aos folículos pilosos (setas pretas), hematoxilina/Eosina. **(d)** Fotomicrografia da região do infiltrado

inflamatório do ponto IG4 estimulado com agulha, observando plasmócito (seta branca), linfócitos (seta preta), mastócito (círculo preto) e fibroblastos (círculo branco) na derme superficial, Hematoxilina/Eosina.

Nas biópsias também foram observados numerosos vasos sanguíneos no subcutâneo. Estes vasos mostraram discreto aumento da densidade de superfície nos pontos estimulados em comparação à pele do ponto não estimulado (Tabela 1).

Tabela 1 Comparação entre os parâmetros estereológicos da pele nos acupontos estimulados e no acuponto controle de cães adultos (média/desvio padrão)

	Acuponto Agulha		Acuponto Laser		Acuponto/controle	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
V (mm ³)	24.67	4.59	25.01	9	29.41	8.8
Sv (mm ² /mm ³)	1.69	0.65	1.37	0.65	1.06	0.46
Vv (%)	53.6	5.83	55.3	5.07	52.5	4.9

V= volume da biópsia; Sv= densidade de superfície dos vasos; Vv= densidade de volume de fibras colágenas; DP=desvio padrão. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos avaliados ANOVA a 5% de significância.

4 | DISCUSSÃO

Na microscopia das biópsias dos acupontos estimulados observaram-se células do sistema de defesa com características de inflamação contra agentes estranhos na pele, no entanto, não apresentaram inflamação patogênica na derme superficial, sendo que a proliferação de células com estimativa histológica visual aumentada principalmente na acupuntura foi devido à agulha produzir microlesão tecidual com possível estimulação imunológica celular e ativação do processo de cicatrização da injúria, segundo Albuquerque (2005) a lesão no tecido provoca a quimiotaxia, neovascularização, proliferação, depósito e reorganização da matriz extracelular que leva a cicatrização da injúria.

Tanto o acuponto estimulado por agulha e por laser mostraram reação celular, tendo o estímulo por agulha apresentado uma maior expressividade de células

inflamatórias de forma focal, a poucos centímetros de profundidade na derme e hipoderme, apoiando o que Otero (2005) afirma, onde a agulha ao ser inserida libera , *in situ*, grânulos de histamina no tecido, as quais atuam sobre o sistema reticulo endotelial. Assim como, o sistema endócrino é estimulado a produzir substâncias por meio da produção de mediadores químicos, epinefrina e acetilcolina. Desse modo, por meio do sistema nervoso vegetativo (estritamente ligado ao sistema glandular endócrino), é desencadeada, por via reflexa, a reação de defesa saudável (Otero, 2005).

O aparecimento das células observadas nas biópsias estimuladas com agulha e laser nada mais é do que demonstrando na fase da inflamação, que depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos, que chegam no momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias, são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias (Mandelbaum, 2003). Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana, seu papel não é bem definido, mas sabe-se que, com suas linfocinas, têm importante influência sobre os macrófagos (Mandelbaum, 2003).

Nas biópsias estimuladas por laser, a reação inflamatória foi discreta, não havendo diferenças marcantes com a pele da região sem estímulo. Isso deveu-se pelo fato de que a laserterapia apresenta benefícios em reações inflamatórias como, a redução de edema, diminuição do processo inflamatório, aumento da fagocitose, aceleração da mitose e aumento da síntese de colágeno (Carvalho et al., 2003). A laserpuntura auxilia no tratamento de lesão tecidual, que está relacionada com a coagulação, inflamação, fibroplasia, neovascularização, contração da ferida e reconstituição do epitélio principalmente por queratinócitos (Bisht, 1999).

O fato de não ter ocorrido diferenças na quantificação de colágeno entre os pontos de acupuntura estimulados e não estimulados demonstra que a prática da acupuntura, seja por qual mecanismo for, não causa uma injúria significativa a ponto de apresentar reação de cicatrização mais relevante, pois, a exposição ao laser em termos de frequência e de duração não foram suficientes para tal, já que para o laserterapia resulta em fibroplasia conjuntiva em regeneração tecidual depende do tempo de duração e repetições da exposição (Carvalho et al., 2003). O mesmo se aplica ao uso da agulha que para provocar o processo de cicatrização deve ter constância de estímulo, já que o corpo tende a encapsular ou expulsar um corpo estranho (Dulcetti, 2001).

Janssens (1991) admite que pontos de acupuntura tem um potencial elétrico mais elevado e irradiam mais calor, que pode ser indicativa da existência de melhor circulação de sangue ou energia nos acupontos que se localizam nos meridianos na derme superficial da pele. Isso pode explicar o fato da tendência do aumento das quantificações das médias da dilatação nos vasos sanguíneos no subcutâneo, expresso pelo aumento da densidade de superfície de vasos, que os acupontos estimulados por acupuntura e laserpuntura das biópsias coletadas podem estar relacionados com a teoria que os meridianos estão dispostos paralelos aos grandes vasos do corpo e que representam as linhas magnéticas de corrente induzidas criada pela circulação sanguínea (Otero, 2005),

Por outro lado, o processo de injúria provoca vasodilatação periférica (Cheng, 2014; Carlsson, 2002), que pode induzir a tendência do aumento da superfície de vasos, sendo indicativo de maior irrigação nos acupontos, permitindo melhor circulação sanguínea, que pode corroborar com o carreamento da energia captada pela agulha através dos líquidos, os quais são excelentes condutores de corrente elétrica, porém, mais estudos merecem atenção para comprovar esta teoria.

5 | CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou os resultados dos parâmetros estereológicos de densidade de superfície de vasos sanguíneos e densidade de fibras colágenas não demonstraram diferenças significativas no acupontos estimulados e não estimulados, indicando que os procedimentos de acupuntura não provocam reações teciduais significativas, sendo, tanto o laser como o uso de agulhas, seguros para a saúde da região estimulada. Uma tendência ao aumento da superfície de vasos nos pontos estimulados pode ser indicativo da condução do estímulo energético ser feito pela corrente sanguínea, o que merece maiores estudos neste campo

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio de Joana Gomes Diniz, técnica de laboratório em histoquímica pela colaboração na preparação de lâminas histológicas e José Rômulo Soares dos Santos, técnico de laboratório, com seu inestimável papel na análise de dados de lâminas histológicas. Agradecer a Amana Fernandes, Rômulo Dias e Alick Sulliman pela colaboração no projeto da coleta das biópsias de pele e agradecer ao

Comitê de Aperfeiçoamento do Pessoal de Educação Superior (CAPES) que financiou a pesquisa.

Conflito de interesses

Nenhum dos autores tem quaisquer relações financeiras ou pessoais que possam influenciar indevidamente ou viés o conteúdo do papel.

Fontes de financiamento

Esta pesquisa foi financiada pelo Comitê de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro de um mestrado.

Considerações éticas

Obteve-se o consentimento dos proprietários dos animais para a retenção de tecidos e foi aprovado o projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da (UFCG) para o Uso de Animais sob o protocolo número 279-2015, Brasil.

REFERÊNCIAS

Albuquerque, E. R. C. (2005). Avaliação clínica e histológica de feridas cutâneas tratadas por segunda intenção com lectina de *Craulyiasmollis* em camundongos. 60 f. Dissertação, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Bischt, D. et al., (1999). Effect of helium neon laser on wound. Indian Journal of Experimental Biology. 37, 187-189.

Carpentieri-Pipolo, V. & D.C. Bruel,, (2002). Correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais em aceroleira. Revista Brasileira de Fruticultura, 24, 115-119.

Carvalho, P.T.C.,N. Mazzer & J.V.L.Siqueira, (2003). Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laserHe-Ne. Fisioterapia Brasil, 4, 253-257.

Carlsson, C. (2002). Acupuncture mechanisms for clinically relevant long-term effectsreconsideration and a hypothesis. Acupunct Med.; 20, 82-99.

Cheng, K.J. (2014). Neurobiological Mechanisms of Acupuncture for Some Common Illnesses: A Clinician's Perspective. *J Acupunct Meridian Stud.* **3**, 105-14.

Draehmpael, D. & Zohmann, (1997). A. Acupuntura no cão e no gato. Princípios básicos e prática científica. Roca, São Paulo.

Dulcetti, Orley J. (2001). Pequeno Tratado de Acupuntura Tradicional Chinesa. Andrei, São Paulo.

Enwemeka, C. S., (1998). Laser biostimulation of healing wounds: specific effects and mechanisms of action. *Journal Orthop and Sports Physical Therapy*, **10**, 333-338.

Friedmann, H. & Lubart, R., (1993). Nonlinear photobiostimulation: the mechanism of visible and infrared laser induced stimulation and reaction of neural excitability and growth laser therapy. **5**, 39-42.

Gentle, J. E. (2003). Random Number Generation and Monte Carlo Methods. 2^a edition, Springer.

Hashimoto, P.H. (2005). The perineurial vessel a possible candidate for the structural basis of the meridian (Jing-Luo) in Chinese medicine. *Anatomical Science International*, **80**, 177-180.

Howard, C.V. & Reed, M.G. (2010). The tissue must be isotropic. *Unbiased Stereology Second Edition*, p. 34, Coleraine, U.K.

Horton, T. & H. Reed, (2010). Where the money goes: How we benefit from public services. London: Trades Union Congress.

<http://www.tuc.org.uk/extras/wherethemoneygoes.pdf>

Ho, M. & D. Knight, (1998). The acupuncture system and the liquid crystalline collagen fibers of the connective tissues. *American Journal of Complementary Medicine*, **26**, 251-63.

- Kim, C. H. (2013). Atlas of veterinary acupuncture: dogs and cats. Roca. São Paulo.
- Konofagou, E. & H.Largevin, (2005). Using ultrasound to understand acupuncture. IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine. **24**, 41-46.
- Lin, J.G. et al., (2002). The effect of high and low frequency electroacupuncture in pain after lower abdominal surgery. Pain, 99, 509-514.
- Luna, S.P.L, (2002). Emprego da acupuntura em anestesia. In: Fantoni, D.T.; Cortopassi, S.R.G. Anestesia em cães e gatos. Roca, 337-343, São Paulo.
- Janssens, L. A. A., (1991). Acupuncture points, their palpability, the needling techniques and the practical use of needles. In: Acupuncture in animals. Proceedings Postgraduate Veterinary Foundation, University of Sydney. **167**, 99-100
- Mandelbaum, S. H. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -parte I. Cicatrization: current concepts and Continuing Medical Education 395. Anbras Dermatol, Rio de Janeiro, 4, 393-410.
- Mann, F., (1994). Acupuntura a arte chinesa de Curar. Hemus, São Paulo.
- Mayhew, T.M. & D.R. Olsen, 1991: Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the cavalieri principle. journal of Anatomy, 178, 133-144.
- Nicolau, R. A. et al., (2004). Effect of low power 655nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse diaphragm. Lasers in Surgery and Medicine, 34, 277-284.

Otero, Pablo (2005). Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais. Interbook, São Paulo.

Paes, C. M. (2008). The Spleen and Stomach According to the View of Traditional Chinese Medicine. 50f. Monograph, Center for Traditional Medicine and Traditional Chinese Studies, São Paulo.

Santos N. M., (1993). Histoquímica. Universidade Federal de Santa Maria, Patologia Veterinária,60-72, Santa Maria

Shoen, Allen M. (2006). Veterinary acupuncture: from ancient art to modern medicine, Roca, São Paulo.

Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc.;134, 127-36.

Valchinov, E.S. & N.E., Pallikarakis, (2005). Desing and testing of low intensity laser biostimulator. BioMedical on Online, 5,1-10.

Wittaker, P., (2004). Laser Acupuncture: past, present and future. Lasers in Medica Science, 19, 69-80.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados dos parâmetros estereológicos analisados não demonstraram diferenças significativas nos acupontos e fora dos pontos de acupuntura, assim como, nos acupontos estimulados e não estimulados. Apesar de provocarem reações inflamatórias locais na aplicação de estímulos por agulha e por laser, a acupuntura com estes métodos não causa reação expressiva a ponto de provocar lesão tecidual com conseqüente processo de cicatrização. Outros estudos merecem atenção na tentativa de explicar os mecanismos morfofuncionais envolvidos na aplicação de tratamentos com acupuntura.

2. ANEXOS

ANEXO I**NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE****PPGMV – UFCG****CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL CAMPUS DE PATOS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA VETERINÁRIA****NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO E TESE**

O corpo da dissertação será constituído por capítulos, pelo menos dois: 1- Revisão da literatura e 2- um trabalho nas normas da revista científica Qualis A ou B da CAPES o qual será enviado, obedecendo ao prazo máximo de 30 dias após a defesa.

Ao invés da revisão de literatura, o aluno poderá apresentar outro artigo científico, na mesma linha de pesquisa. A dissertação constará, dessa forma, de dois artigos científicos, um título que abranja os dois artigos, uma introdução e conclusões relacionadas aos dois artigos.

O trabalho será redigido seguindo as normas da revista para a qual será enviado. A revisão da literatura, se não tiver sido enviada para outra revista, deve seguir as mesmas normas que o trabalho a ser enviado, deverá ser incluída versão em inglês e português. Se a dissertação constar de mais de um trabalho original, estes deverão seguir as normas das respectivas revistas para as quais serão enviados.

Em todos os casos, no final da dissertação devem ser incluídas, como anexo, as normas da (s) revista (s) para as quais os trabalhos serão enviados. Para a formação da dissertação, será utilizada a folha A4. O estilo da fonte deve ser Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 entre as linhas.

Na capa será incluído o nome da instituição, abaixo o título, ao lado direito à descrição da dissertação sem constar à área, abaixo o nome do mestrando e por último o nome da cidade, Estado e data. A contracapa será constituída da mesma forma da capa, acrescentando-lhe apenas o nome do orientador e no verso, a ficha catalográfica.

No caso do aluno optar pela apresentação deverá ser incluída uma introdução com uma explicação dos dois trabalhos. No final, após o último capítulo deverão ir as conclusões do(s) trabalho(s). Tanto na apresentação quanto nos diferentes capítulos e conclusões, nos exemplares para a defesa da dissertação deve ser incluído, à direita da folha, a numeração das linhas, exceto na versão final.

O sumário será antes da introdução. As Figuras, Tabelas ou Quadros devem ser incluídos dentro dos resultados, em folhas separadas, com não mais de 4 Figuras, Quadros ou Tabelas por folha.

Um volume deverá ser entregue à coordenação 45 dias antes da defesa para ser encaminhado a um revisor para avaliação se o mesmo está apto à defesa.

Cinco exemplares da dissertação devem ser entregues à coordenação, no mínimo 30 dias antes da defesa. Após a defesa o mestrando deverá entregar na coordenação do programa 5 (cinco) exemplares da dissertação, com pelo menos 2 (duas) em capa dura, no prazo previsto no regimento (30 dias após a defesa). Obrigatoriamente deverá constar a ficha catalográfica.

Na versão final da dissertação não deve constar o anexo da cópia do trabalho em inglês a ser publicado na revista, mas somente a cópia do trabalho em português. No anexo deverá constar uma folha mencionando o site da revista em que o artigo será publicado. Deverá ser entregue na Coordenação em separado uma cópia do artigo escrito em inglês, com as devidas correções da banca, a ser enviado para publicação.

Agradecimentos e dedicatórias serão optativos.

Entregar uma cópia em CD da dissertação e/ou tese em pdf em um único arquivo. Deverá ser idêntico à versão impressa. Não será aceito a dissertação em mais de um arquivo.

Patos, 03 de junho de 2011.

Prof. Dr. Franklin Riet Correa
Coordenador do PPGMV

ANEXO II
NORMAS DO CAPÍTULO I
INSTRUÇÕES AOS AUTORES
ANATOMIA, HISTOLOGIA E EMBRYOLOGIA

Os trabalhos para submissão devem ser publicados em formato on-line só é eficaz com o volume de 2017. Este é um movimento proativo para reduzir o impacto ambiental causado pela produção e distribuição de cópias de revistas impressas e permitirá que a revista para investir em desenvolvimento digital mais. Os artigos publicados continuarão a ser divulgados rapidamente através da ampla rede de serviços de indexação da revista, incluindo MEDLINE / PubMed e Web of Science. Os artigos também continuarão a ser detectáveis através de motores de busca populares, como o Google. Todas as imagens coloridas publicadas em 2017 serão reproduzidas digitalmente e publicadas gratuitamente.

Conteúdo das Diretrizes para Autores: 1. Geral, 2. Envio de manuscritos, 3. Diretrizes Éticas, 4. Tipos manuscrito aprovado, Formato 5. Manuscrito e estrutura, 6. Depois de Aceitação.

Sites úteis: Artigos publicados em Anatomia, Histologia, Embryologia, Autor Serviços, Diretrizes Éticas da BlackwellPublishing, Diretrizes para figuras.

1. GERAL

Os autores são incentivados a visitar Wiley-Blackwell Autor Serviços para mais informações sobre a preparação e apresentação de artigos e números.

2. ENVIO DE MANUSCRITOS

Todos os trabalhos devem ser submetidos eletronicamente para <http://mc.manuscriptcentral.com/ahe>.

O uso de uma submissão on-line e site de revisão de pares aceleram o processo de tomada de decisão, permite a distribuição imediata e permite aos autores acompanhar o status de seus próprios manuscritos. Se for necessária assistência (ou se por algum motivo a submissão on-line não for possível), o Escritório de Redação pode ser contatado e fornecerá prontamente qualquer ajuda que os usuários precisem para carregar seus manuscritos. Escritório Editorial:

Carlo Guison E-mail: AHEoffice@wiley.com

2.1. SUBMISSÃO ON-LINE

Para submeter um manuscrito, por favor, siga as instruções abaixo.

1. Inicie o navegador web (Internet Explorer 6 ou superior, Netscape 7 ou superior, Safari 1.2.4 ou Firefox 1.0.4 ou superior) e ir para a página inicial ScholarOne manuscritos da revista (<http://mc.manuscriptcentral.com/ahe>).

2. Faça o login ou clique na opção "Criar conta" se você for um usuário iniciante da ManuscriptCentral.

3. Se você estiver criando uma nova conta.

- Depois de clicar em "Criar Conta", digite seu nome e informações de e-mail e clique em "Avançar". Suas informações de e-mail são muito importantes.

- Introduza a sua instituição e informações de endereço conforme apropriado e clique em "Avançar".

- Introduza um ID de usuário e senha de sua escolha (recomendamos usar seu endereço de e-mail como seu ID de usuário) e, em seguida, escolha a sua área de especialização. Clique em "Concluir".

4. Se você tiver uma conta, mas esqueceu o seu login detalhes, acesse sua senha? Ajuda sobre a revistas sistema de submissão on-line (<http://mc.manuscriptcentral.com/ahe>) e digite o seu endereço de e-mail. O sistema enviará um ID de usuário automático e uma nova senha temporária.

5. Faça o login e selecione "Author Center".

Enviando seu Manuscrito

5. Depois de efetuar login, clique no link "Enviar um Manuscrito" na barra de menus.

6. Insira os dados e responda às perguntas conforme apropriado. Você pode copiar e colar diretamente de seu manuscrito e você pode carregar sua carta de apresentação pré-preparada.

7. Clique no botão "Next" em cada tela para salvar seu trabalho e avançar para a próxima tela.

8. Você é obrigado a carregar seus arquivos.

- Clique no botão "Procurar" e localize o arquivo no seu computador.

- Selecione a designação de cada arquivo no menu suspenso ao lado do botão Procurar.

- Depois de selecionar todos os arquivos que deseja carregar, clique no botão "Enviar arquivos".

9. Revise sua apresentação (em formato PDF) antes de enviá-la para o Diário.

Clique no botão "Enviar" quando terminar de analisar.

Você pode suspender um envio em qualquer fase antes de clicar no botão "Enviar" e salvá-lo para enviar mais tarde. Após o envio, você receberá um e-mail de

confirmação. Você também pode acessar Manuscript Central a qualquer momento para verificar o status de seu manuscrito. O Jornal irá informá-lo por e-mail, uma vez que uma decisão tenha sido tomada.

Os trabalhos devem ser enviados como Word (.doc, docx) ou RichTextFormat (.rft) arquivos (não protegido contra gravação) mais figura separada arquivos. Os arquivos GIF, JPEG, PICT ou Bitmap são aceitáveis para apresentação, mas somente os arquivos TIF ou EPS de alta resolução são adequados para impressão. Os arquivos serão automaticamente convertidos em um documento PDF no upload e serão usados para o processo de revisão. O arquivo de texto deve conter todo o manuscrito, incluindo página de título, resumo, texto, referências, tabelas e legendas de figuras, mas não há números embutidos. As tags de figura devem ser incluídas no arquivo. Os manuscritos devem ser formatados conforme descrito nas Diretrizes de Autor abaixo.

Os manuscritos revistos devem ser carregados dentro de 2 meses após a notificação dos autores da aceitação condicional, aguardando revisão satisfatória.

3. ORIENTAÇÕES ÉTICAS

Anatomia, Histologia, Embryologia adere às orientações éticas abaixo para publicação e pesquisa.

3.1. Autoria e Reconhecimentos autoria: Autores submeter um trabalho fazê-lo no entendimento de que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores e que todos os autores concordam com a submissão do manuscrito com o Journal. Todos os autores devem ter contribuído activamente para a concepção e concepção e / ou análise e interpretação dos dados e / ou a elaboração do documento e ALL deve ter analisado criticamente o seu conteúdo e aprovou a versão final submetida para publicação. A participação apenas na aquisição de financiamento ou na recolha de dados não justifica a autoria e, excepto no caso de investigação complexa de grande escala ou multicêntrica, o número de autores não deve exceder seis Anatomia, Histologia, Embryologia adere à definição de autoria criado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE). De acordo com o ICMJE, os critérios de autoria devem basear-se em 1) contribuições substanciais para a concepção e concepção ou aquisição de dados ou análise e interpretação de dados; 2) elaboração do artigo ou revisão crítica de conteúdo intelectual importante e 3) aprovação final de A versão a ser publicada. Os autores devem atender às condições 1, 2 e 3. É uma exigência que todos os autores foram credenciados conforme o caso, mediante a

apresentação do manuscrito. Os contribuintes que não se qualificam como autores devem ser mencionados em Agradecimentos.

Agradecimentos: Sob Agradecimentos especificar contribuintes para o artigo além dos autores credenciados. Inclua também as especificações da fonte de financiamento para o estudo e qualquer potencial conflito de interesses, se apropriado. Fornecedores de materiais devem ser nomeados e sua localização (cidade, estado / condado, país) incluído.

3.2. APROVAÇÕES ÉTICAS

Sujeitos experimentais: Em experimentos onde foram utilizados animais, os autores são convidados a dar detalhes completos sobre os animais (fonte, produção, isentos de agentes patogénicos, as condições convencionais, etc.) e sua manutenção (dieta padrão, ambiente, etc.). Quando os animais de experimentação são utilizados a seção de métodos deve indicar claramente que medidas adequadas foram tomadas para minimizar a dor ou desconforto. As experiências devem ser efectuadas de acordo com as orientações estabelecidas pelo National Institute of Health (NIH) nos EUA, relativas ao cuidado e utilização de animais para procedimentos experimentais ou à Directiva do Conselho das Comunidades Europeias de 24 de Novembro de 1986 (86/609 / CEE) e em conformidade com as leis e regulamentos locais.

Todos os estudos que utilizem sujeitos animais devem incluir uma declaração explícita na seção de Material e Métodos identificando a revisão e aprovação do comitê de ética para cada estudo, se aplicável. Os editores reservam-se o direito de rejeitar documentos se houver dúvida quanto à utilização de procedimentos apropriados.

3.3 Conflitos de Interesse e Fonte de Financiamento

Conflito de Interesse: Os autores são obrigados a divulgar qualquer possível conflito de interesses.

Estes incluem financeiros (por exemplo patente, propriedade, propriedade de ações, consultorias, taxa de orador). O conflito de interesses do autor (ou informação que especifique a ausência de conflitos de interesse) será publicado sob um título separado intitulado "Conflito de interesses".

Anatomia, Histologia, Embryologia exige que as fontes de apoio financeiro institucional, privada e corporativa para o trabalho dentro do manuscrito deve ser plenamente reconhecido, e quaisquer potenciais conflitos de interesse observou. A partir de 1 de março de 2007, esta informação será exigida para todos os manuscritos submetidos à Revista e será publicada em uma caixa destacada na página de rosto do

artigo. Inclua esta informação sob os títulos separados de "Fonte de Financiamento" e "Conflito de Interesses" no final do seu manuscrito.

Se o autor não incluir uma declaração de conflito de interesse no manuscrito, a seguinte declaração será incluída por padrão: "Nenhum conflito de interesse foi declarado".

Fonte de financiamento: Autores são obrigados a especificar a fonte de financiamento para suas pesquisas ao enviar um papel. Fornecedores de materiais devem ser nomeados e sua localização (cidade, estado / condado, país) incluído. As informações serão divulgadas no artigo publicado.

3.4 Recurso de decisão

A decisão em um papel é final e não pode ser objecto de recurso.

3,5 permissões

Se forem utilizados todos ou partes de ilustrações publicadas anteriormente, a permissão deve ser obtida do detentor dos direitos em causa. É da responsabilidade do autor obter estes por escrito e fornecer cópias para os editores.

3.6 Direitos autorais

Se o seu trabalho for aceito, o autor identificado como o autor correspondente formal para o trabalho receberá um e-mail solicitando-lhes para fazer login em Serviços de Autor; Onde através do WileyAuthorLicensing Service (WALS), eles serão capazes de completar o contrato de licença em nome de todos os autores no papel.

Para autores que assinam o acordo de transferência de direitos autorais Se a opção OnlineOpen não for seleccionado o autor correspondente será apresentado com o acordo de transferência de direitos autorais (CTA) para assinar. Os termos e condições da CTA podem ser visualizadas nas amostras associadas com as FAQ de direitos autorais abaixo:

Condições: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp~~number=plura

Para os autores escolhem OnlineOpen

Se a opção for seleccionada OnlineOpen O autor correspondente terá uma escolha dos seguintes Acordos de Acesso Aberto da CreativeCommonsLicense (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial OAA Licença

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs OAA License

Para visualizar os termos e condições destes acordos de acesso aberto por favor visite as FAQs de direitos de autor hospedados em Wiley Autor Serviços:

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp e

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

Se você selecionar a opção OnlineOpen e sua pesquisa é financiada pelo The WellcomeTrust e membros do Conselho de Pesquisa do Reino Unido (RCUK) ou do Fundo de Ciência austríaco (FWF), você terá a oportunidade de publicar seu artigo sob uma licença CC-BY Cumprir os requisitos do seu Funder. Para mais informações sobre esta política de auto-arquivamento compatível do Jornal visite políticas e: <http://www.wiley.com/go/funderstatement> .

4. ONLINE OPEN

OnlineOpen está disponível para autores de artigos de pesquisa primária que desejam disponibilizar seu artigo para não-assinantes na publicação, ou cuja agência de financiamento exige que os beneficiários arquivem a versão final do artigo. Com o OnlineOpen, o autor, a agência de financiamento do autor ou a instituição do autor paga uma taxa para garantir que o artigo seja disponibilizado a não-assinantes após a publicação via WileyInterScience, bem como depositado no arquivo preferencial da agência de financiamento. Para a lista completa dos termos e condições, consulte <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html> .

Quaisquer autores que desejam enviar o seu papel OnlineOpen será obrigado a preencher o formulário de pagamento disponíveis no nosso website em: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp . Antes da aceitação, não há necessidade de informar um Escritório Editorial que você pretende publicar seu papel OnlineOpen se você não desejar. Todos os artigos OnlineOpen são tratados da mesma forma que qualquer outro artigo. Eles passam pelo processo padrão de revisão por pares da revista e serão aceitos ou rejeitados com base em seus próprios méritos.

5. TIPOS DE MANUSCRITOS ACEITADOS

Artigos Originais: trabalhos originais não deve exceder 30 DIN A4 páginas datilografadas incluindo figuras, tabelas e referências. Resumos de trabalhos originais não devem exceder 1200 caracteres.

Comunicações Breves: comunicações curtas não deve exceder 5 DIN A4 páginas datilografadas incluindo figuras, tabelas e referências. Resumos de comunicações curtas não devem exceder 600 caracteres. Comunicações curtas podem ser priorizadas para publicação.

Comentários: Devido à sua natureza, os comentários não são limitados em tamanho, por si só, no entanto editores se reservam o direito de tê-los reduzido por brevidade durante a revisão.

6. FORMATO E ESTRUTURA DO MANUSCRITO

6.1. Formato

Idioma: O idioma de publicação é o Inglês. Autores para quem Inglês é uma segunda língua deve ter seu manuscrito profissionalmente editado por uma pessoa falando Inglês antes da submissão para se certificar de que o Inglês é de alta qualidade. É preferível que os manuscritos sejam editados profissionalmente. Uma lista de fornecedores independentes de serviços de edição podem ser encontradas em http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp Todos os serviços são pagos e organizados pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou Preferência para publicação.

Abreviaturas, símbolos e Nomenclatura: Todas as especificações de medição devem seguir o sistema SI. As concentrações da solução devem ser dadas em mol / l. Todas as outras concentrações devem ser dadas em% (volume ou peso). As abreviaturas de termos biológicos, químicos ou outros só devem ser utilizadas quando for certo que são internacionalmente conhecidas. O nome completo deve ser indicado entre parênteses quando uma abreviatura é usada pela primeira vez em um papel.

Nomes científicos: Todos os biológicos, químicos, médicos ou outros nomes devem ser dadas de acordo com a mais recente nomenclatura internacional. No caso de substâncias ou reagentes obtidos comercialmente, o nome e o endereço do fabricante ou fornecedor (como nota de rodapé) devem ser dados pela primeira vez que o produto é mencionado. Os produtos com marca registrada devem ser marcados com ©. Os nomes das bactérias devem estar de acordo com a edição a mais atrasada do manual de Bergey do bacteriologyDeterminative (Williams e Wilkins Co., Baltimore). Os vírus devem ser classificados e nomeados como recomendado pelo Comitê Internacional sobre a Nomenclatura de Vírus.

Font: Nomes de microrganismos e nomes zoológicos ou botânicos deve ser dada em itálico.

6.2. Estrutura

Todos os manuscritos submetidos à Anatomia, Histologia, Embryologia deve incluir: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências.

Título da página: As seguintes informações devem ser dadas na primeira página do manuscrito: o nome da instituição onde o trabalho foi realizado, o título do manuscrito, o nome do (s) autor (s), endereço (s) Do (s) autor (es), o endereço de e-mail do autor correspondente eo número de figuras e tabelas que acompanham o manuscrito.

Resumo: Resumos de artigos originais não deve exceder 1200 caracteres, e as de comunicações curtas não deve exceder 600 caracteres.

Otimizando o resumo dos mecanismos de pesquisa

Muitos estudantes e pesquisadores que procuram informações on-line usarão motores de busca como Google, Yahoo ou similar. Ao otimizar o seu artigo para os motores de busca, você vai aumentar a chance de alguém encontrá-lo. Isso, por sua vez, tornará mais provável que seja visto e / ou citado em outro trabalho. Reunimos essas diretrizes para que você possa maximizar a web de uso da parte mais pública do seu artigo.

6.3. Referências

Cada artigo original deve ter uma lista de referências que devem ser limitadas ao mínimo. As referências devem ser listadas alfabeticamente de acordo com o nome do primeiro autor.

Cada referência deve ser estruturada da seguinte forma: sobrenome do autor ou autor e iniciais do nome próprio; Ano de publicação (sem parênteses); Título do papel; Nome da revista; Número do volume (negrito); Números de página, por exemplo:

Gothe, R., Y. Gold e A. Kraiss, 1986: Sobre a validade subespecífica de *Rhipicephalusevertsimimeticus*DÖNitz, 1910. J. Vet. Med. B 33, 47-59.

Livros ou publicações separadas devem ser citados como segue:

Boch, J. e R. Supperer, 1977: Parasitologia Médica Veterinária. Paul Parey Editores Científicos, Berlim.

A referência à literatura citada no texto deve ser dada colocando o nome do autor (es) entre parênteses, com o ano de publicação, por exemplo: (Thein e Härtl, 1986).

O editor e publisher recomendam que a citação de artigos on-line publicados e outro material deve ser feito através de um DOI (Digital ObjectIdentifier), que todo o material publicado em linha respeitável deve ter - ver www.doi.org/ para mais informações. Se um autor cita qualquer coisa que não tem um DOI eles correm o risco de o material citado não ser rastreável.

Recomendamos o uso de uma ferramenta como o Gerenciador de referência para a gestão de referência e formatação.

Estilos de referência Reference Manager pode ser procurado aqui: www.refman.com/support/rmstyles.asp

6.4. Tabelas, figuras e figuras

O número eo tamanho das ilustrações e tabelas devem ser mantidos ao mínimo necessário.

Tabelas: As tabelas devem ser criados usando a função de tabela.

Figuras: Por favor, note que os números geralmente será reduzido para caber dentro da coluna de largura ou a área de impressão. Isto significa que a numeração e as letras devem ainda ser legíveis quando reduzidas (por exemplo mapas) e que a escala pode não corresponder com o original (imagens microscópicas), invalidando assim as referências à escala no texto. Estes números devem incluir uma barra cujo tamanho é definido na legenda da fotografia em causa. Se uma figura deve ser cortada, por favor, marque as linhas em uma fotocópia ou papel de rastreamento. As impressões devem ser feitas com uma laserprinter na resolução mais alta (> 600 dpi). Se a obra de arte deve ser digitalizada, desenhos de linha devem ser apenas desenhos de contorno sem tons (tons de cinza). Por favor, não use padrões; É possível a formação de manchas ásperas.

Gráficos com eixo x e y não devem ser incluídos em quadros; Apenas representações bidimensionais. Não se esqueça das etiquetas e das unidades.

Preparação de figuras eletrônicas para publicação

Embora as imagens de baixa qualidade sejam adequadas para fins de revisão, a publicação impressa requer imagens de alta qualidade para evitar que o produto final seja desfocado ou difuso. Envie arquivos EPS (linha de arte) ou TIFF (meio-tom / fotografias) apenas. MS PowerPoint e Word Graphics não são adequados para imagens impressas. Não use programas orientados a pixels. As digitalizações (TIFF apenas) devem ter uma resolução de pelo menos 300 dpi (meio-tom) ou 600 a 1200 dpi (desenhos de linha) em relação ao tamanho da reprodução (ver abaixo). Os arquivos EPS devem ser salvos com fontes incorporadas (e com uma visualização TIFF, se possível). Para imagens digitalizadas, a resolução de digitalização (no tamanho final da imagem) deve ser a seguinte para garantir uma boa reprodução: arte de linha:> 600 dpi; Meios-tons (incluindo fotografias em gel):> 300 dpi; Figuras contendo imagens de meio-tom e linha:> 600 dpi.

Mais informações podem ser obtidas no diretrizes de Wiley-Blackwell para figuras: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Verifique se o seu trabalho artístico eletrônico antes de enviá-lo: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissões: Se forem utilizados todos ou partes de ilustrações publicadas anteriormente, a permissão deve ser obtida do detentor dos direitos em causa. É da responsabilidade do autor obter estes por escrito e fornecer cópias para o editor.

Figura Legends: Legends para os números devem dar uma descrição precisa do conteúdo e não deve ser repetida dentro da figura.

Encargos Cor: Efetivos do volume de 2017, Anatomia, Histologia, Embryologia será publicado no formato online-only. Todas as imagens coloridas publicadas em 2017 serão reproduzidas digitalmente e publicadas gratuitamente.

Nota para os Beneficiários do NIH: De acordo com o mandato do NIH, Wiley-Blackwell publicará a versão aceita das contribuições escritas pelos bolsistas do NIH para o PubMed Central após a aceitação. Esta versão aceita será disponibilizada publicamente 12 meses após a publicação. Para mais informações, consulte www.wiley.com/go/nihmandate

7. APÓS A ACEITAÇÃO

Após a aceitação de um artigo para publicação, o manuscrito será encaminhado para o Editor de Produção, que é responsável pela produção da revista.

7.1 Prova de correções

O autor receberá um alerta de e-mail contendo um link para um site. Um endereço de e-mail de trabalho deve, portanto, ser fornecido para o autor correspondente. A prova pode ser baixada como um arquivo PDF (PortableDocumentFormat) a partir deste site.

O Acrobat Reader será necessário para ler este arquivo. Este software pode ser baixado (gratuitamente) no seguinte site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html.

Isso permitirá que o arquivo seja aberto, lido na tela e impresso para que qualquer correção seja adicionada. Outras instruções serão enviadas com a prova. As provas de cópia impressa serão enviadas se nenhum endereço de e-mail estiver disponível; Em sua ausência, providencie para que um colega acesse seu e-mail para recuperar as provas.

As provas devem ser devolvidas ao Editor de Produção dentro de três dias do recebimento. Alterações excessivas feitas pelo autor nas provas, excluindo erros de composição, serão cobradas separadamente. Exceto em circunstâncias excepcionais, todas as ilustrações são mantidas pelo editor. Observe que o autor é responsável por todas as declarações feitas em seu trabalho, incluindo as alterações feitas pelo editor de

cópia.

7.2 No início View (Publicação antes de sua emissão)

Anatomia, Histologia, Embryologia é coberta pelo serviço de vista adiantada de Wiley-Blackwell. Os artigos da EarlyView são artigos completos em texto integral publicados on-line antes da publicação em uma edição impressa. EarlyView artigos estão completos e final. Eles foram totalmente revistos, revisados e editados para publicação, e as correções finais dos autores foram incorporadas. Como eles estão na forma final, nenhuma alteração pode ser feita após a publicação on-line. A natureza dos artigos do EarlyView significa que eles ainda não têm números de volume, emissão ou página, portanto os artigos do EarlyView não podem ser citados da maneira tradicional. Eles são, portanto, dado um Digital Object Identifier (DOI), que permite que o artigo a ser citado e acompanhado antes de ser atribuído a um problema. Após a publicação do problema, o DOI permanece válido e pode continuar a ser usado para citar e acessar o artigo.

7.3 Autor Serviços

Rastreamento de produção on-line está disponível para o seu artigo através de Wiley-Blackwell Autor Services. Author Services permite aos autores rastrear seu artigo - uma vez que tenha sido aceito - através do processo de produção para publicação on-line e na imprensa. Os autores podem verificar o status de seus artigos on-line e optar por receber e-mails automatizados em fases-chave da produção. O autor receberá um e-mail com um link exclusivo que lhes permite registrar e ter seu artigo adicionado automaticamente ao sistema. Certifique-se de que um endereço de e-mail completo é fornecido ao enviar o manuscrito. Visite <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> para mais detalhes sobre rastreamento de produção on-line e para uma riqueza de recursos, incluindo FAQs e dicas sobre preparação artigo, submissão e mais.

7.4 Autor material Política de Arquivo

Por favor, note que a menos que especificamente solicitado, BlackwellPublishing irá dispor de todo o material impresso ou eletrônico apresentado dois meses após a publicação. Se você exigir a devolução de qualquer material enviado, informe a redação ou editor de produção o mais rápido possível.

7.5 separatas e cópias extras

de acesso gratuito à separata PDF final ou seu artigo estará disponível via apenas os serviços de autor. Por favor, inscreva-se para serviços de autor se você gostaria de

acessar o seu artigo PDF offprint e desfrutar de muitos outros benefícios do serviço oferece.

As impressões de papel adicionais podem ser encomendadas on-line. Por favor clique neste link de , preencha os detalhes necessários e garantir que você digitar informações em todos os campos obrigatórios. Se tiver dúvidas sobre separatas, envie um e-mail offprint@cosprinters.com

Última atualização: julho de 2016

ANEXO III
ARTIGO SUBMETIDO
ANATOMIA, HISTOLOGIA E EMBRYOLOGIA

Anatomia, Histologia, Embryologia



The skin structure in the Hegu Acupoint (Ig4) of the dog.
Plasticity of shape and function

Journal:	<i>Anatomia, Histologia, Embryologia</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Martins, Juliana; Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Morfologia e Anatomia Sousa, Olávio ; Universidade Federal de Campina Grande Silva, Ruthyanna ; Universidade Federal de Campina Grande Ladd, Fernando Wagner; Universidade Federal de São Paulo, Morfologia Albuquerque, Ana ; Universidade Federal de Campina Grande Menezes, Danilo José; UFCG, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária
Keywords:	Acupuncture, Acupoint Hegu, fibroblasts, collagen fibers, blood vessels
Abstract:	Due to the lack of data in the literature demonstrating the mechanism of action of acupuncture, this study aimed to evaluate the structures of the skin tissue in an attempt to determine structural differences that indicate the mechanism of acupuncture stimulation at IG4. Skin biopsies were collected from 10 healthy adult dogs from the Hegu acupoint (IG4) and outside the acupoint, processed for histology and evaluated by stereological methods, determining vessel surfaces, volumetric ratio of collagen fibers and density of fibroblast number. Density of vessel surface was 1.06mm ² in the acupoint and 1.05mm ² from the point, as well as respectively, the volume of collagen fibers 52.5% and 54.7%. The fibroblast density per acupoint IG4 (2.5x10 ⁴) mm ² and control (2.5x10 ⁴) mm ² , these results did not differ significantly in relation to the skin outside the acupoint (p> 0.05). Despite the use of stereology as a tool need to identify structures that may be involved in the mechanics of acupuncture, no differences were observed between the skin of the acupoint and outside it for the analyzed parameters, showing the need for more studies to prove the plasticity of the acupuncture mechanism of action.