

**Artigo de revisão**

Yago Gabriel da Silva Barbosa<sup>1</sup>  
Wanderson Gabriel Gomes de Melo<sup>1</sup>  
Huanna Waleska Soares Rodrigues<sup>1</sup>  
Napoleão Martins Argôlo Neto<sup>1</sup>

**Aplicabilidade da estereologia e microscopia de força atômica à pesquisa dermatológica veterinária (revisão de literatura)**

Applicability of stereology and atomic force microscopy for veterinary dermatological research  
(literature review)

**ABSTRACT**

In veterinary dermatology, the morphological tradition of obtaining essentially qualitative data persists. Stereology and atomic force microscopy are techniques that combine statistics and advanced microscopy to obtain three-dimensional quantitative information, such as total volume, ultrastructural volume, volumetric density, total number of structures, among others, from two-dimensional images. These techniques are increasingly relevant to determine the morphological heterogeneity commonly found in tissue samples. The concomitant use of these techniques favors the obtaining of mathematical and physical data, which are more reliable and more accurate than qualitative morphological data, based on two-dimensional morphometric descriptions. This work consists in a research of a descriptive nature, in the method of bibliographical research regarding the use of the techniques of stereological delineation and atomic force microscopy. Then, articles were selected in English and Portuguese, from 2003 to 2019, from online databases (PUBMED, SCIELO). Stereology and advanced microscopy as atomic force microscopy are highly relevant for their ability to provide sophisticated and trustworthy data in the area of interest turning veterinary morpho-descriptive practice useful.

**RESUMO**

Em dermatologia veterinária, persiste a tradição morfológica de obtenção de dados essencialmente qualitativos. A estereologia e a microscopia de força atômica são técnicas que combinam estatística e microscopia avançada para obter informações quantitativas tridimensionais, como volume total, volume ultraestrutural, densidade volumétrica, número total de estruturas, dentre outras, a partir de imagens bidimensionais. Essas técnicas são cada vez mais relevantes para determinar a heterogeneidade morfológica comumente encontrada em amostras teciduais. A utilização concomitante dessas técnicas favorece a obtenção de dados matemáticos e físicos, os quais são mais fidedignos e de maior acurácia que dados morfológicos qualitativos, baseados em descrições morfométricas bidimensionais. Este trabalho consiste de uma pesquisa de natureza descritiva, na modalidade de pesquisa bibliográfica, a respeito do uso das técnicas de delineamento estereológico e microscopia de força atômica. Para tanto, foram selecionados artigos em inglês e português, de 2003 a 2019, a partir de bases de dados online (PUBMED, SCIELO). A estereologia e microscopias avançadas, como a microscopia de força atômica, são altamente relevantes pela capacidade de fornecimento de dados sofisticados e fidedignos na área de interesse, tornando úteis para práticas morfodescritivas veterinárias.

<sup>1</sup>. Centro de Ciências Agrárias,  
Universidade Federal do Piauí

**KEYWORDS**

Stereology; AFM; Topographic analysis.

**PALAVRAS-CHAVE**

Estereologia; AFM; Análise topográfica.

**AUTOR CORRESPONDENTE:**

Napoleão Martins Argôlo Neto  
<argolo\_napoleao@ufpi.edu.br >  
Centro de Ciências Agrárias, UFPI, Campus  
Ministro Petrônio Portella, Bairro Socopo, CEP  
64049-550. Teresina - PI – Brasi

## INTRODUÇÃO

Avaliações morfológicas constituem etapa fundamental de quaisquer pesquisas dermatológicas veterinárias por permitirem a descrição estrutural dos elementos que compõem a pele, favorecendo a padronização de características de normalidade intraespecíficas (KAMP et al., 2009). De uma forma geral, as camadas e estratos da pele têm sido objeto de muitos estudos morfológicos e ultraestruturais, tanto pela variabilidade entre as espécies, quanto às funções imunológica, farmacodinâmica e farmacocinética cutânea (HUSSAIN, 2019; CHANG, 2017; AGARWAL, 2019; LOGGER, 2019). Em medicina veterinária, dado o elevado número de espécies estudadas, tais características tornam-se ainda mais relevantes, haja visto que as variações de celularidade, densidade celular, volume celular e tecidual, influenciam na fisiologia cutânea e, conseqüentemente, na rotina clínica para a espécie (KAMP et al., 2011).

O estabelecimento de valores de referência para as dimensões e ultraestrutura da pele saudável não é tão simples como possa parecer. As técnicas morfológicas convencionais bidimensionais *ex vivo*, baseadas na identificação microscópica de amostras de tecido, apresentam distorções das dimensões teciduais. Tais distorções são conseqüências inerentes à histotécnica, que induz retração tecidual após o processamento convencional. Além disso, a morfologia irregular da junção dermo-epidérmica eleva o risco de imprecisão para estabelecer dimensões por estrato (AMENÁBAR et al., 2003; KAMP et al., 2009; CHEN et al., 2019).

A necessidade de análises morfométricas, com dados quantitativos, imaginológicos e topográficos confiáveis sobre componentes da pele, estimulou a adoção dos métodos de delineamento estereológico e de microscopia de força atômica para estudos dermatológicos em seres humanos, mas seu uso permanece restrito a animais (ANDERSEN et al., 2003; SARAVANAN, 2017).

A estereologia é o conjunto de métodos que permite inferências tridimensionais (3D), a partir de imagens bidimensionais, fundamentadas em princípios morfológicos quantitativos, formulas da geometria probabilística e da matemática, obtidas de uma amostragem rigorosa, precisa, sistemática, uniforme e aleatória, a fim de fornecer um dado quantitativo sem viés (KRISTIANSEN e NYENGAARD, 2012). Dessa forma, parâmetros de perfis das estruturas observáveis em cortes de tecido podem extrapolar informações sobre estruturas no espaço tridimensional (BEDOYA et al., 2016). O delineamento estereológico permite estimar diversos parâmetros morfoquantitativos cutâneos, como número e volume celular epidérmico, volume de fibras dérmicas, área de superfície e densidade tecidual, dentre outros (LACERDA, 2003; RODRIGUES, 2018).

Complementarmente, a microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica utilizada para caracterização morfológica tridimensional de inúmeros tecidos. Essa técnica permite a identificação de características de profundidade e volume celular, bem como segmentação de cores e análises mecanobiológicas celulares, como viscoelasticidade e turgor, favorecendo a obtenção de dados que não seriam possíveis pela microscopia eletrônica de varredura ou transmissão (VENTURONI, 2003).

## DESENVOLVIMENTO

Foram pesquisados e analisados artigos nacionais e internacionais, contendo os descritores pele (*skin*), estudo estereológico (*stereologic study*) e microscopia de força atômica da pele (*skin atomic force microscopy*).

Para a pesquisa, realizou-se associação dos descritores *skin* e *stereologic* no banco de dados PubMed. Foram encontrados 63 estudos relacionados a estereologia em pele: 30 em humanos, 27 em animais e 6 revisões de literatura. Apenas 38 nos últimos dez anos e a maior parte relacionada a cicatrização cutânea (Figura 03). A mesma chave de busca foi utilizada no banco SCIELO, não sendo verificado nenhum estudo relacionado. Porém, com a desassociação dos descritores, verificou-se que a utilização dos delineamentos estereológico tem sido objeto de estudo morfométrico em outros sistemas: renal (161 publicações), endócrino (197 publicações), reprodutor (43 publicações) e nervoso (136 publicações).

A utilização dos descritores para microscopia de força atômica em pele na base de dados PubMed identificou 230 publicações, sendo 109 em humanos, 78 em animais e 11 revisões bibliográficas. Dessas, 181 foram publicadas nos últimos dez anos. A busca na base de dados SCIELO não revelou nenhuma publicação na temática (Figura 03).

Não foram identificadas publicações na temática que estabelecessem valores de referência ou padrões de caracterização para as camadas e estratos cutâneos em humanos ou animais. Dessa forma, não é possível estabelecer valores referencias de volumetria por estereologia e características ultraestruturais por microscopia de força atômica da pele. Os trabalhos disponíveis mensuram o volume e descrevem a ultraestrutura dos elementos cutâneos, sem estabelecer comparações com os valores de referência (MINOTA et al., 2019). Nesses, infere-se a evolução do fenômeno biológico estudado, baseado na contribuição potencialmente positiva da estrutura analisada na fisiologia cutânea. Nos artigos que utilizaram modelos para cicatrização cutânea, por exemplo, a volumetria e caracterização ultraestrutural dos diferentes tipos de colágeno, são comparados diretamente aos percentuais dessas estruturas previamente definidas em modelos bidimensionais (KARLSSON et al., 2013). Tal fato é preocupante, pois dados tridimensionais (mm<sup>3</sup>) e

bidimensionais ( $\text{mm}^2$ ) apresentam grandezas diferentes e, portanto, não são passíveis de comparação direta.

Nesse contexto, mudanças histológicas e estruturais sutis podem desencadear efeitos potencialmente adversos, irreversíveis ou não-monitoráveis. Assim, são necessários métodos quantitativos sensíveis e precisos (MINOTA et al., 2019). Historicamente, métodos qualitativos geralmente referidos como métodos bidimensionais (2-D) têm sido mais frequentemente empregados (NOJIMA et al., 2017; CHEN et al., 2019; BROWN, 2017; AMINI, 2018). Porém, métodos bidimensionais não permitem inferências baseadas em valores quantitativos mensuráveis, o que limita a compreensão real das dimensões da pele, comprometem sensibilidade do método e a precisão estatística, elevando o risco de erros (NOJIMA et al., 2017; CHEN et al., 2019; BROWN, 2017; AMINI, 2018; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2016).

As limitações dos métodos 2-D podem ser evitadas através do uso de métodos acurados de obtenção de dados quantitativos, como a estereologia, que é uma técnica de medição e quantificação estrutural anatômica de extrema relevância em dermatologia (AZULAY et al., 2010; BROWN, 2017). O delineamento estereológico oferece abordagens práticas e cientificamente válidas, para obter estimativas quantitativas precisas de mudanças estruturais histológicas (KAMP et al., 2009; NOJIMA et al., 2017; CHEN et al., 2019).

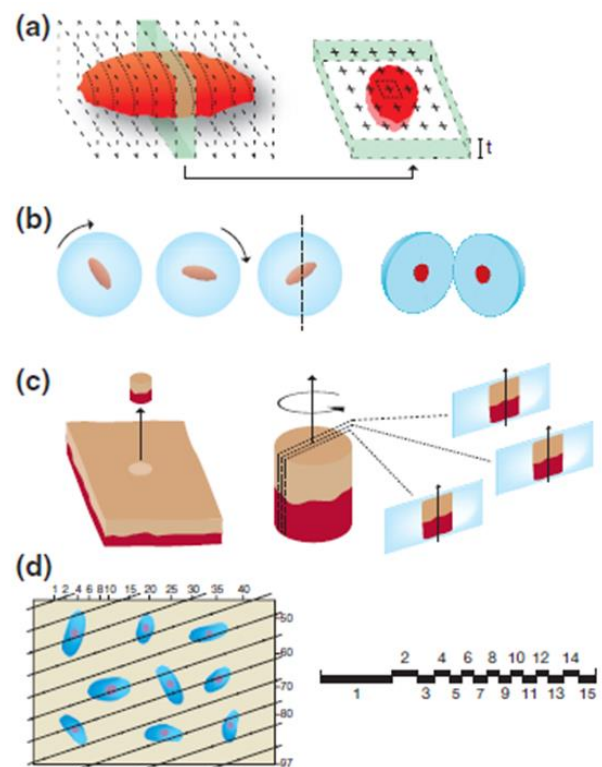
Os estudos utilizando o delineamento estereológico concentram-se particularmente nas áreas de desenvolvimento embrionário (ZHANG, 2018), evolução (BOGGILD, 2018), patologia (ASHKANI-ESFAHANI et al., 2019) e neurociências (YURT, 2018). Em dermatologia veterinária, é escassa sua empregabilidade, apesar do potencial para utilização (KAMP et al., 2009; MARTINS et al., 2010; KAMP et al., 2011).

Para a dermatologia veterinária, a estereologia pode oferecer uma série de benefícios para análises em microscopia, favorecendo a obtenção de dados quantitativos precisos, permitindo inferências funcionais, a partir de imagens bidimensionais (GOKHALE et al., 2004). Como o delineamento estereológico permite estimar dados geométricos como volume, área, comprimento ou número de partículas (células ou outras estruturas), é possível descrever com precisão a morfologia tridimensional da pele (MARCOS et al., 2012; SARAVANAN et al., 2017).

A análise estereológica pode ser simplificada em duas etapas principais: a determinação da amostragem estatística apropriada para obtenção de amostras de tecido e seções histológicas e a quantificação das estruturas de interesse (OAKLANDER, 2003; HERN, 2005). Para última, adota-se formas geométricas apropriadas, como pontos ou linhas, por exemplo, para sobreposição à seção histológica e, subsequente, quantificação de pontos de interesse (Figura 01) (KAMP et al., 2009).

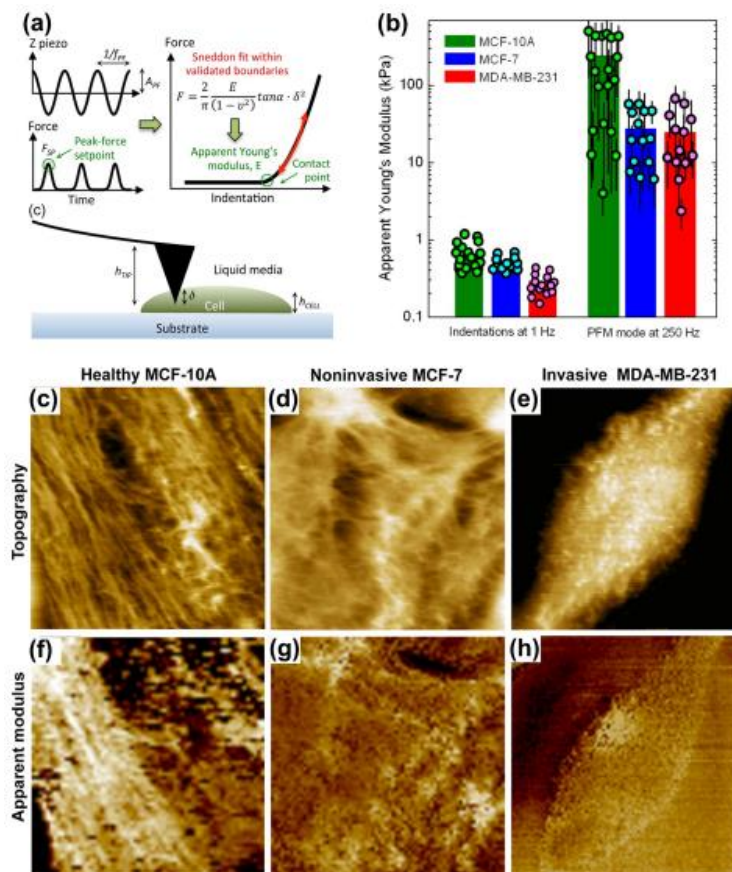
As estimativas quantificadas obtidas possuirão, portanto, uma relação estatística com os valores reais no espaço tridimensional e, conseqüentemente, a variação de erros das estimativas pode ser prevista (KRISTIANSEN e NYENGAARD, 2012; SARAVANAN et al., 2017).

Avanços em sistemas de bioinformática também contribuíram para elevar a acurácia e precisão de delineamentos estereológicos, gerando o desenvolvimento de novos métodos de análise de imagem e padronização de seções teciduais (AMENÁBAR et al., 2006; JONES, 2013; SARAVANAN et al., 2017; LIU, 2017). Os pixels, obtidos das imagens digitalizadas, são utilizados para análises estereológica, desde que os mesmos possuam relação com cores e estruturas (JONES, 2013). Métodos de informática semi-automatizados de segmentação de cores, por exemplo, permitem a obtenção de dados estereológicos baseados nos diferentes espectros de pixels (AMENÁBAR et al., 2006; JONES, 2013; SARAVANAN et al., 2017; RODRIGUES, 2018).



**Figura 01.** (a) Uma ilustração do princípio de Cavalieri empregado para estimar o volume total da estrutura (b) Um pedaço de tecido embebido em uma bola de parafina rolando ao longo de uma mesa (SURS). (c) Geração de seções e isotropização da pele. (d) Ilustração esquemática de um campo de visão no microscópio para estimar densidade de núcleos celulares. (Fonte Imagem: Adaptado de KAMP, 2009).

Complementarmente à estereologia, a AFM possui relevante potencial de empregabilidade na dermatologia veterinária por permitir a obtenção de imagens topográficas com resolução atômica, por meio do contato intermitente da sonda de varredura com a amostra (TANG, 2010; ALCARAZ et al., 2018). Além disso, pode caracterizar as



**Figura 02.** (a) Representação esquemática da operação da AFM para geração de imagens células vivas. (b) Comparação dos valores médios do módulo de Young para células isoladas obtidas por contato. (c) - (e) imagens de topologia AFM de (c) célula saudável, (d) células MCF-7 não invasivas e (e) células MDA-MB-231 invasivas. (f) - (h) Imagens de mapeamento nanomecânico de (f) células MCF-10A saudáveis, (g) células MCF-7 não invasivas, e (h) células MDA-MB-231 invasivas. (Fonte Imagem: Adaptado de KWON,2019).

propriedades biomecânicas da epiderme e derme, como a rigidez, por exemplo, pelo módulo de Young (FERREIRA, 2006; PAYDAR, 2016). Nesse, as imagens atômicas são obtidas pela técnica de contato intermitente, no qual a sonda de AFM, com dimensões nanométricas, presa à extremidade do *Cantilever*, de 125 $\mu$ m, toca a superfície celular, determinando suas características biomecânicas (Figura 02) (PINTO, 2015; PEÑUELA et al., 2018; KWON, 2019).

Essa técnica deve ser adaptada ao tecido cutâneo, por meio da calibração precisa do microscópio de AFM, a fim de evitar danos celulares induzidos pelas forças de adesão do tecido à sonda de AFM (BUTT, 2005; ALCARAZ et al., 2018).

Nesse contexto, a AFM destaca-se por ser a primeira técnica de microscopia avançada para dimensões nanométricas e subnanométrica, fornecendo mapas topográficos precisos de resolução atômica (FERREIRA, 2006; BUTT, 2005; ALCARAZ et al., 2018).

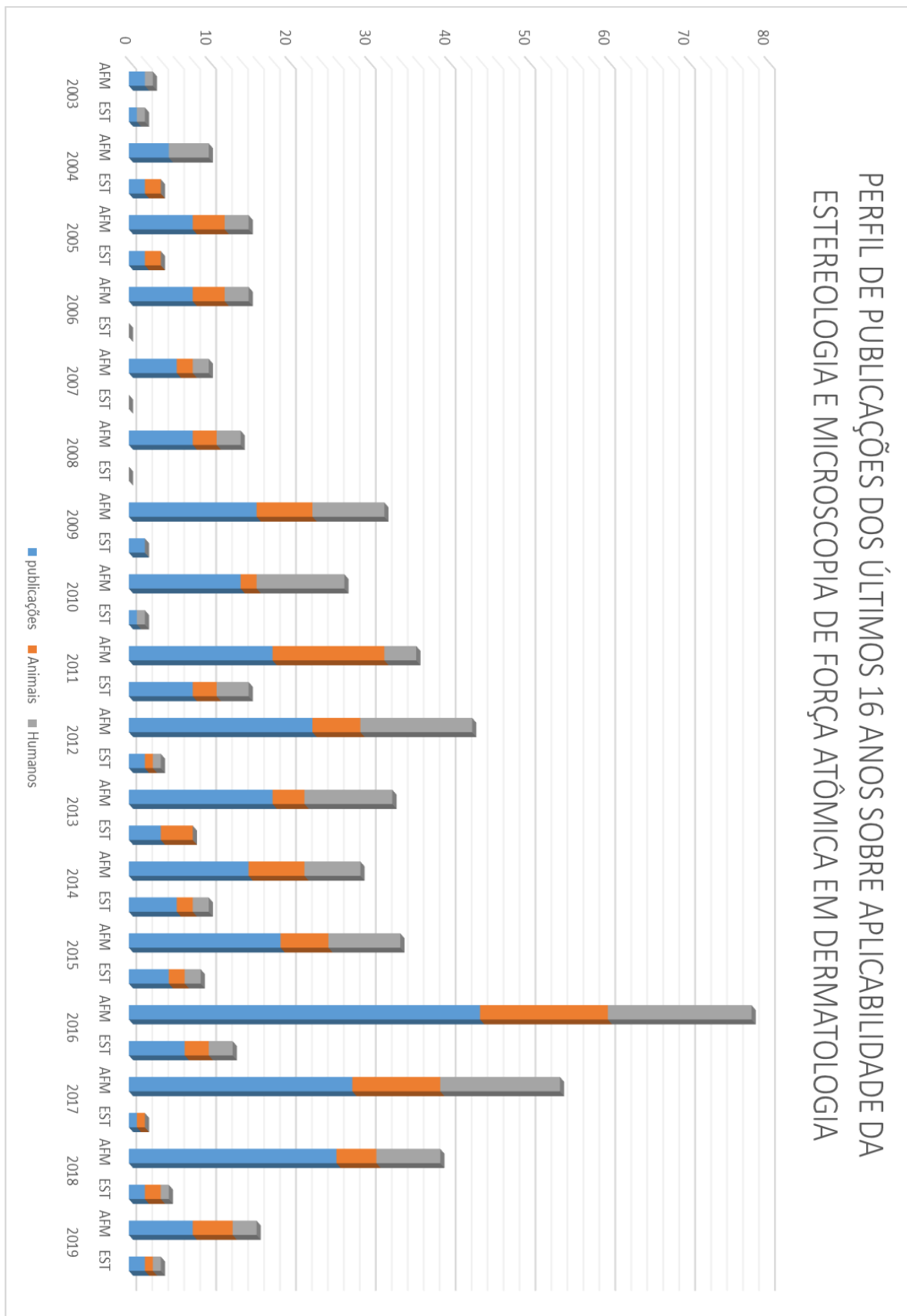
Contrariamente às outras técnicas de microscopia de alta resolução, que exigem protocolos de fixação apropriados, o AFM dispensa a preparação prévia das amostras, permitindo a avaliação das mesmas até em meio líquido (BUTT, 2005). Apesar desses benefícios, ainda é escassa sua utilização em dermatologia veterinária, limitando-se a estudos cicatriciais em murinos (RAGHUWANSHI et al., 2017). Em

dermatologia humana, recentemente descreveu-se a composição nanoestrutural da pele (ECKERSLEY et al., 2018), corneócitos (DANZBERGER et al., 2018) e fibras colágenas (QUIGLEY et al., 2018)

A rigidez da epiderme, a espessura, orientação e periodicidade das fibras de colágeno, presentes na derme papilar humana, bem como suas particularidades nanoestruturais, foram recentemente mensuradas (OLEJNIK, A.; NOWAK, I 2017; PEÑUELA et al., 2018; CHANG et al., 2017). Essas descrições são importantes para determinação de parâmetros de normalidade, haja visto que entidades nosológicas distintas podem alterar as propriedades mecânicas da pele e seus componentes, as quais podem ser identificadas por AFM (VIELMUTH, 2018).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O delineamento estereológico e a microscopia de força atômica são técnicas avançadas que permitem a obtenção de dados teciduais volumétricos e ultraestruturais, com relevante perspectiva para utilização em estudos dermatológicos. Contudo, sua utilização é escassa em dermatologia veterinária, refletindo-se num volume insipiente de publicações nos últimos 16 anos. A literatura carece de valores de referência ou padrões de caracterização



**Figura 03.** Apresentação em forma de gráfico sobre o perfil de publicações dos últimos 16 anos sobre a aplicabilidade da estereologia e microscopia de força atômica em dermatologia.

para as camadas e estratos cutâneos, tanto em humanos quanto em animais, denotando a necessidade de pesquisas na temática.

## REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, J. et al. Bidirectional mechanobiology between cells and their local extracellular matrix probed by atomic force microscopy. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press. p. 71-81. 2018.
- AGARWAL, S.; KRISHNAMURTHY, K. Histology, Skin. In: **StatPearls** [Internet]. StatPearls Publishing, 2019.
- AMENÁBAR, J. M.; HUGO, F.N.; FOSSATI, A. M. C.; PADILHA, D. M. P The use of stereology as a method in histological research. **Rev Fac Odontol**. v 44, p 62-65. 2003.
- AMENÁBAR, J. M.; MARTINS G. B.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO M. A. Z. Comparison between semi-automated segmentation and manual point-counting methods for quantitative analysis of histological sections. **Journal of Oral Science**. v. 48, n. 3, p. 139-143. 2006.
- AMINI, A. et al. Stereological and molecular studies on the combined effects of photobiomodulation and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on wound healing in diabetic rats. **J Photochem Photobiol B**. v. 182 p 42-51 2018.
- ANDERSEN, B.B.; PAKKENBERG, B. Stereological quantitation in cerebella from people with schizophrenia. **Br J Psychiatry**. v. 182, p. 354-361. 2003.
- ASHKANI-ESFAHANI, S. et al. The Healing Effect of Plantago Major and Aloe Vera Mixture in Excisional Full Thickness Skin Wounds: Stereological Study. **World journal of plastic surgery**, v. 8, n. 1, p. 51, 2019.
- AZULAY, M. M.; CUZZI, T.; PINHEIRO J. C. A.; AZULAY, D. R.; RANGEL, G. B. Métodos objetivos para análise de estudos em dermatologia Cosmética. **An Bras Dermatol**. v. 85, n. 1, p.65-71. 2010.
- AZZI, L.; EL-ALFY M.; MARTEL C.; LABRIE, F. Gender Differences in Mouse Skin Morphology and Specific Effects of Sex Steroids and Dehydroepiandrosterone. **J Invest Dermatol**. v. 124, p. 22 –27. 2005.
- BEDOYA, S. A. O. et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq Bras Med Vet e Zootec**.2016;68:147-154.
- BOGGILD, S et al. Highly segregated localization of the functionally related vps10p receptors sortilin and SorCS2 during neurodevelopment. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 8, p. 1267-1286, 2018.
- BROWN, D L. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. **J. Toxic. Pathot**. v 30.p. 183-191 2017.
- BUTT, H.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic forcemicroscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**. n. 59. 2005.
- CHANG, A.C.; LIU, B.H.; SHAO, P.L.; LIAO, J.D. Structure-dependet behaviours of skin layers studied by atomic force microscopy. **Journal of Microscopy**. v. 267. p. 265-271. 2017.
- CHEN, Y. et al. Three-dimensional (3D) imaging of biomarkers in human core needle biopsies of normal and cancerous breast tissue. **Cancer Research**. V.9, p.5624. 2019
- DANZBERGER, J. et al. Glycan distribution and density in native skin's stratum corneum. **Skin Research and Technology**, v. 24, n. 3, p. 450-458, 2018.
- DICKSON, J.M.; WEAVERS, H. M.; MITCHELL, N.; WINTER E.M.; WILKINSON, I.D.; VANBEEK, E.J.; GRIFFITHS, P.D. Choice of cross size in stereology - a cautionary note. **Neuroradiology**. v. 45, p.896-899. 2003.
- DUFORT, C C.; PASZEK, M. J.; WEAVER, V M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. **Nature reviews Molecular cell biology**. v. 12, n. 5, p. 308, 2011.
- ECKERSLEY, A. et al. Structural and compositional diversity of fibrillin microfibrils in human tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5117-5133, 2018.
- FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Química Nova**, p. 137-142, 2006.
- GOKHALE, A. M. et al. Design-based estimation of surface area in thick tissue sections of arbitrary orientation using virtual cycloids. **Journal of microscopy**, v. 216, n. 1, p. 25-31, 2004.
- HERN, S. et al. In vivo quantification of the structural abnormalities in psoriatic microvessels before and after pulsed dye laser treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 3, p. 505-511, 2005.
- HUSSAIN, H. et al. Quantitative analysis of free amino acids and urea dderived from isolated corneocytes of healthy young, healthy aged, and diseased skin. **Skin Pharmacology and Physiology**.2019;32:94-100.
- ISOLA, J.G.M.P.; MORAES, P. C.; RAHAL S. C.; MACHADO, M.R.F. Morfologia, ultraestrutura e morfometria do tegumento da paca (Cuniculus paca Linnaeus, 1766) criada em cativeiro. **Pesq. Vet. Bras**. v. 33 p. 674-682. 2013.
- JONES, N. W. et al. Fractional volume of placental vessels in women with diabetes using a novel stereological 3D power Doppler technique. **Placenta**, v. 34, n. 11, p. 1002-1008, 2013.
- KAMP, S.; JEMEC, G. B. E.; KEMP, K.; KJELDSSEN C. R.; STENDERUP, K.; PAKKENBERG, B.; DAM T. N. Application of stereology to dermatological research. **Experimental Dermatology**. v. 18 p. 1001–1009. 2009.
- KAMP, S. et al. Stereological Estimation of Epidermal Volumes and Dermo-Epidermal Surface Area in Normal Skin. **Dermatology**, v. 223, n. 2, p.131-139, 2011.
- KARLSSON, P et al. Dermal innervation in healthy subjects and small fiber neuropathy patients: a stereological reappraisal. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 18, n. 1, p. 48-53, 2013.
- KRISTIANSEN, S. L. B.; NYENGAARD, J. R. Digital stereology in neuropathology. **APMIS**. v.120, p.327–40. 2012.
- KWON, T.; GUNASEKARAN, S.; EOM, K. Atomic force microscopy-based cancer diagnosis by detecting cancer-specific biomolecules and cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, 2019.

- LACERDA, M. C. A. Stereological tools in biomedical research. **An Acad Bras Cienc.** v. 75, p. 469-86. 2003.
- LADD, F. V. Lobo. et al. Stereological and allometric studies on neurons and axo-dendritic synapses in superior cervical ganglia. In: International review of cell and molecular biology. **Academic Press**, p. 123-155. 2014.
- LIU, A.P.; CHAUDHURI, O.; PAREKH, S. H. New advances in probing cell–extracellular matrix interactions. **Integrative Biology**, v. 9, n. 5, p. 383-405. 2017.
- LOGGER, J.G.M. et al. Anatomical site variation of water content in human skin measured by the Epsilon: A pilot study. **Skin Research and Technology**, 2019.
- MARCOS, R; MONTEIRO, R. A.F; ROCHA, E. The use of design-based stereology o evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. **J. Anat.** v. 220, p 303–317. 2012.
- MARTINS, C. et al. Quantification of mast cells and blood vessels in the skin of patients with cutaneous mucinosis. **Am J Dermatopathol.** v 32: p 453-8 2010.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E. et al. Stereological Quantification of Cell-Cycle Kinetics and Mobilization of Epithelial Stem Cells during Wound Healing. **Methods Mol Biol.** V.1453: p. 93-107 2016.
- MINOTA, K et al. Refined Quantitation of Sweat Gland Innervation. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, 2019.
- NOJIMA, S et al. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9269, 2017.
- OAKLANDER, A.; STOCKS, A. E.; MOUTON, P. R. Number of Langerhans immune cells in painful and non-painful human skin after shingles. **Archives of dermatological research**, v. 294, n. 12, p. 529-535, 2003.
- OLEJNIK, A.; NOWAK, I. Application of atomic force microscopy in skin related research. **Microscopy and imaging scanning.** v.3. p. 27-33. 2017.
- PAYDAR, S et al. Structural Alteration in Dermal Vessels and Collagen Bundles following Exposure of Skin Wound to Zeolite–Bentonite Compound. **Journal of pharmaceuticals**, 2016;2016.
- PINTO, E. P; RAMOS, G. Q.; DA FONSECA FILHO, H. D. O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala nanométrica. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 3, n. 2, p. 41-50, 2015.
- PEÑUELA, L. et al. Atomic force microscopy for biomechanical and structural analysis of human dermis: A complementary tool for medical diagnosis and therapy monitoring. **Wiley Experimental Dermatology.** v. 27. p. 150-155. 2018.
- QUIGLEY, A.S. et al. Combining tensile testing and structural analysis at the single collagen fibril level. **Scientific data**, v. 5, p. 180229, 2018.
- RAGHUWANSHI, N. et al. Synergistic effects of *Woodfordia fruticosa* gold nanoparticles in preventing microbial adhesion and accelerating wound healing in Wistar albino rats in vivo. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 252-262, 2017.
- RODRIGUES, H.W.S et al. Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with Mesenchymal Stem Cells. **Acta Sci. Veterinariae.**; v. 46, p.11-3536. 2018.
- SARAVANAN, C et al. Meeting report: Tissue-based image analysis. **Toxicologic pathology**, v. 45, n. 7, p. 983-1003, 2017.
- TANG, W, BHUSHAN, B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and skin cream using atomic force microscope. **Colloids Surf B Biointerfaces.** 2010; v.76 p.1-15.
- VIELMUTH, F. et al. Atomic Force Microscopy Provides New Mechanistic Insights into the Pathogenesis of Pemphigus. **Front Immunol.**; v. 28p. 9-485. 2018.
- VENTURONI, M.; GUTSMAN, T.; FANTNER, G.; KINDT, J.; HANSMA, P. investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy. **Biochemical and biophysical research communications.** v 303.p. 508-513 2003.
- YURT, K.K. et al. A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods **in neuroscience. Journal of chemical neuroanatomy**, v. 93, p. 16-29, 2018.
- ZHANG, J. et al. Morphologic and morphometric study on microvasculature of developing mouse kidneys. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 315, n. 4, p. F852-F860, 2018.