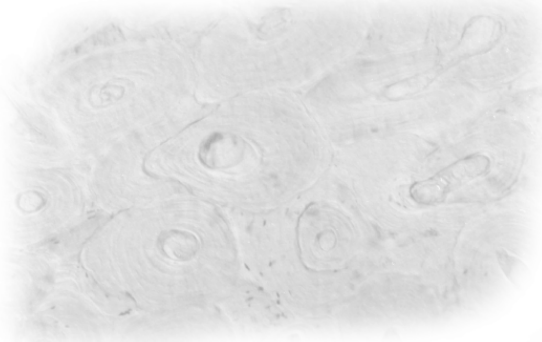


TÉCNICAS ROTINEIRAS DE PREPARAÇÃO E ANÁLISE DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS



Lílian de L. Timm

Centro Universitário La Salle

Museu de Ciências Naturais La Salle

ltimm@lasalle.tche.br

lltimm@hotmail.com

RESUMO

Para a análise das microestruturas anatômicas dos tecidos de animais sob microscopia óptica é necessária a confecção de lâminas histológicas. Neste artigo são abordadas as técnicas de coleta, fixação, inclusão, microtomia, criomicrotomia e coloração em amostras de tecidos moles e as técnicas de desgaste e descalcificação para tecidos ósseos. São abordadas ainda, técnicas especiais de preparação de amostras para análise sob microscopia eletrônica, criofratura e fracionamento celular.

PALAVRAS-CHAVE: Técnicas histológicas, microtomia, coloração, desgaste, descalcificação, microscópios eletrônicos

INTRODUÇÃO

Histologia é o ramo da anatomia que estuda os tecidos animais e vegetais. Tanto a zoologia quanto à botânica apresentam nomenclaturas especiais. Neste artigo serão abordados, exclusivamente, conceitos e técnicas de histologia animal.

A maioria dos tecidos é formada por células e matriz extracelular. Nesta categoria se enquadram os diferentes tipos de tecidos conjuntivos especializados – cartilaginoso, adiposo, sangüíneo e ósseo – além dos tecidos conjuntivo propriamente dito, muscular e nervoso. As células que os constituem, possuem

formas e funções muito distintas. Contudo, todas trabalham em conjunto na sustentação e na manutenção do tecido. A matriz é formada principalmente por fibras e água que auxilia, principalmente no transporte de substâncias.

A exceção à regra está no tecido epitelial. Embora formado por células epiteliais com diferentes formas, como cúbicas, pavimentosas ou colunares, e arranjadas em diferentes camadas (simples, estratificadas ou pseudo-estratificadas), este tecido é freqüentemente caracterizado pela ausência de matriz extracelular. Sua nutrição acaba sendo efetuada pelo tecido conjuntivo vascularizado adjacente.

Maior variação ainda se encontra em alguns tipos de tecido ósseo, como o tecido acelular dos peixes teleósteos, onde há a ausência completa de células ósseas. Neste caso especial, há uma perda progressiva dos osteócitos durante o crescimento do animal, que culmina na sua ausência completa na matriz calcificada do indivíduo adulto (Enlow e Brown, 1956).

TÉCNICAS UTILIZADAS EM HISTOLOGIA

Muitas são as técnicas utilizadas em histologia e não seria possível, neste momento, abordá-las detalhadamente. Deste modo, foram selecionadas algumas técnicas freqüentemente utilizadas em rotinas de laboratórios que proporcionam a visualização das microestruturas dos tecidos.

Confecção de Lâminas Histológicas: Coleta, Fixação, Inclusão e Microtomia

Para a análise sob microscopia óptica é necessária a confecção de lâminas delgadas dos tecidos que formam os órgãos. Estas lâminas podem ser permanentes ou provisórias. A seguir, serão descritas as etapas de confecção de lâminas histológicas permanentes.

Coleta do material

Partes de órgãos são retiradas com o auxílio de um bisturi, pinça ou lâmina de barbear. Não é indicada a extração de porções grandes, uma vez que o objetivo final é a obtenção de uma camada fina que possa ser analisada em um microscópio óptico.

Fixação do material

Esta etapa consiste na utilização de procedimentos físicos ou químicos para imobilizar as substâncias constituintes das células e dos tecidos, fornecendo maior resistência para suportar as demais etapas. Além disso, os fixadores retardam os efeitos *post mortem* do tecido, mantendo sua arquitetura normal. Os agentes fixadores mais utilizados são o formol tamponado e o líquido de Bouin. Ambos fixam as proteínas evitando sua degradação.

O formol, por ser mais acessível e de uso simples, é o fixador mais utilizado nas técnicas histológicas. Contudo, seus resultados geralmente não são satisfatórios. Por essa razão é recomendada a dissolução de formol em tampão fosfatado preparado do seguinte modo (Junqueira e Junqueira, 1983):

- Formol (solução a 37% de formaldeído) _____ 100ml
- Água destilada _____ 900ml
- Fosfato de sódio monobásico _____ 4,0g
- Fosfato de sódio dibásico (anidro) _____ 6,5g

O tempo de fixação dependerá do tamanho do fragmento do tecido, podendo va-

riar entre 06 e 24h. É recomendado que, sempre que possível, não ultrapasse a 3mm de espessura e se utilize, no mínimo, um volume 20 vezes maior de fixador, em relação ao tecido a ser fixado, para que o material reaja satisfatoriamente. Uma vez fixado, a peça deve ser transferida para álcool 70%, onde poderá permanecer indefinidamente.

O fixador de Bouin tem a seguinte fórmula (Junqueira e Junqueira, 1983):

- Solução aquosa saturada de ácido pícrico _____ 75ml
- Formol _____ 25ml
- Ácido Acético _____ 5ml

Após a fixação é fundamental a remoção do ácido pícrico dos tecidos para a posterior etapa de coloração. Além disso, resíduos deste ácido podem favorecer a deterioração da peça com o passar do tempo. Para a eliminação do excesso de fixador dos tecidos é recomendado (Junqueira e Junqueira, 1983):

- 1º) Lavagem em água corrente por 18h;
- 2º) Transferência da peça para álcool 50%, durante 30min;
- 3º) Armazenamento da peça em álcool 70%.

Importante: O conteúdo dos frascos de ácido pícrico deve ser mantido úmido, pois ele é explosivo quando seco (Junqueira e Junqueira, 1983).

Inclusão

Este procedimento consiste na impregnação do tecido com uma substância de consistência firme que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas. Pelo fácil manuseio e bons resultados, a parafina é a mais utilizada neste procedimento. Como ela não é miscível em água, a primeira etapa da inclusão compreende a *desidratação*, quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. A *diafanização* é

a etapa seguinte, com a substituição do álcool, agora presente nos tecidos, por xilol. Finalmente, na *impregnação*, última etapa, o xilol é substituído por parafina fundida a 60° em pequenos blocos. Neste momento a catalogação do bloco é importante para a posterior identificação da peça.

Microtomia

Esta etapa (Fig. 1 A) consiste, basicamente, em utilizar um *micrótopo* para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas. Este aparelho (Fig. 2) é formado por uma lâmina (fixa ou descartável) de aço, afiada, e um braço ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente.

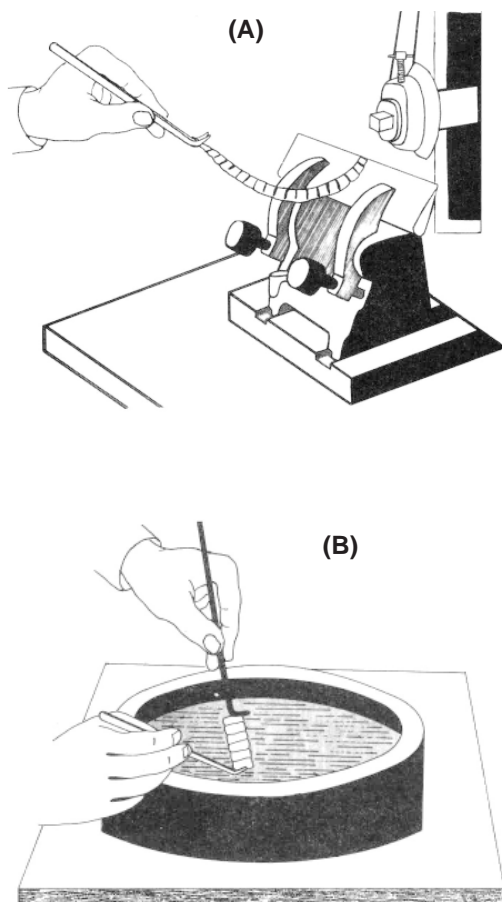


Figura 1. Esquema das etapas de microtomia (A) e distensão da fita em banho-maria (B) (Modificado de Junqueira e Junqueira, 1983).

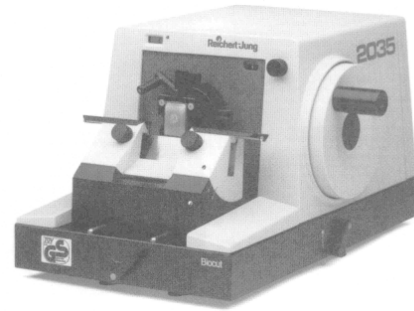


Figura 2. Fotografia de um micrótopo para cortes em resina (Retirado de Junqueira e Carneiro, 1995)

É difícil obter cortes abaixo de 3 a 4 micrômetros de espessura dos materiais incluídos em parafina. De um modo geral, são obtidos cortes entre 5 e 7 micrômetros.

Montagem da lâmina histológica

As fitas obtidas a partir do micrótopo são transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas (Fig. 1 B). A água deve estar entre 3° e 8° abaixo do ponto de fusão da parafina utilizada. Nesta etapa, são retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes são separados individualmente ou em grupos, conforme a conveniência, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e previamente secas. Antes da utilização das lâminas, é necessário revestir suas superfícies com uma fina camada de albumina para facilitar a adesão da peça. Os cortes obtidos podem ser transferidos, inicialmente, para uma estufa onde ficam alguns minutos (não mais que dez minutos) para posteriormente serem colocados em um suporte inclinado. Finalmente, os cortes devem ser depositados em uma estufa a 60° para secagem entre uma e 24 horas.

Técnica de Criomicrotomia (= Microtomia por Congelamento)

A técnica descrita acima, sem dúvida, é a mais utilizada. Contudo, em alguns casos, esta técnica é contra-indicada, como, por exemplo, no estudo da distribuição dos lipídios, em técnicas histoquímicas avançadas ou quando são

necessários cortes urgentes, como em exames patológicos. Nestes casos, os tecidos são endurecidos através do congelamento. Os aparelhos utilizados para os cortes podem ser de dois tipos: **micrótomos de congelamento** ou **criostatos** (Junqueira e Junqueira, 1983).

Nos micrótomos de congelamento (Fig. 3) os tecidos são congelados tanto fixados quanto frescos. O congelamento ocorre por expansão de CO₂ no suporte apropriado para o tecido. Assim como nos micrótomos de parafina, estes micrótomos possuem uma navalha. Contudo, não produzem cortes muito finos. Suas lâminas cortam acima de 10 micrômetros. Outro inconveniente é acertar a temperatura ideal para corte: se estes se fragmentam durante a passagem pela navalha, o tecido está frio demais; se ao contrário, se deformam, o tecido precisa ser resfriado.



Figura 3. Fotografia de um micrótomo para cortes congelados.

O criostato é um aparelho mais aperfeiçoado que o anterior. Permite a obtenção de cortes muito mais finos de tecidos não fixados (até dois micrômetros), facilitando a visualização das células (Junqueira e Junqueira, 1983).

Técnicas de Coloração de Cortes Histológicos

A coloração consiste numa etapa muito importante para a visualização das estruturas do tecido. Normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis, sendo necessário, deste

modo, a remoção da parafina da peça que foi preparada nas etapas descritas anteriormente e que permanece na lâmina de vidro.

Existem muitos tipos de corantes, mas de um modo geral podem ser agrupados em três classes distintas (Gartner e Hiatt, 1999):

- Corantes que diferenciam os componentes ácidos e básicos das células;
- Corantes especializados que diferenciam os componentes fibrosos da matriz extracelular;
- Sais metálicos que precipitam nos tecidos.

Os corantes mais utilizados nos procedimentos histológicos são a Hematoxilina e a Eosina (HE). A Hematoxilina é uma base que cora, preferencialmente, componentes ácidos das células em um tom azulado escuro. Como os componentes ácidos mais abundantes são o DNA e o RNA, tanto o núcleo, quanto certas partes do citoplasma, se tornam azulados. Esses componentes são chamados de basófilos. A Eosina, ao contrário, é um ácido que cora as estruturas básicas da célula de rosa. Estas estruturas são abundantes no citoplasma e são chamadas de acidófilas (Gartner e Hiatt, 1999).

Outros corantes são também utilizados em procedimentos de rotina em laboratórios, tais como (Gartner e Hiatt, 1999):

- Tricrômico de Masson - cora o núcleo de azul escuro, o citoplasma, a queratina e o músculo de vermelho e o mucigênio e o colágeno de azul claro;
- Orceína - cora as fibras elásticas de marrom;
- Weigert - cora as fibras elásticas de azul;
- Prata - cora as fibras reticulares de preto;
- Hematoxilina férrica - cora as estriações dos músculos, os núcleos e os eritrócitos de preto;
- Ácido periódico reativo de Schiff - cora as moléculas ricas em glicogênio e carboidrato de magenta;
- Wright e Giemsa - especializado em células sanguíneas, cora de rosa os eritróci-

tos e os grânulos eosinófilos, de púrpura o núcleo dos leucócitos e grânulos basófilos e de azul o citoplasma dos monócitos e dos linfócitos.

Para corar peças incluídas em parafina é necessária a retirada da parafina e a hidratação da peça. Este procedimento é realizado a partir de uma seqüência de banhos em xilol, álcool e água, inversamente ao procedimento executado na etapa de inclusão. Segundo Junqueira e Junqueira (1983), o procedimento é o seguinte:

- 1º Banho de xilol _____ 5min
- 2º Banho de xilol _____ 2min
- 3º Banho de xilol _____ 1min
- Álcool 100% _____ 1min
- Álcool 95% _____ 1min
- Álcool 70% _____ 1min
- Água _____ 2min

Após a hidratação, os cortes são corados de acordo com o procedimento mais apropriado para a análise que será realizada posteriormente. Aqui serão abordadas as etapas do método da hematoxilina-eosina, por ser o mais utilizado e por ter um resultado final satisfatório.

Técnica da hematoxilina-eosina (HE)

a) Material necessário para a solução de Hematoxilina de Harris (Junqueira e Junqueira, 1983):

- Hematoxilina _____ 2,5g
- Álcool 100% _____ 25ml
- Alúmen de amônio ou potássio _____ 50g
- Água destilada _____ 500ml
- Óxido vermelho de mercúrio _____ 1,25g
- Ácido acético _____ 20ml

Inicialmente, a hemotoxilina deve ser dissolvida no álcool e o alúmen na água destilada (previamente aquecida). Posteriormente,

as duas soluções devem ser misturadas e aquecidas até a fervura. O óxido de mercúrio é adicionado à solução que deve ser resfriada, mergulhando-se o frasco em água fria. O ácido acético é então colocado na solução fria para finalmente ser filtrada.

O prazo de envelhecimento desta solução é entre dois e três meses. A partir desta data o corante perde suas propriedades e não reage adequadamente com o tecido.

b) Material necessário para a Eosina (Junqueira e Junqueira, 1983):

- Eosina solúvel em água _____ 1g
- Água destilada _____ 100ml

c) Procedimentos para a coloração:

Embora as etapas possam ser definidas, o tempo em cada fase depende da qualidade e da idade das soluções dos corantes. Deste modo, poderá ser observada nas etapas abaixo uma variação muito grande em relação ao tempo que pode ser ajustado durante o procedimento no laboratório. De acordo com Junqueira e Junqueira (1983), as etapas são:

- 1º) desparafinar e hidratar os cortes;
- 2º) corar em hematoxilina entre 5 e 15min;
- 3º) lavar em água corrente por 10min;
- 4º) corar em eosina entre 1 e 10min;
- 5º) lavar em água e desidratar em álcool 70% rapidamente;
- 6º) diafanizar e montar em resina.

d) Montagem Final da Lâmina:

Este processo consiste em depositar uma gota de resina líquida sobre o corte que está aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula. Nesta etapa deve-se evitar as bolhas de ar que se formam na resina durante a colocação da lamínula. Finalmente a lâmina é catalogada.

A resina depois de seca garantirá uma lâmina permanente que poderá durar anos.

Técnicas Utilizadas para Confeção de Lâminas Ósseas

Para a confecção de lâminas ósseas são utilizadas duas técnicas: a primeira consiste no *desgaste* do osso através do polimento com lixa (Fig. 4). Inicialmente, é retirado um fragmento do osso a ser analisado. Esse fragmento é colado com bálsamo do Canadá sobre uma superfície de madeira plana. Em um bloco de madeira é colada uma lixa de granulometria grossa para o primeiro polimento. O polimento final é feito com uma lixa mais fina, com movimentos firmes e no mesmo sentido, até que se tenha obtido uma camada de osso delgada. O osso é retirado da madeira com xilol e aderido à superfície da lâmina de vidro. Sobre ele é colocada uma lamínula e fixada com resina (Amaral *et al.* 1994 ; Timm, 1996 a,b).



Figura 4. Confeção de lâminas ósseas por desgaste.

A segunda técnica implica na **descalcificação** do osso. Este procedimento tem por objetivo retirar o fosfato de cálcio do tecido ósseo para que possa ser seccionado posteriormente. A descalcificação pode ser feita através da imersão em ácidos ou compostos quelantes.

Os quelantes capturam os íons metálicos (entre os quais o cálcio), removendo-os dos tecidos com um mínimo de alteração. Embora de ação mais lenta, agredem menos o tecido, e são mais utilizados nos procedimentos histológicos. Uma das fórmulas mais usadas, segundo Junqueira e Junqueira (1983):

- Etileno Diamino Tetra Acetato (EDTA) __ 5,5g
- Água _____ 90ml
- Formol _____ 10ml

Após a fixação, o material é lavado para retirar o excesso de fixador e transferido para um descalcificador. Não é recomendado utilizar fragmentos maiores do que 3mm de diâmetro. Deve-se usar, no mínimo, 40 vezes o volume do tecido, agitando o frasco várias vezes ao dia e trocando o descalcificador a cada 2 ou 3 dias. Os tecidos descalcificados não devem ser transferidos diretamente ao álcool 70%, e sim, lavados em água corrente por algumas horas.

Para a confecção das lâminas histológicas de ossos descalcificados seguem-se as etapas rotineiras citadas anteriormente.

Microscopia Óptica de Alta Resolução

A microscopia óptica utiliza cortes delgados e preparados com qualquer uma das técnicas descritas anteriormente, com o objetivo de estudar a morfologia celular. A resolução das estruturas pela microscopia óptica é da ordem de 0,2 micrômetros. Na prática histológica em parafina, raramente é inferior a 0,6 micrômetros, o que mesmo assim proporciona um bom resultado visual (Stevens e Lowe, 1995).

O microscópio óptico possui um arranjo específico de grupos de lentes para ampliar a imagem do tecido. Como tem mais que uma lente, freqüentemente é conhecido como microscópio composto. A fonte de luz provém de um bulbo elétrico com um filamento de tungstênio, cuja luz conflui para um feixe focal através das lentes do condensador. Microscópios mais antigos não possuem sua própria fonte de luz, necessitando do auxílio de uma luminária que projeta a luz para um espelho situado na base do microscópio que a reflete para o condensador.

Em ambos os casos, o feixe de luz atravessa o tecido delgado fixado na lâmina histológica e penetra em uma das lentes objetivas. Estas lentes estão situadas em um cilindro móvel conhecido como canhão. Normalmen-

te, existem quatro lentes objetivas que ampliam a imagem em 4, 10 e 40 vezes e uma lente de imersão que amplia a imagem em 100 vezes, onde deve ser utilizado um óleo mineral.

A imagem das objetivas conflui e posteriormente é aumentada pela lente ocular que normalmente amplia a imagem em um múltiplo de 10. A imagem ampliada pela objetiva deve ser multiplicada pelo valor da ocular para a obtenção do valor de aumento total.

A focalização da imagem é obtida através do uso de parafusos que movem as lentes objetivas para cima e para baixo. O parafuso macrométrico move-se em intervalos maiores que o parafuso micrométrico. A imagem projetada na retina é invertida da direita para a esquerda e de cima para baixo (Gartner e Hiatt, 1999).

Microscopia Eletrônica

Nos microscópios ópticos, as lentes focalizam a luz visível (feixe de fótons). Nos microscópios eletrônicos, os eletromagnetos focalizam um feixe de elétrons. A resolução é cerca de mil vezes maior do que a de um microscópio óptico, podendo ampliar em 150.000 vezes a imagem de um objeto, o que permite, por exemplo, a visualização de macromoléculas como DNA (Gartner e Hiatt, 1999).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A preparação de amostras de tecido para o MET (Fig. 5) envolve as mesmas etapas básicas da microscopia óptica. Contudo, fixadores especiais têm sido desenvolvidos, uma vez que as ligações cruzadas entre proteínas devem ser mais finas em função da alta resolução do aparelho. Estes fixadores incluem soluções tampoadas de glutaraldeído, paraformaldeído, tetróxido de ósmio e permanganato de potássio que não só atuam na preservação das ultraestruturas, como também atuam como corantes elétrons-densos. Para a inclusão também foi desenvolvida uma resina especial, como a resinas epóxi e o bloco resultante não maior do que 1mm^3 (Gartner e Hiatt, 1999). Os cortes devem ser ultrafinos, na ordem de 0,1 micrômetro de espessura (Stevens e Lowe, 1995).



Figura 5. Fotografia de um Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).

Os feixes de elétrons são produzidos numa câmara a vácuo pelo aquecimento de um filamento de tungstênio, o cátodo. Os elétrons são atraídos para o anódio, carregado positivamente, numa placa de metal em forma de amêndoa com um orifício central. O feixe de elétron é focalizado no material através de eletromagnetos análogos às lentes do condensador do microscópio óptico.

Os tecidos são corados com metais pesados (urânio ou chumbo) que precipitam nas membranas lipídicas, fazendo com que os elétrons percam parte da sua energia cinética à medida que interagem com o tecido. Os elétrons que deixam os tecidos estão sujeitos aos campos magnéticos de muitos eletromagnetos adicionais, que focalizam o feixe numa placa fluorescente. À medida que os elétrons alcançam a placa, sua energia cinética é convertida em pontos luminosos. É feito um registro permanente da imagem resultante, através da substituição de um filme sensível ao elétron no local da placa fluorescente, com a produção de um negativo a partir do qual pode ser impressa uma fotomicrografia em preto e branco (Gartner e Hiatt, 1999; Stevens e Lowe, 1995).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Diferentemente da MET, a Microscopia Eletrônica de Varredura é utilizada para observar a superfície de um espécime sólido (ao invés de cortes), proporcionando uma imagem tridimensional (Fig. 6). O material é preparado com uma camada de metal pesado como ouro ou paládio, depositado na sua superfície. Conforme o feixe de elétrons varre a superfície do material, alguns se refletem (elétrons de dispersão) e outros são ejetados (elétrons secundários) a partir da cobertura do metal pesado. Estes elétrons são capturados por detectores, interpretados, coletados e mostrados em um monitor com uma imagem tridimensional. A imagem pode ser fotografada ou digitalizada (Gartner e Hiatt, 1999).



Figura 6. Fotografia de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

Criofratura

Tecidos congelados rapidamente, mas tratados com criopreservativos, não desenvolvem cristais de gelo durante o processo de congelamento e, por isso, não sofrem dano mecânico. Quando seccionado por uma navalha fria, o tecido sofre fratura de acordo com o plano de clivagem, nas regiões com menos pontes moleculares. Nas células, a fratura tende a ocorrer entre as camadas interna e externa das membranas. A face fraturada é coberta por platina ou carbono, formando acúmulos em apenas um dos lados da projeção, o que gera uma réplica da superfície. O tecido é então re-

tirado e a réplica é examinada ao microscópio eletrônico de transmissão, revelando, por exemplo, as proteínas intercalares da membrana endoplasmática (Gartner e Hiatt, 1999).

Fracionamento Celular

Esta técnica permite que células inteiras sejam rompidas de maneira controlada. As diferentes partículas que resultam são separadas para análise funcional ou estrutural, através da centrifugação das células rompidas em soluções especializadas de densidade conhecida, à alta velocidade. Os núcleos, as mitocôndrias, os retículos endoplasmáticos e os ribossomos podem ser isolados em forma relativamente pura (Stevens e Lowe, 1995).

INTERPRETAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS

Analisar uma lâmina histológica pode ser uma tarefa difícil. O primeiro passo é entender o que se está observando. O órgão antes tridimensional, agora está seccionado, preparado, corado e fixado em uma lâmina de vidro. As estruturas, quando cortadas transversalmente, se apresentam de modo distinto de quando cortadas longitudinalmente. Alguns planos de corte podem ser observados na Fig. 7.

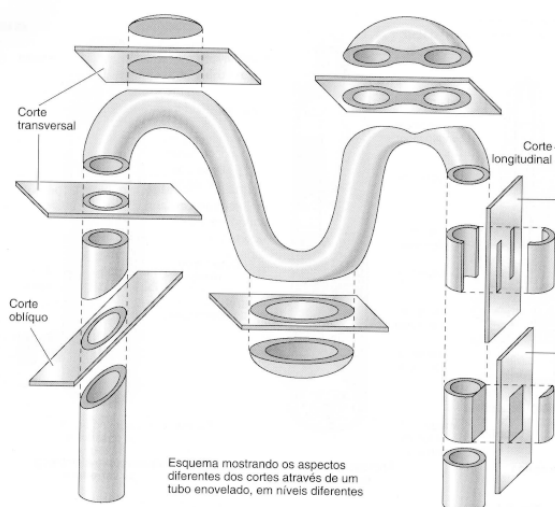


Figura 7. Tipos de cortes que podem ser obtidos (Retirado de Gartner e Hiatt, 1999).

Entendido isto, basta ter atenção aos detalhes, desenhar o que se está sendo observado e acompanhar esta tarefa com um atlas histológico. O mundo das microestruturas anatômicas (Fig. 8) pode ser bem interessante. Visualizar a base de todo organismo vivo, sua relação com outras células, sua organização em tecidos e entender que somos um conjunto de estruturas vivas formando um único ser fazem parte da formação de todo biólogo.

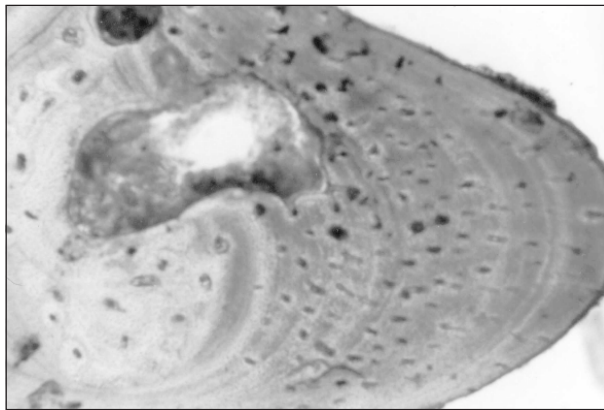


Figura 8. Corte histológico da costela de *Caiman latirostris* realizado pelo método de desgaste. Secção transversal. Aumento: 96x. (Retirado de Timm, 1996b).

AGRADECIMENTO

Ao técnico administrativo Paulo Roberto Peres Carvalho do Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME) pela permissão de fotografar os Microscópios Eletrônicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, Daoiz Mendoza; MENDONÇA, Olavo Valmor; LAURINO, Laviera B. **Patologia óssea – Fundamentos.** São Paulo: BYK, 1994.

ENLOW, Donald H.; BROWN, Sidney O. A comparative histological study of fossil and recent bone tissues. Part 1. **The Texas Journal of Science**, p. 405-443, 1956.

GARTNER, Leslie P.; HIATT, James L. **Tratado de histologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

JUNQUEIRA, Luis Carlos U.; JUNQUEIRA, Luiza Maria M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Santos, 1983.

STEVENS, Alan; LOWE, James. **Histologia.** São Paulo: Manole, 1995.

TIMM, Lílian de L. Preliminary data on the pachyostosis in rib of the *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia). In: Sessão da Academia Brasileira de Ciências, 1996a, **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** Porto Alegre: UFRGS/ILEA, 1996a. p. 296.

_____. **Estudo paleo-histológico acerca da paquiostose em mesossauros.** 1996b. 181f. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996b.