



Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Estudo da Matriz Extracelular em Situações de Pressão Controlada

Aluno: Daniel Vasconcelos

Orientador: Mestre Dr. Eduardo Costa

Coorientador: Professor Doutor Silvério Cabrita

Coimbra, Julho 2016



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Estudo da Matriz Extracelular em Situações de Pressão Controlada

Trabalho submetido por
Daniel Vasconcelos
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Orientador: Mestre Dr. Eduardo Costa

Coorientador: Professor Doutor Silvério Cabrita

Coimbra, Julho 2016

Estudo da Matriz Extracelular em Situações de Pressão Controlada

Vasconcelos D, Costa E, Cabrita S

Afiliação de autores

Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de
Coimbra

Av. Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Portugal

Tel: +351 239 484 183

Fax: +351 239 402 910

Email: danielfvasco@hotmail.com

Agradecimentos

Ao Mestre Dr. Eduardo Costa, meu Orientador, pela disponibilidade, auxílio, tempo e dedicação na realização deste trabalho, dirigindo uma palavra de apreço e um sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Silvério Cabrita, meu Coorientador, por toda a visão e conhecimentos partilhados ao longo deste ano.

À minha colega Daniela Rodrigues pelo esclarecimento de dúvidas, ajuda e amizade.

Ao Engenheiro Ricardo Cabeças pela ajuda na análise estatística.

À minha família académica “Boi Marinho” pelo percurso partilhado durante o curso, independentemente dos obstáculos que apareceram.

A todos os meus amigos, colegas, professores e funcionários do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, pelo auxílio durante todo o percurso. Um especial agradecimento à minha binómia Ana Rita Fernandes, ao João Rosa e à Lara Costa.

À minha família pelo esforço e apoio incondicional desde sempre, sem o qual os últimos 5 anos teriam sido impensáveis.

A todos um bem-haja.

Índice

Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
Introdução	1
Objetivos.....	12
Materiais e Métodos	13
Resultados	16
Discussão	19
Conclusão.....	20
Bibliografia.....	21

Índice de Figuras

Figura 1 - Tecido Conjuntivo Laxo	2
Figura 2 - Feixe de fibras colagénicas.....	3
Figura 3 - Fibras de reticulina	4
Figura 4 - Fibras elásticas.....	5
Figura 5 - Plasmócito e feixes de fibras colagénicas	6
Figura 6 - Tecido conjuntivo do adulto e fibroblasto.....	7
Figura 7 - Pele estirada observada durante preensão da agulha	8
Figura 8 - Resposta ativa dos fibroblastos à rotação da agulha.....	10
Figura 9 - Uma agulha de acupuntura inserida na parede abdominal de ratos.....	10
Figura 10 - Equação 1 e 2.....	14
Figura 11 - Equação 3	14
Figura 12 - Puntura efetuada no membro posterior direito.....	15
Figura 13 - Recolha da amostra.....	15
Figura 14 - Adipócitos presentes no grupo controlo por classes.....	17
Figura 15 - Adipócitos presentes no grupo teste por classes.....	17
Figura 16 - Comparação entre o grupo controlo e teste	18
Figura 17 - Comparação entre o grupo controlo e teste	18

Índice de Tabelas

Tabela I - Modelo proposto dos efeitos fisiológicos.....	9
--	---

Resumo

No tecido conjuntivo, os fibroblastos encontram-se protegidos do stress pela matriz extracelular e não estão normalmente sujeitos a forças mecânicas(1). No entanto, descobertas recentes apontam para que estes estejam expostos a mais forças mecânicas do que era previamente reconhecido(1). Foi demonstrado que a preensão da agulha antes atribuída à contração do músculo-esquelético é devido ao tecido conjuntivo(4, 6, 7). Técnicas como a acupuntura poderão atuar para além da via neuronal, exercendo o seu efeito sobre o tecido conjuntivo, onde se podem encontrar fibras nervosas aferentes(7). Estas alterações no tecido conjuntivo poderão ser duradouras, o que poderá explicar os efeitos prolongados desta terapia. Este trabalho tem como objetivo o estudo e análise morfométrica dos fibroblastos e adipócitos, em situações de pressão controlada (acupuntura). Sendo um estudo prévio, espera-se com a nossa amostra analisar os fibroblastos e adipócitos quanto à sua área, perímetro, orientação, disposição, angulação, densidade. Para tal, 16 murganhos, *Balb-C*, fêmeas e machos com 8 semanas foram distribuídos de maneira randomizada. Em todos os animais foi feita a puntura no membro posterior direito com uma agulha inserida perpendicularmente ao músculo, durante 15 minutos, enquanto que o membro posterior esquerdo serviu como grupo controlo no qual não foi realizado qualquer procedimento. Os animais foram sacrificados após 24 horas e os resultados permitem-nos concluir desde já que existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, havendo alterações morfométricas ao nível dos adipócitos quando os tecidos são submetidos a situações de pressão controlada. Estas poderão ser explicadas pelas alterações induzidas ao nível da membrana basal e da estrutura do citoesqueleto pela acupuntura.

Palavras-chave: tecido conjuntivo, acupuntura, fibroblastos, adipócitos, morfometria.

Abstract

In connective tissue, fibroblasts are protected from stress by the ground substance and are not usually submitted to mechanical forces(1). However, recent discoveries point out that they are exposed to more mechanical forces that we could imagined(1). It was demonstrated that the winding of the needle is due to the connective tissue instead of de muscle(4, 6, 7). Some techniques such as acupuncture could act by neuronal pathways, affecting the connective tissue, where we can find the afferent nerve fibers(7). This changes on the connective tissue could be noticed even after long periods of time, which can explain the therapeutically effects at long-term. The objectives of this work are the morphometric study of the fibroblasts and the adipocytes in situations such as acupuncture. Being a previous study about the matter, we hope that our sample allow us to analyze the fibroblasts and adipocytes about some parameters such as area, perimeter, orientation, angle, disposition, angulation and density. Bearing that in mind, 16 mice, *Balb-C*, females and males with 8 weeks were distributed randomly. Every animal was punctured in the posterior right leg with a needle perpendicularly to the muscle, for 15 minutes, while the other leg served as control group. The animals were sacrificed 24 hours later and the results allow us to conclude that there are significant differences between the two groups, with alterations in morphometry in the adipocytes when the tissue was submitted to controlled pressure. These can be explained with the alterations induced in basal lamina and in the structure of the cytoskeleton by acupuncture.

Key-words: connective tissue, acupuncture, fibroblasts, adipocytes, morphometry.

Introdução

O tecido conjuntivo é tradicionalmente definido como um tecido passivo cuja função principal é suportar as estruturas corporais(1). Adicionalmente apresenta diversas funções dentro das quais(2):

- Suporte dos outros tecidos básicos através do estroma e do parênquima dos órgãos, desempenhando funções de suporte mecânico e metabólica aos tecidos envolventes;
- Acondicionamento de tecidos e órgãos, preenchendo espaços e interstícios;
- Armazenamento de lípidos, funcionando com isolador térmico e reserva energética;
- Proteção através dos mecanismos de defesa imunológica do organismo;
- Participação indispensável nos processos de regeneração dos tecidos e órgãos após a agressão.
- Plataforma para a troca de nutrientes e produtos da degradação metabólica.

Este tecido pode ser classificado em vários subtipos incluindo(2):

- **Tecido conjuntivo laxo** – Número de células reduzido numa substância fundamental abundante e com poucas fibras de orientação irregular, sendo pouco sujeitas a forças de tensão e tração, equiparável ao que se observa no tecido conjuntivo subjacente às superfícies epiteliais das mucosas (Figura 1).
- **Tecido conjuntivo reticular** – Caracteriza-se por fibras reticulares, sendo estas a maior parte do componente fibroso, constituídas por colagénio do tipo III e apresenta células de forma estrelada com finos prolongamentos. Pode ser observado no estroma da medula óssea, do timo, do baço e dos gânglios linfáticos.
- **Tecido conjuntivo mucoso** (geleia de Wharton) – variante pouco comum no adulto, possui grande quantidade de substância fundamental que é rica em ácido hialurónico, apresenta poucos fibroblastos de forma estrelada, com poucas e finas fibras colagénicas. Este é frequente no embrião, sendo o componente principal do cordão umbilical.
- **Tecido conjuntivo denso irregular** – Caracteriza-se por poucas células e muitas fibras colagénicas, sendo este o seu componente principal. Os feixes de fibras colagénicas são espessos e apresentam uma orientação errática, deixando pouco espaço entre as células e a substância fundamental. Tal pode

ser observado na derme, na cápsula da maioria dos órgãos, túnica albugínea do testículo e dura-máter.

- **Tecido conjuntivo denso regular** – assim como no anterior, existem poucas células e substância fundamental, sendo que as fibras colagénicas estão orientadas paralelamente e justapostas. Pode ser observado nos tendões.

Existem ainda outras variedades de tecido conjuntivo com funções especiais: tecido adiposo, cartilágíneo, ósseo, hemapoietico e o sangue.

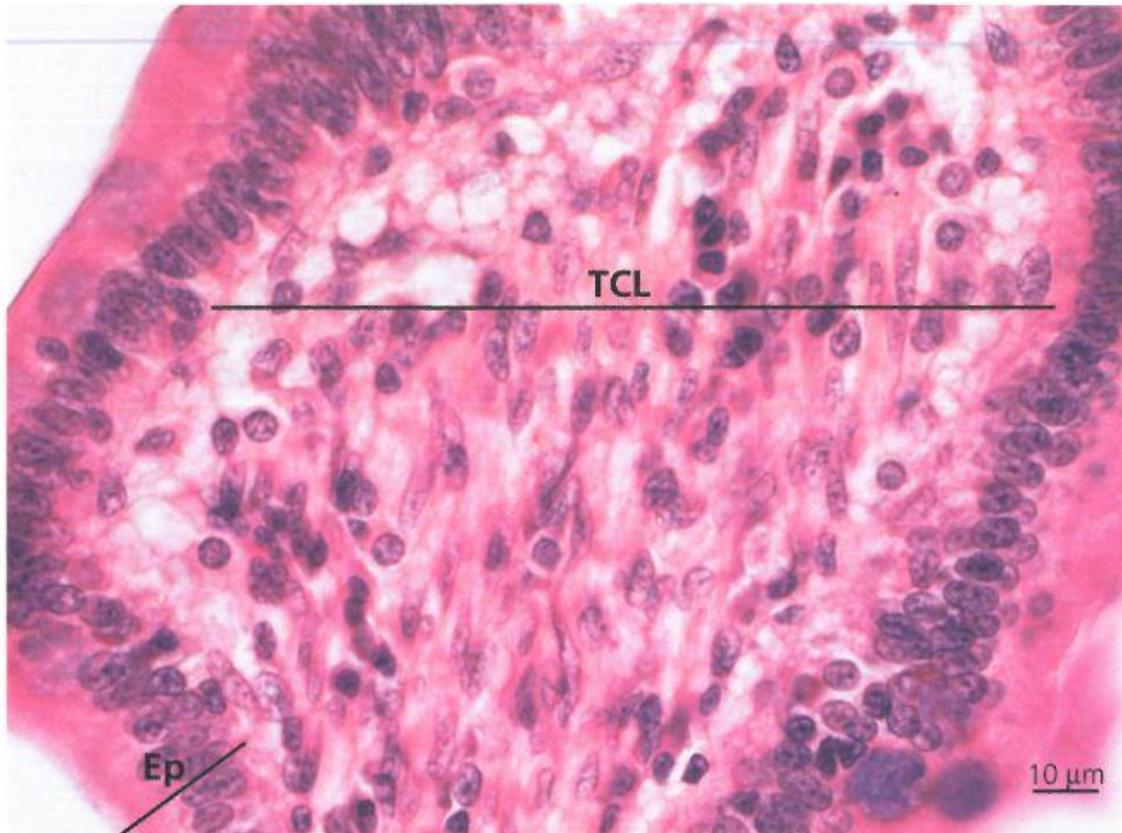


Figura 1 - Tecido Conjuntivo Laxo – Eixo conjuntivo (TCL) da vilosidade intestinal. À superfície é visível o epitélio cilíndrico simples (EP) Hematoxilina-Eosina(2)

As células do tecido conjuntivo encontram-se separadas por uma quantidade de abundante de matriz extracelular(2). A matriz extracelular é constituída por quantidades variáveis de água, fibras (colagénicas, elásticas e reticulares), glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas como a fibronectina e a laminina(2). Microscopicamente o tecido conjuntivo apresenta-se como uma entidade amorfa, que se designa por substância fundamental(2).

Relativamente às fibras existem três tipos de fibras: fibras colagénicas, fibras reticulares e fibras elásticas(14).

O colagénio é o maior componente fibroso do tecido conjuntivo, além disso forma as “fibras brancas” do tecido conjuntivo laxo e é o componente maioritário de tendões, ligamentos, osso e do estroma na córnea(14). As fibras colagénicas (figura 2) possuem resistência à tração equivalente a cabos de aço, sendo formados por tropocolagénio, fibras e fibrilhas colagénicas originando feixes altamente flexíveis(14).

Em relação à sua síntese o colagénio é sintetizado e segregado primariamente pelos fibroblastos, no entanto, existem outras células com essa capacidade como as células epiteliais, células de *Schwann* e células musculares(14). Quanto à síntese de procolagénio este, precursor do colagénio, é sintetizado dentro da célula e quando é libertado para a matriz extracelular convertido em tropocolagénio(14). Este é formado através da procolagénio peptidase que “corta” porções da molécula convertendo-a no produto final(14). Por último temos a formação das fibrilhas paralelas resultando na agregação e concentração do tropocolagénio(14).

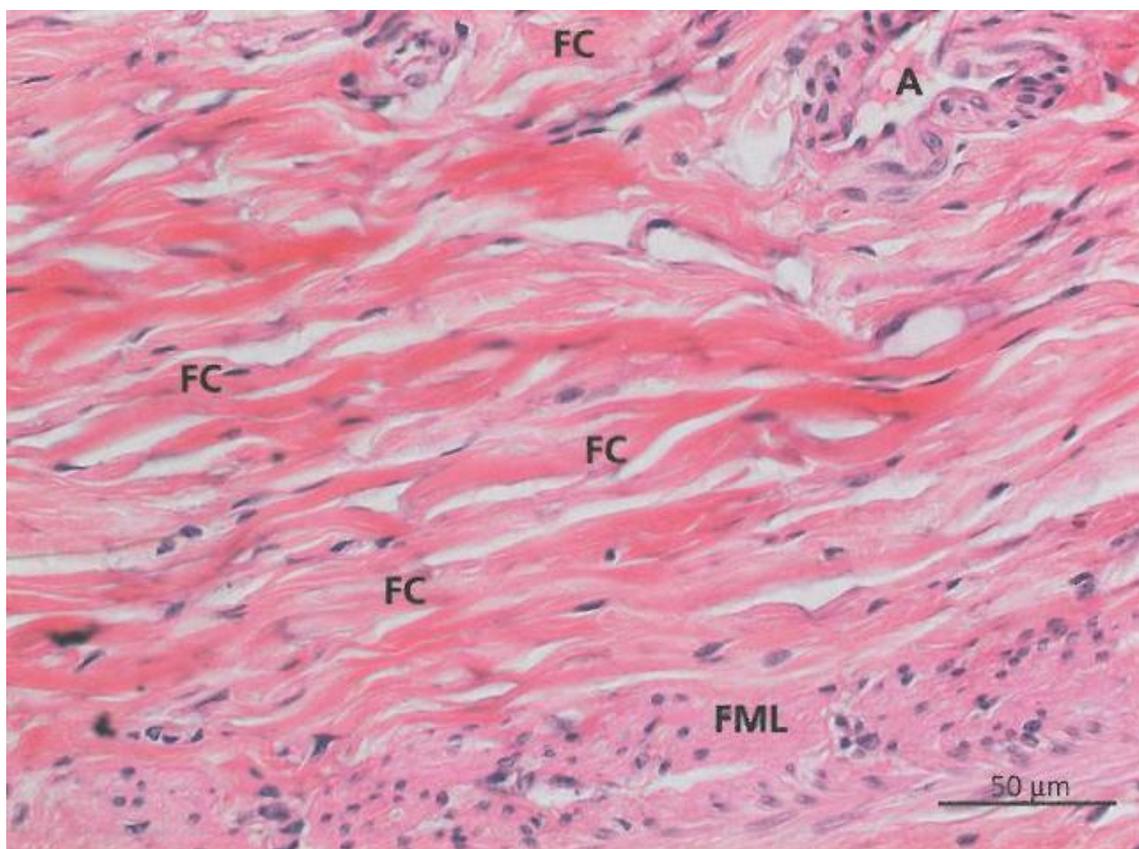


Figura 2 - Feixe de fibras colagénicas (FC) na submucosa intestinal. Pode também observar-se fibras musculares lisas (FML) e uma pequena artéria muscular (A)(2)

Os tipos de fibras mais frequentemente reconhecidos em lâminas histológicas são(14):

- **Tipo I** – o tipo de colagénio mais prevalente, existindo no tecido conjuntivo laxo e no tecido conjuntivo denso. É o maior componente colagénico do osso, tendões, dentina e pele. Geralmente existem sob a forma de grandes fibras colagénicas.
- **Tipos II** – existem como fibras muito finas.
- **Tipo III** – consiste em três cadeias idênticas alfa 1. Exceto por serem escassas no osso e nos tendões, têm a mesma distribuição do que o colagénio tipo I.
- **Tipo IV** – não forma feixes de fibrilhas, é o constituinte maioritário da lâmina basal e forma uma rede não-fibrilhar que garante a coesão estrutural para a lâmina basal e externa.

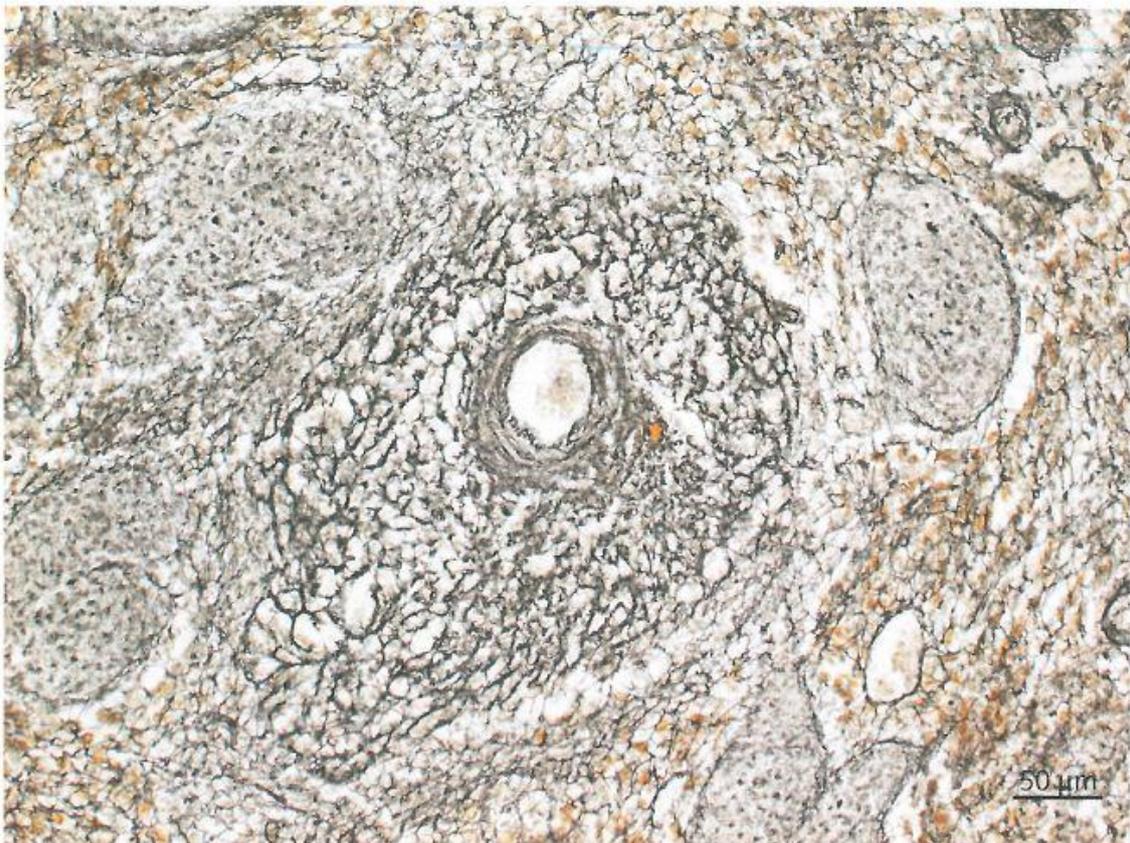


Figura 3 - Fibras de reticulina (Baço). Estas fibras correspondem a colagénio de tipo III, são extremamente finas, formando uma extensa rede, que constitui o estroma de diversos órgãos. Prata amoniacal(2)

No que diz respeito às fibras reticulares (figura 3) estas providenciam suporte estrutural para os diversos tecidos e órgãos, como fibras musculares, nervos, vasos sanguíneos bem como sob a lâmina basal epitelial e também formam a estrutura de órgãos hematopoiéticos e linfáticos, exceto o timo(14). As fibras reticulares são compostas por colagénio tipo III, sendo as fibras de menor diâmetro no tecido conjuntivo(14). Estas são sintetizadas por diversas células do nosso organismo, como

os fibroblastos, as células reticulares, as células de *Schwann* e as células musculares(14).

Relativamente às fibras elásticas (figura 4) estas garantem o mecanismo estrutural que permite aos tecidos a capacidade de responder às forças de extensão e distensão(14). Denominadas como “fibras amarelas” do tecido conjuntivo, apresentam-se como a componente major das paredes arteriais, ligamentos, bronquíolos e pele(14). As fibras elásticas são tipicamente mais estreitas que as fibras colagénicas e organizam-se num padrão em ramo, formando uma estrutura tridimensional(14). Encontram-se entrelaçadas com fibras colagénicas, limitando a distensão e, conseqüentemente, previnem a rutura dos tecidos(14). Estas fibras são sintetizadas por fibroblastos e células musculares, sendo constituídas por dois elementos, as microfibrilhas e a elastina, sendo esta última sintetizada pela mesma via que o colagénio(14).

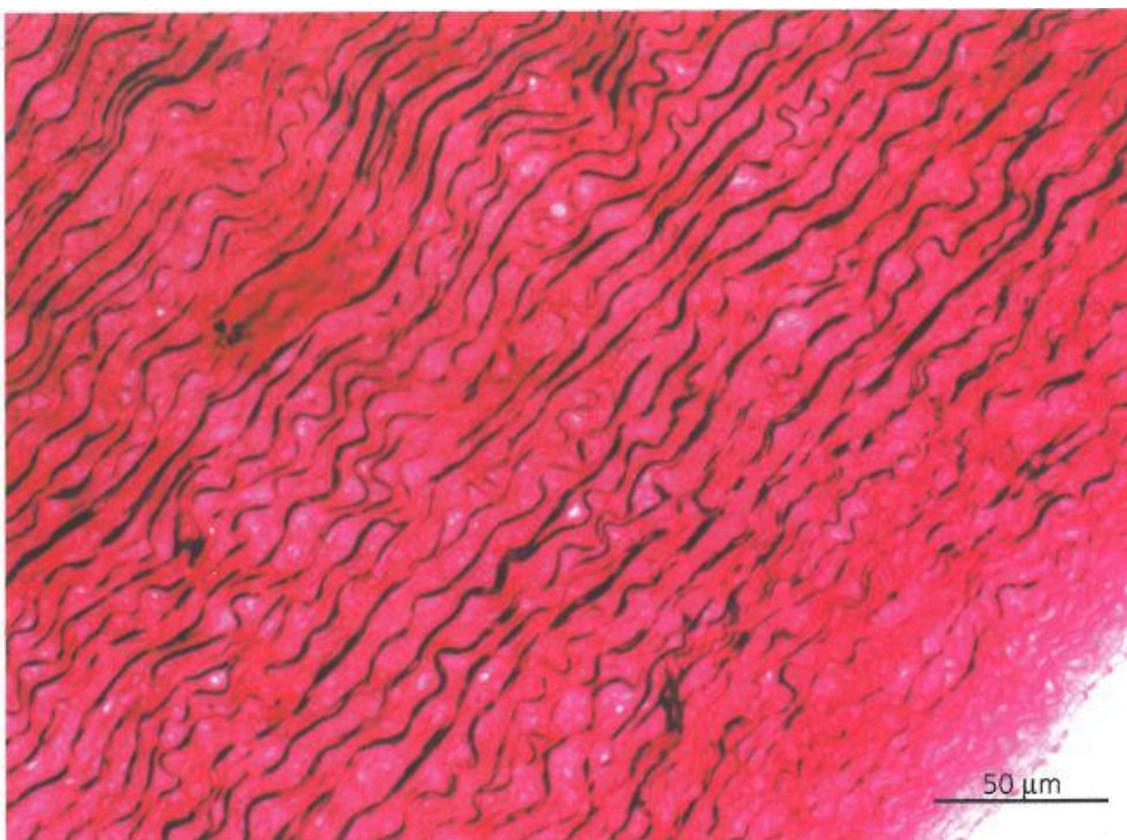


Figura 4 - Fibras elásticas. Parede da aorta. As fibras elásticas estão coradas a negro. *Verhoeff*(2)

Para finalizar, é de referir a substância fundamental que ocupa o espaço não preenchido pelas células e fibras(14). Esta substância é viscosa, sendo maioritariamente constituída por água, bem como glicosaminoglicanos, proteoglicanos, ácido hialurónico e glicoproteínas(14). A substância fundamental pode variar quanto à composição e à densidade, dependendo da organização molecular das macromoléculas e da quantidade de fluído presente no tecido(14). O aumento da concentração de

macromoléculas específicas pode alterar a densidade, rigidez e permeabilidade do tecido conjuntivo, como acontece na cartilagem e nos ossos(14).

No tecido conjuntivo estão presentes diversas células que podem ser divididas em dois grupos: as células residentes ou fixas e as transitórias ou móveis(2)(14).

As células transitórias migram a partir do sangue circulante, como os macrófagos, os neutrófilos, os eosinófilos, os linfócitos, os plasmócitos e os mastócitos (estes últimos são de proveniência controversa)(2). Os macrófagos são células fagocitárias e quando se encontram no tecido conjuntivo podem ser denominados por histócitos(14). Estes derivam de células precursoras na medula óssea que se diferenciaram inicialmente em monócitos(14). Geralmente os mastócitos são encontrados junto aos vasos sanguíneos, sendo semelhantes aos basófilos do sangue(14). Os adipócitos são células especializadas no armazenamento de triglicerídeos e podem estar presentes em grande número no tecido conjuntivo laxo(14). Existem outras células transitórias, tais como os linfócitos, plasmócitos (Figura 5), neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e células mesenquimatosas indiferenciadas(14).



Figura 5 - Plasmócito (seta) na pele, na junção da derme com a hipoderme. Observa-se também um capilar (C) e feixes de fibras colagênicas (FC). Hematoxilina-Eosina(2)

Células residentes são relativamente estáveis, sendo componentes da matriz extracelular (2), não exibindo grandes movimentos permanecendo assim no tecido(14). Dentro das células residentes existem os fibroblastos (Figura 6) que são originários das células mesenquimatosas do embrião, tendo a capacidade de segregar componentes fibrosos assim como a matriz extracelular(14).

No tecido conjuntivo, os fibroblastos encontram-se protegidos do stress pela matriz extracelular e não estão normalmente sujeitos a forças mecânicas(1). No entanto, descobertas recentes apontam para que estes estejam expostos a mais forças mecânicas do que era previamente reconhecido(1).

Assim sendo, forças aplicadas através da fisioterapia, massagem e/ou acupuntura poderão ter influência sobre estas células(3). Deste modo emergiu uma nova maneira de ver estas terapêuticas, em que efeitos bioquímicos derivam de estímulos mecânicos

no tecido conjuntivo, potenciando os mesmos ao longo da rede deste tecido, podendo assim explicar cientificamente o seu efeito terapêutico(4).

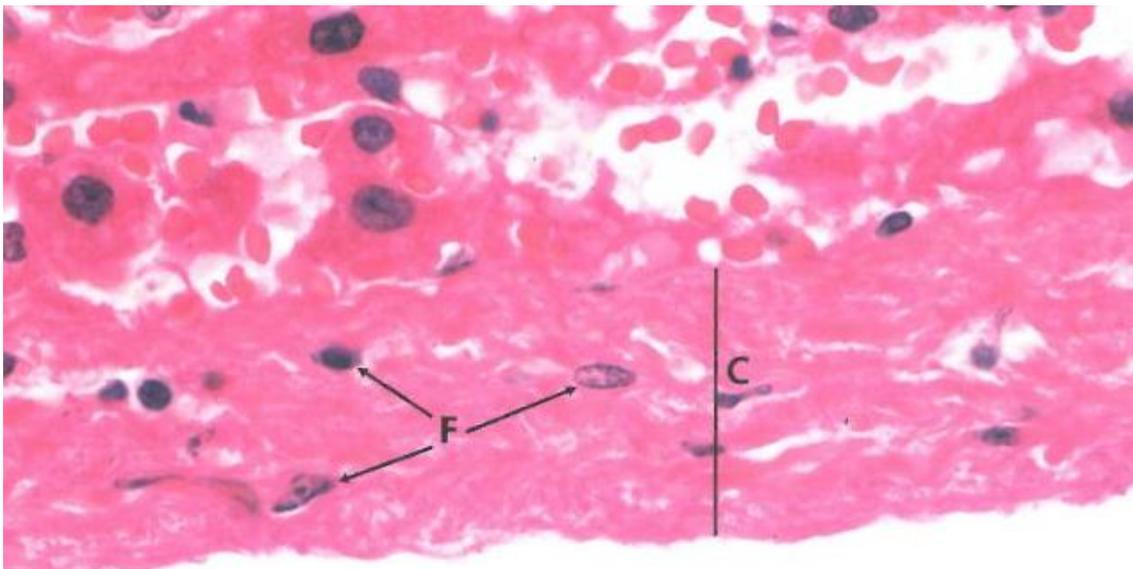


Figura 6 - Tecido conjuntivo do adulto – Cápsula do Fígado (C) e fibroblasto (F). Podem observar-se os feixes espessos de fibras colagénicas. (2)

A acupuntura é uma terapêutica complexa usada há mais de 2000 anos na China, sendo incrivelmente popular na sociedade ocidental como terapia para a dor e algumas desordens crônicas difíceis de tratar com outras terapêuticas(4-7). Contudo existem muitos aspetos fundamentais por esclarecer sobre esta terapêutica(5). Assim o conhecimento destes mecanismos é essencial para compreender a mesma e para a comprovar cientificamente, conhecendo detalhadamente os fenómenos fisiológicos(5).

De acordo com a medicina tradicional chinesa, a acupuntura realiza-se em pontos específicos com efeitos terapêuticos que se acreditam ocorrer tanto localmente como à distância através dos meridianos(4-6).

Um modelo explicativo sobre o efeito da acupuntura foi proposto(4, 8):

- A manipulação da agulha de acupuntura causa estimulação mecânica do tecido conjuntivo;
- Uma rede formada por tecido conjuntivo intersticial e laxo corresponde à rede de meridianos.

Geralmente a acupuntura envolve manipulação da mesma, com rotação e/ou movimentos de vai e volta(4, 5, 9, 10). Esta poderá ser breve, prolongada ou intermitente dependendo da situação clínica(5, 9). A manipulação é utilizada para induzir uma reação característica conhecida como *de qi*. (5, 7, 9, 11). *De qi* tem uma componente sensorial que o paciente descreve como dor ou peso na área circundante e uma componente biomecânica percebida pelo operador(5, 7, 9). Refere-se a esta sensação como prensão da agulha(4, 5,



Figura 7 - Pele estirada observada durante prensão da agulha. Uso de uma agulha de acupuntura (*Seirin*; 0,25mm de diâmetro) no braço de um voluntário (4)

7-9, 11). Durante o mesmo, existe um aumento da resistência dos tecidos, sendo descrito como “um peixe a morder o anzol”(4, 5, 8, 9, 11). Este poderá ser sutil ou muito forte, chegando mesmo a estirar a pele ao retirar a agulha (Figura 7)(5, 9). Durante os tratamentos o *de qi* é usado como *feedback* para confirmar o uso adequado de estimulação com a agulha(5, 9).

Foi demonstrado que a prensão da agulha, antes atribuída à contração do músculo-esquelético, é devido ao tecido conjuntivo(4, 6, 7). Tanto em vivo como em vitro foi demonstrado que, durante a rotação da agulha, o tecido conjuntivo acopla-se em volta da mesma criando uma ligação mecânica entre a agulha e o tecido(3, 4, 6, 12).

Existe uma correspondência anatômica entre os pontos de acupuntura e os meridianos em relação aos planos de tecido conjuntivo presentes no braço sugerindo explicações fisiológicas plausíveis para a importância da medicina tradicional chinesa(6, 8). Assim é proposto que a manipulação da agulha produza alterações celulares que se propagam ao longo do tecido conjuntivo(6). Estes efeitos ocorrem independentemente do local onde a agulha é inserida, no entanto, são aumentados quando a agulha é colocada nos pontos de acupuntura(4, 6, 7). Isto é deve-se ao alinhamento das fibras de colagênio, levando a uma mais eficaz transdução e propagação do sinal nestes pontos(6). A prensão da agulha poderá ser ligeiramente maior nos pontos de acupuntura já que esta é inserida numa maior quantidade de tecido conjuntivo nestes pontos(7).

O tecido conjuntivo forma uma rede contínua ao longo do corpo(3, 7). Esta rede é contínua com a derme, separando os músculos, ossos e tendões, possuindo uma grande variedade de mecanorreceptores e nociceptores(7). Técnicas como a acupuntura poderão atuar para além da via neuronal, exercendo o seu efeito sobre o tecido conjuntivo, onde se podem encontrar fibras nervosas aferentes(7). Estas alterações neste tecido poderão ser duradouras, o que poderá explicar os efeitos prolongados desta terapia (Tabela 1).

A transdução mecânica é a habilidade das células de perceber e interpretar bioquimicamente estas forças, tendo um papel fundamental na transdução de sinais e na função celular(3).

Tabela I - Modelo proposto dos efeitos fisiológicos percebidos na acupuntura: (6)

<u>Conceitos tradicionais chineses</u>	<u>Equivalentes anatómicos/fisiológicos propostos</u>
Meridianos de acupuntura	Planos no tecido conjuntivo
Pontos de acupuntura	Convergência de planos do tecido conjuntivo
<i>Qi</i>	Soma de todos os fenómenos energéticos corporais
Meridiano <i>qi</i>	Sinal bioquímico/bioelétrico do tecido conjuntivo
Bloqueio do <i>qi</i>	Composição da matriz do tecido conjuntivo alterado levando a uma transdução alterada do sinal
<i>De qi</i>	Estimulação dos mecanorreceptores do tecido conjuntivo
Propagação da sensação <i>de qi</i>	Área de contração do tecido conjuntivo e estimulação de mecanorreceptores ao longo dos planos do tecido conjuntivo
Restauração do fluxo do <i>qi</i>	Ativação da expressão celular/génica levando à restauração da composição da matriz do tecido conjuntivo e transdução do sinal

Acredita-se hoje que os efeitos da acupuntura ocorrem essencialmente através do sistema nervoso(5). Além do sistema nervoso interessa compreender o papel do tecido conjuntivo, que poderá explicar os efeitos a longo prazo da acupuntura. Estes efeitos(5) poderão ser importantes devido a:

- Estabelecimento de um mecanismo que estabelece a relação entre a acupuntura e o seu efeito terapêutico,
- Fornecer marcadores biológicos do efeito da acupuntura para posteriormente serem usados em ensaios clínicos,

- Compreender o papel do tecido conjuntivo em patologias associadas com síndromes onde a dor crônica está presente.

A manipulação da agulha poderá causar a estimulação de diversos mecanorreceptores sensoriais e nociceptores. Este efeito(5) têm importância devido a:

- A deformação do tecido conjuntivo pode não ser restrita à área da agulha, alargando-se ao longo dos planos intersticiais do tecido conjuntivo;
- Uma cascata de ativação de recetores sensoriais que ocorra durante segundos a minutos poderá ser seguida de um sinal mecânico afastado do local de entrada da agulha;
- Uma segunda cascata de ativação celular, seguida de alteração da expressão génica, síntese proteica e alterações da matriz extracelular, após horas ou dias;
- A estimulação subsequente dos recetores sensoriais por movimentos corporais pode ser modelada por esta sequência de eventos.

A manipulação da agulha induz a remodelação do citoesqueleto pelos fibroblastos (figura 8), o tipo de célula mais predominante no tecido conjuntivo laxo, suportada pela hipótese de que a deformação do tecido, devido a estímulos mecânicos, estimula os fibroblastos, resultando num efeito de mecanotransdução que pode contribuir para os efeitos terapêuticos(11). Desta forma, o citoesqueleto surge como um elemento estrutural chave permitindo a transmissão de forças mecânicas externas aplicadas às células e à conversão destas forças em respostas bioquímicas(12).

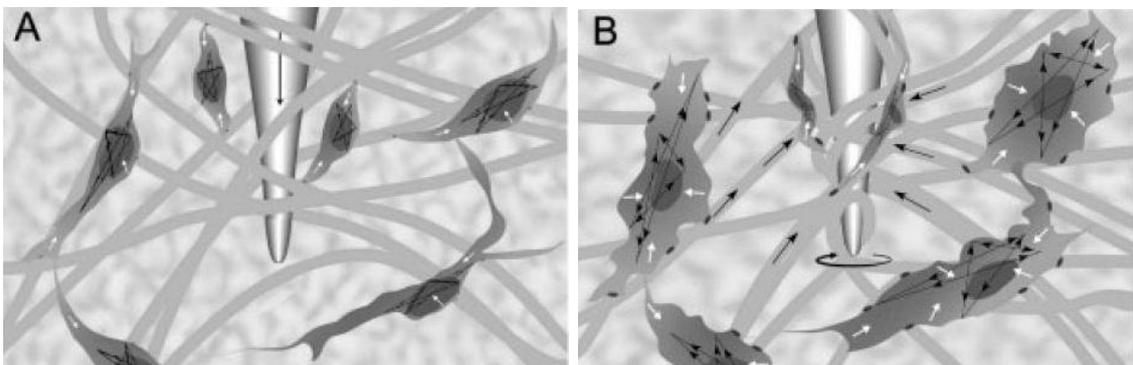


Figura 8 - Ilustração representando a resposta ativa dos fibroblastos à rotação da agulha. Após rotação da agulha os fibroblastos respondem com alteração da forma tornando-se maiores (B), contrastando com uma morfologia dendrítica obtida sem manipulação da agulha(12).

A sua plasticidade e capacidade de resposta mecânica são a chave para a regulação intracelular de proteínas como as *Rho GTPases*, sendo a forma básica de transdução mecânica(12). Este efeito requer a contractibilidade da actinmiosina bem como do *Rho* e *Rac*, duas moléculas sinalizadoras conhecidas por estarem envolvidas na regulação do citoesqueleto, podendo ser provocadas pela acupuntura(1, 10).

Foi demonstrado laboratorialmente que a forma das células e a remodelação do citoesqueleto são as componentes chave para as respostas de transdução mecânica, estando ligadas a eventos como a transcrição genética, produção de matriz extracelular e dinâmicas de adesão celular(10). Então, a estimulação mecânica dos fibroblastos poderá ter efeitos importantes, duradouros e extensos no tecido conjuntivo(10).

Após alguns minutos irá ocorrer uma resposta celular ativa no tecido conjuntivo com resposta dos fibroblastos até alguns centímetros de distância da agulha(8, 10). Esta resposta celular consiste na ativação da reorganização do citoesqueleto promovendo o distanciamento das células(10).

Os fibroblastos respondem rapidamente ao esticar dos tecidos (em minutos) com alterações ativas, dinâmicas e reversíveis (Figura 9)(12). O tecido conjuntivo laxo poderá responder ativamente e rapidamente às diferentes forças exercidas sobre os tecidos(12). Entender estes mecanismos é de extrema importância para estabelecer e compreender a sua função fisiológica(12).

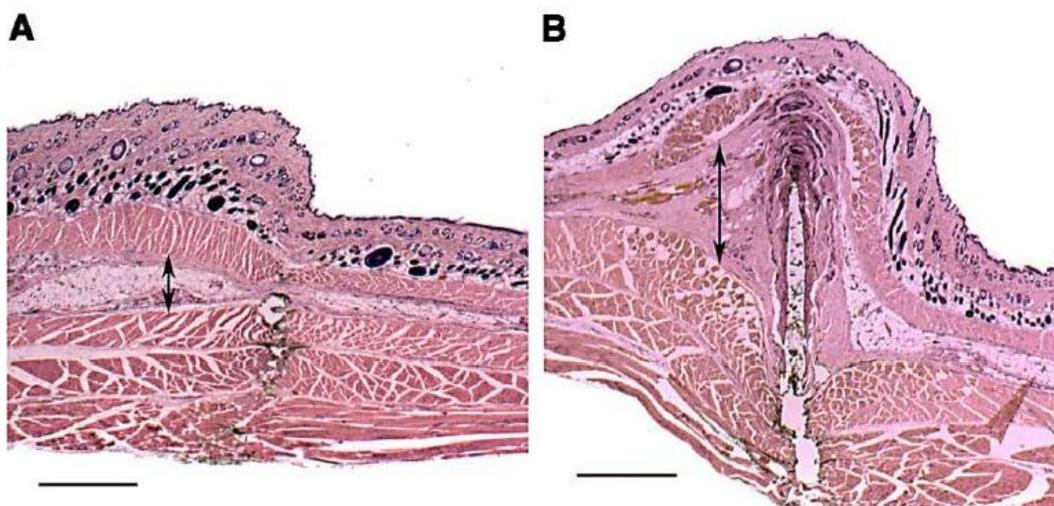


Figura 9 - Uma agulha de acupuntura foi inserida na parede abdominal de ratos anestesiados, sem manipulação (A) e com rotação unidirecional (B). (7)

Independentemente do alastramento dos fibroblastos ser causado pelo torque ou pelo estiramento cíclico dos tecidos, foi demonstrado que existe diferenças subtis entre as diferentes técnicas de manipulação das agulhas podendo afetar e gerar diferentes respostas celulares dentro do tecido conjuntivo(10).

Tanto a rotação unidirecional como bidirecional da agulha pode induzir uma ativação da resposta do citoesqueleto em fibroblastos presentes no tecido subcutâneo em ratos(10). Para maximizar a resposta dos tecidos não basta somente aumentar o número de rotações, mas combinar diferentes ampliações e número de ciclos(10). Após alguma rotação o tecido conjuntivo prende-se à volta da agulha(10). Mais rotação irá

fazer com que mais tecido se envolva em torno da agulha, formando um “remoinho” e presumivelmente aumentar a estimulação mecânica sobre o tecido(10).

Da perspectiva terapêutica, se a aposição das fibras em torno da agulha desempenha um papel importante então os parâmetros que afetam a mesma alterarão a resposta terapêutica(11). Composição da matriz, densidade, rigidez e a espessura do tecido são alguns dos parâmetros que poderão afetar a mecânica destes. Identificar relações entre estas propriedades é complicado(11). Por exemplo, sabe-se que o conteúdo de colagénio na pele é variável com a localização, tipo de tecido e espessura do mesmo(11). Adicionalmente deverá ter sido em conta que o conteúdo em colagénio reduz com a idade, potencialmente devido à ligação cruzada de colagénio e espessura do tecido conjuntivo subcutâneo(11).

Durante o tratamento, a preensão da agulha é um marcador sensorial para perceber uma adequada manipulação da agulha(11). Estudos recentes sugerem que a preensão da agulha ocorre quando as fibras de colagénio no tecido conjuntivo subcutâneo acoplam e se fixam em torno da agulha, impondo um *stress* local nos tecidos circundantes(11).

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo o estudo morfométrico dos fibroblastos, assim como dos adipócitos, em situações de pressão controlada (acupuntura). Sendo um estudo prévio, espera-se com a nossa amostra analisar os fibroblastos e adipócitos quanto à sua área, perímetro, orientação, disposição, angulação e densidade.

Materiais e Métodos

16 murganhos, *Balb-C*, fêmeas e machos com 8 semanas foram distribuídos de maneira randomizada. Todos os animais foram sujeitos a puntura no membro posterior direito com uma agulha inserida perpendicularmente ao músculo, durante 15 minutos (grupo teste, figura 12), enquanto que o membro posterior esquerdo serviu como grupo controle no qual não foi realizado qualquer procedimento. Todos os animais tiveram acesso a água e a comida *ad libitum*.

Todos os animais foram sacrificados ao fim de um período de 24 horas após a puntura e foram recolhidas amostras de pele (figura 13), estando presente tecido conjuntivo e tecido adiposo, corado com Hematoxilina-Eosina, de maneira a realizar um estudo prévio, sendo avaliadas as alterações morfométricas, através do programa ImageJ.

Os fibroblastos não puderam ser avaliados no parâmetro pretendido, devido à técnica utilizada não o ter permitido. A sua individualização delimitando a célula pelo método escolhido não foi possível, dificultando a análise morfométrica.

Assim foram avaliados adipócitos presentes nas amostras, sendo estes classificados em cinco categorias (muito pequeno – MP, pequeno – P, médio – M, grande – G, muito grande – MG) utilizando a média e o desvio padrão, para o grupo teste e grupo controle. O grupo teste foi comparado ao grupo controle.

A área dos adipócitos foi classificada de acordo com os seguintes critérios: adipócitos médios (M), quando o valor varia entre $[\mu-\sigma; \mu+\sigma]$, adipócitos grandes (G), quando o valor varia entre $[\mu+\sigma; \mu+2\sigma]$, adipócitos pequenos (P), quando o valor varia entre $[\mu-\sigma; \mu-2\sigma]$, adipócitos muito grandes (MG), quando o valor é maior do que $\mu+2\sigma$ e adipócitos muito pequenos (MP), quando o valor é menor que $\mu-2\sigma$.

A análise estatística foi realizada usando o programa estatístico R. Este é uma aplicação de distribuição livre dedicada à estatística computacional e gráfica. Este programa utiliza a linguagem R (o mesmo nome do programa), derivada da linguagem S criada nos laboratórios *Bell*, que pertence atualmente à *Lucent Technologies*. O R fornece vários recursos estatísticos (modelos lineares, modelos não lineares, testes estatísticos, análises de séries no tempo, entre outros), ferramentas gráficas e programação orientada a objetos, podendo ser expandido através da instalação de módulos.

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n n_i$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

Figura 10 - Equação 1 e 2, respectivamente

As funções utilizadas para o cálculo da média e do desvio padrão foram a função `mean()` e a função `sd()`, respectivamente. A função `mean()` calcula uma média aritmética a partir de um vetor que recebe como argumento, implementando a (equação 1), onde μ é a média, n o número de amostras e n_i amostra de índice i . A função `sd()` calcula o desvio padrão de um vetor que recebe como argumento, implementado a equação (equação 2), onde σ é o desvio padrão, N o número da amostra, μ a média e x_i a amostra de índice i .

Para calcular o teste t-Student utilizou-se a função `t-test()`. Esta função recebe dois vetores como argumentos, mantendo-se as opções por defeito que são: teste de duas caudas, correção de *Welch* para a não homogeneidade da variância e intervalo de confiança de 95%. O teste t de *Welch* é definido pela seguinte fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

Figura 11 - Equação 3

Onde X é a média da amostra, s^2 é a variância da amostra e N o tamanho da amostra. Considerou-se como hipótese nula (H_0) os valores das médias serem iguais, e como hipótese não-nula (H_1) os valores das médias serem diferentes estatisticamente.



Figura 12 - Puntura efetuada no membro posterior direito com orientação perpendicular.



Figura 13 - Puntura efetuada no membro posterior direito com orientação perpendicular, recolha da amostra.

Resultados

Os adipócitos dos murganhos do grupo controlo apresentam uma área média de $1682,96 \pm 27,46\mu\text{m}^2$, com um intervalo de confiança de 95% entre 1655,5-1710,47 μm^2 e no grupo teste apresentam uma área média de $1824,94 \pm 42,84\mu\text{m}^2$, com um intervalo de confiança de 95% entre 1782,11-1868,89 μm^2 , evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p=5,745e-08$). Tais diferenças são visíveis nos gráficos das figuras 16 e 17.

O grupo controlo totaliza 2314 células examinadas, apresentando 1 adipócito MP, representando este 0% dos adipócitos; 323 adipócitos P, representando este 14% dos adipócitos; 1625 adipócitos M, representando este 70% dos adipócitos; 263 adipócitos G, representando este 11% dos adipócitos e 102 adipócitos MG, representando este 4% dos adipócitos (Figura 14)

O grupo teste totaliza 1452 células, apresentando 1 adipócito MP representando este 0% dos adipócitos; 200 adipócitos P representando este 14% dos adipócitos; 941 adipócitos M representando este 65% dos adipócitos; 201 adipócitos G representando este 14% dos adipócitos e 109 adipócitos MG representando este 8% dos adipócitos (Figura 15)

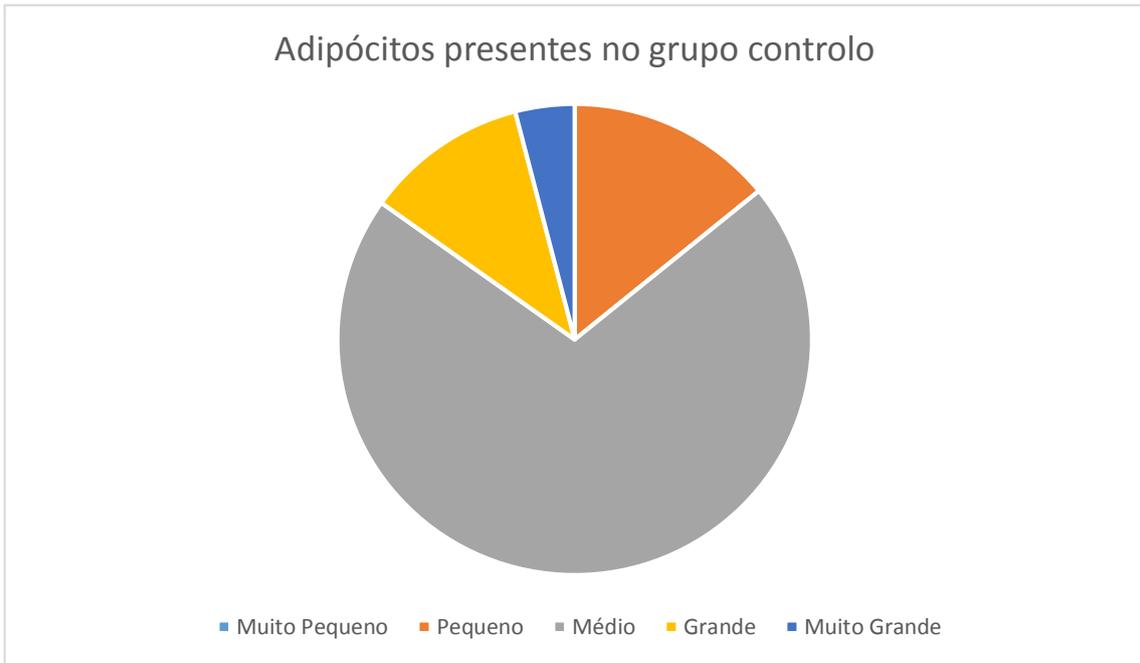


Figura 14 - Adipócitos presentes no grupo controlo por classes.



Figura 15 - Adipócitos presentes no grupo teste por classes.

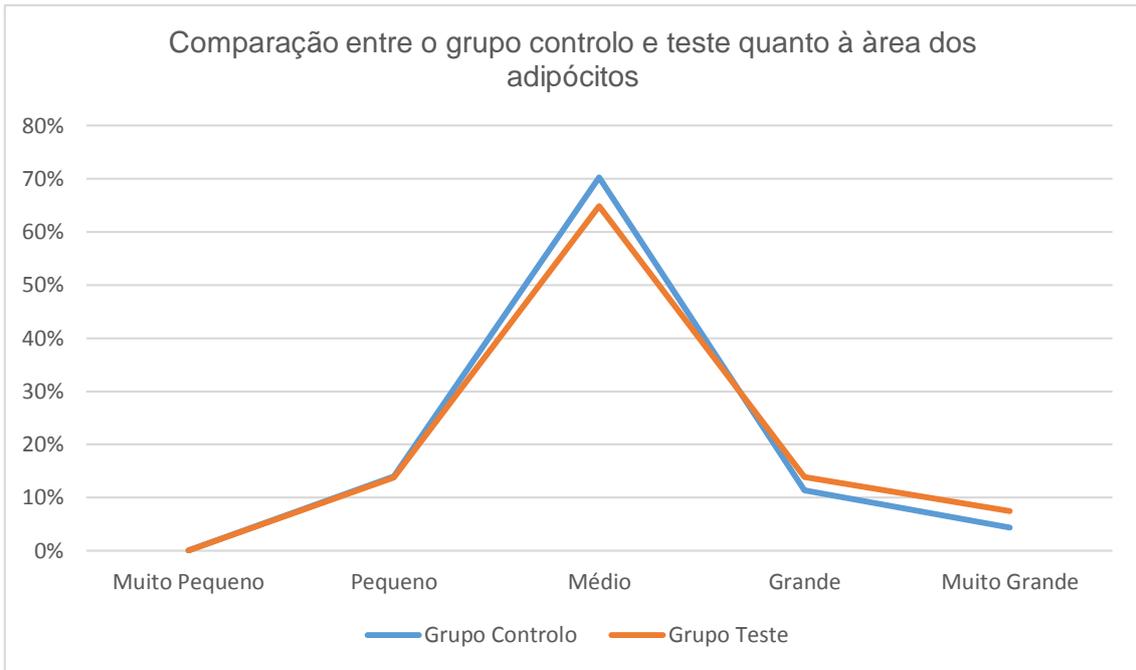


Figura 16 - Comparação entre o grupo controle e teste quanto à área dos adipócitos.

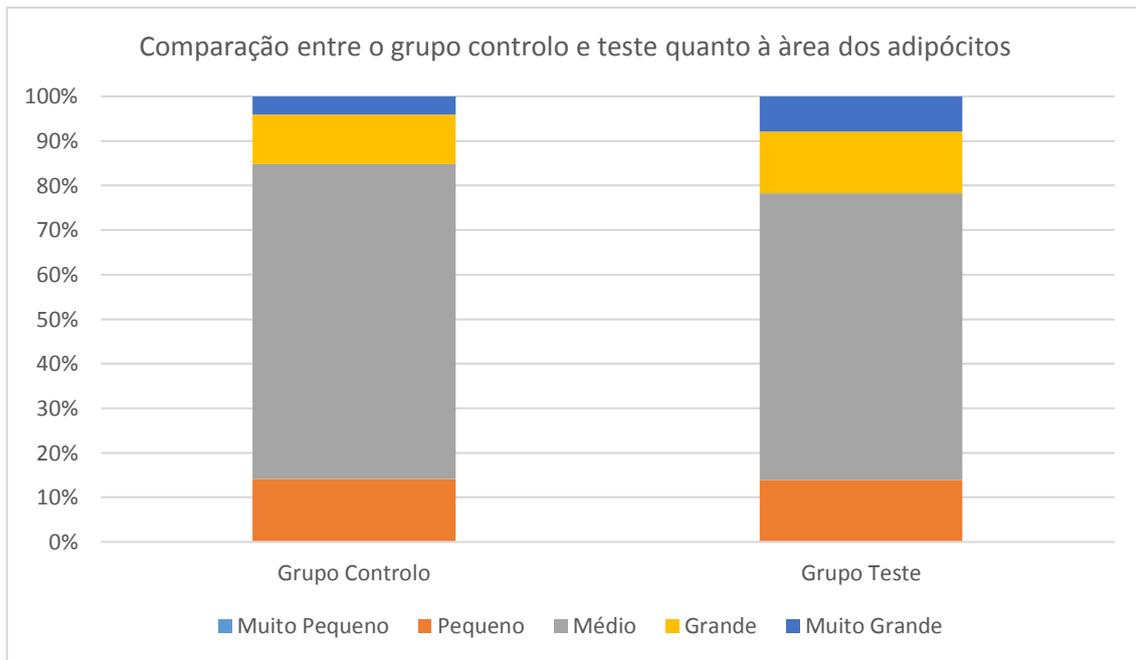


Figura 17 - Comparação entre o grupo controle e teste quanto à área dos adipócitos.

Discussão

Os tecidos recolhidos para este estudo foram incluídos em parafina, para dissolver os lípidos foram usados solventes orgânicos e permitindo uma correta morfometria dos adipócitos(13). A diferença entre os grupos controlo e teste foi estatisticamente significativa ($p=5,745e-08$). Esta poderá ser devido às alterações induzidas ao nível da membrana basal e da estrutura do citoesqueleto pela acupuntura, explicando assim os resultados obtidos.

Num estudo futuro, para a demonstração de lípidos, o tecido deverá ser congelado sendo posteriormente cortadas as amostras num criostato. Dado que os lípidos presentes nos adipócitos são maioritariamente triglicérido, os métodos passíveis de serem aplicados são: 1) *Oil Red O*, 2) *Sudão II e IV*, 3) *Negro do Sudão* e 4) *Fluorocromo Vermelho do Nilo*(13).

Deverá ser tido em conta o local da recolha do tecido para análise, recolhendo o mesmo em torno da agulha previamente colocada perpendicularmente. O uso de tintas para corar a pele em torno do local de punção poderá auxiliar na sua recolha. Não é assim descartada a possibilidade de uma escolha incorreta do local de recolha. Num estudo similar futuro deverá ser garantida a correta recolha da amostra.

Poderá ser examinado o tecido conjuntivo e o tecido adiposo recolhido neste estudo quanto à presença de bactérias, examinando a existência ou inexistência de sepsia no local. É assim proposto a utilização do método de *Brown e Brenn* que permite a deteção de bactérias Gram + e Gram -(13).

Os fibroblastos foram corados, no entanto, não foram devidamente individualizados, não permitindo a recolha de dados estatísticos morfométricos como a sua área. Sendo assim é proposta a utilização de outras técnicas histológicas, de modo a permitir a correta análise destas células.

Dentro das técnicas propostas podemos referir coloração por ácido periódico de *Schiff e Van Gienson*. O ácido periódico de *Schiff* é umas das técnicas mais versáteis e amplamente usadas para a demonstração de hidratos de carbono, glicogénio e glicoproteínas. Cora assim colagénio do tipo IV, por estar muitas vezes associado a hidratos de carbono, fibras reticulares e fibras elásticas jovens. As diferentes colorações de tricrómio, tais como a técnica de *Van Gienson*, de *Masson* e *Gomori* podem ser usadas para corar seletivamente músculo, colagénio, elastina, reticulina, cartilagem e fibrinas(13).

Conclusão

Estes resultados permitem-nos concluir desde já que existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, havendo alterações morfométricas ao nível dos adipócitos quando os tecidos são submetidos a esta situação de pressão controlada, devido às alterações induzidas ao nível da membrana basal e da estrutura do citoesqueleto.

Para a continuação deste estudo propõem-se que o tecido recolhido seja estudado quanto à presença ou ausência de bactérias, pelo método de *Brown e Brenn*. Impõem a necessidade de examinar as possíveis alterações morfológicas dos fibroblastos, que deverão ser analisadas através do uso de uma diferente técnica de coloração. Isto pelo importante papel que poderão desempenhar na explicação do efeito terapêutico da acupuntura, tanto a curto como a longo prazo.

Bibliografia

1. Langevin HM, Storch KN, Cipolla MJ, White SL, Buttolph TR, Taatjes DJ. Fibroblast spreading induced by connective tissue stretch involves intracellular redistribution of α - and β -actin. *Histochemistry and cell biology*. 2006;125(5):487-95.
2. Gonçalves CB, V. *Histologia Texto e Imagens Histologia Histogênese Organogênese*. 2010;3ª edição:31-45; 185-201.
3. Langevin HM, Bouffard NA, Badger GJ, Iatridis JC, Howe AK. Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2005;288(3):C747-C56.
4. Konofagou EE, Langevin HM. Using ultrasound to understand acupuncture. Acupuncture needle manipulation and its effect on connective tissue. *IEEE engineering in medicine and biology magazine : the quarterly magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society*. 2005;24(2):41-6.
5. Langevin HM, Churchill DL, Cipolla MJ. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. *The FASEB Journal*. 2001;15(12):2275-82.
6. Langevin HM, Yandow JA. Relationship of acupuncture points and meridians to connective tissue planes. *The Anatomical record*. 2002;269(6):257-65.
7. Langevin HM, Churchill DL, Wu J, Badger GJ, Yandow JA, Fox JR, et al. Evidence of connective tissue involvement in acupuncture. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(8):872-4.
8. Julias M, Buettner HM, Shreiber DI. Varying assay geometry to emulate connective tissue planes in an in vitro model of acupuncture needling. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2011;294(2):243-52.
9. Langevin HM, Churchill DL, Fox JR, Badger GJ, Garra BS, Krag MH. Biomechanical response to acupuncture needling in humans. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91(6):2471-8.
10. Langevin HM, Bouffard NA, Churchill DL, Badger GJ. Connective tissue fibroblast response to acupuncture: dose-dependent effect of bidirectional needle rotation. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2007;13(3):355-60.
11. Julias M, Edgar LT, Buettner HM, Shreiber DI. An in vitro assay of collagen fiber alignment by acupuncture needle rotation. *Biomedical engineering online*. 2008;7:19.
12. Langevin HM, Bouffard NA, Badger GJ, Churchill DL, Howe AK. Subcutaneous tissue fibroblast cytoskeletal remodeling induced by acupuncture: evidence for a mechanotransduction-based mechanism. *Journal of cellular physiology*. 2006;207(3):767-74.
13. Bancroft JD, Gamble M. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences. 2008
14. Henrikson RC, Kaye GI, Mazurkiewicz JE. "NMS Histology. National Medical Series for Independent Study." 1997