

## Avaliação de diferentes fixadores na preservação das características histológicas de pele de orelha de cães

[Evaluation of different fixatives for histological studies in canine ear skin]

L.S. Campos<sup>1</sup>, W.L. Tafuri<sup>2</sup>, A.J.W. Pinto<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária FEAD-Minas – Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – ICB-UFMG – Belo Horizonte, MG

### RESUMO

Os fixadores biológicos desempenham um papel importante na qualidade final da histologia. Na rotina veterinária, a biópsia de pele é um procedimento comum e a escolha do fixador é primordial para resultado final adequado. Os fixadores mais usados são à base de formalina, ainda que sejam tóxicos, cancerígenos, de baixa penetração e de fixação lenta. Mesmo assim, não existe um fixador ideal que substitua as suas qualidades. O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente a preservação das características histológicas de pele de cão utilizando diferentes fixadores de tecidos incluídos em parafina, cortados e corados pela hematoxilina-eosina. Utilizou-se uma caneta Punch de 4 milímetros para coletar amostras de pele de orelha em seis cadáveres de cães. Após coleta, os tecidos foram fixados em: (1) Bouin, durante seis horas; (2) Carnoy, durante quatro horas; (3) formaldeído tamponado 10% durante 24 horas, todos sob refrigeração (4°C). Posteriormente, os tecidos foram processados, cortados e corados em hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas, às cegas, por quatro patologistas diferentes, que consideraram aspectos qualitativos a seguir: (1) qualidade da coloração; (2) preservação das características histológicas; e (3) preservação dos limites citoplasmáticos utilizando a escala de LIKERT de pontuação para cada lâmina. O fixador com a maior média de pontuação em todos os itens foi o formol tamponado com 3,76 pontos, seguido pelo Bouin (3,39) e pelo Carnoy (2,52). O formol pode trazer riscos à saúde do profissional que rotineiramente o manuseia, portanto se faz necessária a busca por fixadores com as mesmas qualidades, mas menos nocivos à saúde.

Palavras-chave: cão, formol, Bouin, Carnoy, histologia

### ABSTRACT

*The biological fixatives have an important role in the final histology quality. In veterinary, routine skin biopsy is a common procedure and the choice of fixative is essential for the final result. The most common fixative is Formalin, even though it is toxic, carcinogenic, and has low and slow penetration. Still, there isn't a fixer which can replace the qualities of formalin. The aim of this study was to evaluate qualitatively the preservation of the histological features of dog skin using different tissue fixative embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin - eosin. We used a 4 mm punch pen to collect ear skin samples in six dog cadavers. After collection, the tissues were fixed in: (1) Bouin for 6 hours; (2) Carnoy for 4 hours; (3) 10% buffered formaldehyde for 24 hours, all under refrigeration (4 ° C). The tissues were then processed, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. The slides were evaluated blindly by four different pathologists who considered the qualitative aspects below: (1) quality of coloring; (2) preservation of the histological characteristics; (3) preservation of cytoplasmic boundaries using a Likert scale score for each blade. The fixative with the highest mean score on all items was buffered formalin with 3.76 points followed by Bouin (3.39) and Carnoy (2.52). Formaldehyde can bring health a risk of professional routine handling, so it is necessary to search for a biological fixative with the same qualities being less harmful to health.*

*Keywords: dog, formaline, Bouin, Carnoy, histology*

---

Recebido em 16 de julho de 2015

Aceito em 1 de março de 2016

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: aldairwpinto@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A histologia é uma ferramenta de extrema relevância para o diagnóstico de determinadas doenças. Portanto, fixadores teciduais desempenham um papel importante na qualidade do processamento histológico com consequência direta para a análise microscópica. A etapa de fixação consiste na utilização de procedimentos químicos para estabilizar e fornecer resistência para as demais etapas do processamento de um tecido para confecção de lâminas histológicas, além de retardar as alterações *post mortem*, mantendo a arquitetura do tecido (Timm, 2005). De um modo geral, os fixadores têm como função insolubilizar as proteínas do tecido, prevenir autólise, facilitar o corte dos tecidos, permitir a penetração dos corantes, estabilizar os componentes estruturais e proteger o histologista por meio das propriedades antissépticas das substâncias (Banks, 1992; Junqueira e Carneiro, 1999). Algumas das soluções que podem ser utilizadas no processo de fixação de biópsias são: (1) solução de formaldeído tamponado 10% (FT), (2) solução de Bouin, (3) solução de Carnoy, entre outras. Os fixadores são utilizados com a finalidade de não permitir o surgimento de alterações no tecido e, conseqüentemente, na formação de artefatos na histologia. A solução de FT é um fixador de escolha universal, entretanto pode trazer riscos à saúde de quem manuseia essa solução rotineiramente (Buesa, 2008). A solução de Bouin é ideal para fixação de glândulas, testículos endométrio e pele. Entretanto, ainda existem controvérsias quanto ao uso deste fixador para inclusão em solução diferentes da parafina. Já o Carnoy é um fixador à base de álcool muito utilizado para fixações rápidas e penetrantes, em tecidos extraídos de biópsias (patologia cirúrgica), como neoplasias gástricas, por exemplo, além de ser utilizado em técnicas de imuno-histoquímica e preservação de DNA e mRNA (Vasconcelos, 1988; Buesa, 2008; Dias *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015).

Na rotina clínica veterinária, a biópsia de pele é um procedimento comum, considerado padrão-ouro em casos de suspeita de doenças neoplásicas e inflamatórias desse tecido. Para a sua realização, é necessário precaução com o local de coleta e *expertise* quanto à escolha da técnica de biópsia, assim como os fixadores usados (Souza, 2009; Werner, 2009). A padronização do processamento da biópsia para

confecção de lâminas histológicas é extremamente importante para obtenção de uma conclusão diagnóstica ideal. O melhor momento para a coleta do material deve ser após a intervenção cirúrgica ou logo após a morte, em caso de exame *post mortem*, para assim evitar as alterações causadas pelo processo de autólise (Pires, 2002). Na rotina veterinária, a biópsia de pele é um procedimento que exige atenção e cuidado, e a escolha do fixador é primordial para a confecção de lâminas histológicas de qualidade que conferem ao patologista qualidade histológica para um diagnóstico adequado. O objetivo deste trabalho foi avaliar qualitativamente a preservação das características histológicas de pele de cão utilizando diferentes fixadores de tecidos incluídos em parafina, cortados e corados pela hematoxilina-eosina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de pele de orelha em seis cadáveres de cães, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte (CCZ), utilizados em aulas práticas da disciplina de Patologia Veterinária do curso de medicina veterinária da Faculdade de Estudos Administrativos FEAD-MG. Os cadáveres foram cedidos pelo CCZ em virtude de uma parceria com a instituição. Todos os cães utilizados eram sorologicamente positivos para leishmaniose visceral canina e foram eutanasiados no CCZ devido ao programa de controle da leishmaniose visceral canina do município.

As amostras foram coletadas utilizando-se um instrumento cirúrgico descartável de corte circular, popularmente conhecido como caneta punch de 4mm (Brasmed, Brasil), na região média da face interna da orelha direita de seis cadáveres caninos, sem raça, sexo e idade definidos, de aproximadamente 10kg. Após a utilização do punch, foram extraídos os fragmentos com ajuda de uma tesoura curva ponta fina (Brasmed, Brasil) e imediatamente colocados nos seguintes fixadores: (1) Bouin, por período máximo de seis horas; (2) Carnoy, por período máximo de quatro horas e (3) formaldeído tamponado 10%, por um período máximo de 24 horas, todos mantidos sob refrigeração (4°C). Após a fixação, as amostras foram processadas em histotécnico automático (AutoTechnicon, Model 2A, The Technicon

Company, USA) para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo manual (American Optical, Rotary 820, Leyca®, Alemanha), sendo realizados três cortes histológicos para cada lâmina, em um total de seis lâminas por bloco. A espessura do corte foi de 4µm, e as lâminas foram previamente desengorduradas com solução álcool-éter PA (1:1). As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) e montadas em lamínulas banhadas em solução gelatinosa de fixação. Todas as soluções, processamento e colorações foram realizados no Laboratório de Patologia das Leishmanioses do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e todo o processamento foi realizado por apenas um profissional técnico do laboratório.

Quatro patologistas fizeram a leitura de cada tecido em cada lâmina sem conhecimento prévio do processamento delas. Foi designado a cada avaliador um questionário sobre cada lâmina que deveria ser avaliada por tempo indeterminado, a critério do avaliador. Esse questionário considerava os aspectos qualitativos de cada lâmina e atribuía pontuação pela escala de LIKERT de 1 a 5 sendo: 1 – péssimo, 2 – ruim, 3 – razoável, 4 – bom e 5 – excelente. Nesta etapa, os avaliadores consideram os seguintes parâmetros: (1) qualidade da coloração: correlação das características de penetração, intensidade e visualização do corante; (2) preservação das características estruturais: avaliação referente à preservação da morfologia tecidual, presença de artefatos (rupturas, marcas de navalha, sujidades, retração e dobramento do tecido) e características da matrix extracelular; (3) limites citoplasmáticos: conservação dos limites celulares, estruturas intracitoplasmáticas, identificação de diferentes tipos celulares.

Após a compilação dos resultados, foi feito um agrupamento das lâminas de grupo de fixadores (FT, Bouin e Carnoy) e o somatório de pontos de cada grupo. Posteriormente, foi feita uma média de pontuações de cada grupo.

## RESULTADOS

Os tecidos fixados em FT, Bouin e Carnoy apresentaram odor característico e fortemente impregnado durante todo seu processamento. Em alguns casos, os tecidos fixados em Carnoy apresentaram fragmentação e estes foram visualizados no interior do recipiente onde foram armazenados. Adicionalmente, tecidos fixados em Carnoy e Bouin tiveram que ser manuseados com uso de máscara e óculos de proteção pelo profissional técnico responsável pelo processamento devido ao forte odor do clorofórmio e ácido acético contido no Carnoy e do ácido pícrico contido no Bouin.

Os materiais fixados com Bouin tiveram, durante a microtomia, uma maior facilidade de serem cortados dos blocos, devido à consistência do tecido incluído na parafina. Os tecidos fixados em FT e Carnoy obtiveram maior resistência ao corte em micrótomo manual quando comparados aos tecidos fixados com Bouin. Entretanto, os tecidos fixados com FT apresentaram uma consistência rígida, porém quebradiça, o que dificultava o microtomista de extrair do bloco o tecido inteiro. Este resultado não se aplicou aos outros dois fixadores.

De acordo com a avaliação dos quatro patologistas, o fixador que obteve a maior média foi o FT, seguido pelo Bouin e pelo Carnoy. Com relação à qualidade da coloração, o FT teve como média 4,29167 pontos, seguidos do Bouin (3,85833) e do Carnoy (2,95833). Quando avaliada a preservação das características estruturais do tecido, o FT obteve melhor média, seguido do Bouin e do Carnoy. Quanto à preservação dos limites citoplasmáticos, o FT obteve média superior quando comparado ao Bouin e ao Carnoy (Tab. 1).

As observações feitas pelos avaliadores revelaram que uma característica marcante negativamente na qualidade da coloração de tecidos fixados em Bouin e em Carnoy foi a intensa penetração do corante na matriz extracelular.

Tabela 1. Média de pontuações para cada fixador nos critérios avaliados

Fixador	Qualidade da coloração	Preservação das características	Limites citoplasmáticos	Média geral
Bouin	3,85833	3,23333	3,1	3,39722
Carnoy	2,95833	1,95833	2,66667	2,52778
FT	4,29167	3,75	3,25	3,76389

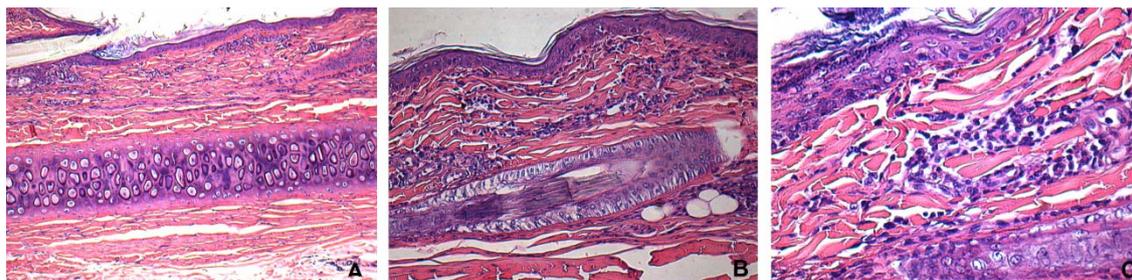


Figura 1. Fotomicrografia de biópsia de peles de orelhas de cão fixadas com formol tamponado 10%. Evidenciar em (A) e (B) o panorama do tecido e em (C) o detalhe identificando as características citoplasmáticas das células inflamatórias e da preservação da coloração da matriz extracelular. 10x em (A), 20x em (B) e 40x em (C) HE.

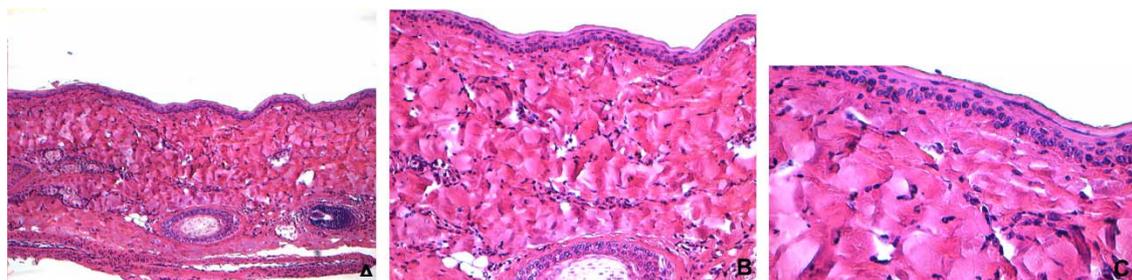


Figura 2. Fotomicrografia de biópsia de peles de orelhas de cão fixadas com Bouin. Evidenciar em (A) e (B) o panorama do tecido e em (C) o detalhe. Em (A) e (B) identificar a grosseira e intensa coloração da matriz extracelular. Apesar da qualidade e preservação dos limites citoplasmáticos das células do epitélio, os fibroblastos na derme, às vezes, confundem-se com células inflamatórias mononucleares pela intensa marcação de corante dos núcleos celulares e da matriz extracelular. 10x em (A), 20x em (B) e 40x em (C) HE.

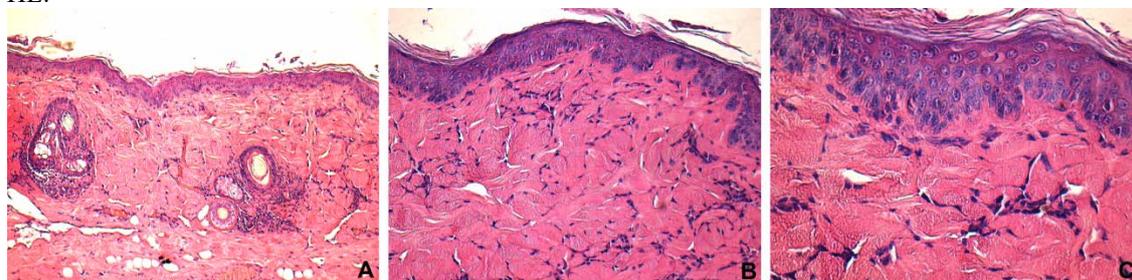


Figura 3. Fotomicrografia de biópsia de peles de orelhas de cão fixadas com Carnoy. Evidenciar em (A) e (B) o panorama do tecido e em (C) o detalhe. Em (A) e (B) identificar a grosseira e intensa coloração da matriz extracelular que se assemelha à coloração de HE em tecido muscular. A qualidade e a preservação dos limites citoplasmáticos são discretamente distorcidas pela eosinofilia excessiva, apesar de a visualização de nucléolos celulares ser evidente. 10x em (A), 20x em (B) e 40x em (C) HE.

## DISCUSSÃO

Trabalhos realizados com fixador Carnoy (metanol Carnoy) mostraram que esses fixadores à base de álcool são excelentes para fixação e armazenamento de tecidos para estudos de imuno-histoquímica e extração de mRNA quando estes não podem ser feitos a fresco. A preservação do tecido é extremamente dependente do período de fixação, e alguns trabalhos relatam o uso do Carnoy por períodos de tempo variados: desde 30 minutos até 22 horas de fixação (Rieger *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015). Entretanto, a padronização do tempo de fixação é dependente do tipo de tecido, do tamanho da amostra, da técnica de avaliação submetida e de diferentes fatores térmicos, como a conservação destes sob refrigeração ou em temperatura ambiente. Porém, alguns autores não recomendam a fixação em temperaturas elevadas quando estas serão submetidas à técnica de imuno-histoquímica (Chiarini-Garcia *et al.*, 2011).

Um achado rotineiro durante o processamento e a confecção de lâminas histológicas são as retrações e os dobramentos dos tecidos. Estes fatores interferem diretamente no resultado final e na qualidade da histologia. Outros fatores que podem interferir na qualidade final da histologia são: (1) a qualidade dos reagentes e corantes, (2) a experiência do profissional que realiza o processamento, (3) a padronização das etapas de processamento (Loreto *et al.*, 1997; Tostes e Bandarra, 2002; Werner, 2009).

Os fixadores de material biológico utilizados também são decisivos para a qualidade final da histologia. Alguns fixadores, como aqueles utilizados no presente estudo, quando usados em tempos e temperaturas variáveis, podem influenciar no surgimento de artefatos e comprometer a qualidade final do processamento histológico. Tecidos fixados em Carnoy e FT por longos períodos podem levar o tecido ao endurecimento excessivo e, conseqüentemente, à fragmentação deste durante o processamento, ocasionando retrações ou dobramentos. Este fato pode agravar em casos de tecidos menores, como aqueles tecidos extraídos por biópsias (Amaral *et al.*, 2004; Chiarini-Garcia *et al.*, 2011). No presente estudo, foi relatado que a retração tecidual ocorreu frequentemente em tecidos fixados por FT, quando incluídos em parafina.

Para resolver este problema com outros fixadores, Chiarini-Garcia *et al.* (2011) relatam a utilização, durante a confecção das lâminas, de uma chapa quente onde é passada a lâmina histológica por cerca de três a cinco segundos após a adesão do tecido cortado, a fim de evitar retração dele. Entretanto, estes autores utilizaram o glicol metacrilato em substituição da parafina como material de inclusão das amostras biológicas. Neste caso, esta técnica também foi necessária para evitar a formação de dobramentos do tecido em conseqüentemente, a formação de artefatos na histologia.

Amaral *et al.* (2004) demonstraram que os tecidos extraídos de biópsias de endométrio de éguas fixados em formalina e incluídos em resina de glicol metacrilato apresentaram melhores resultados à microscopia de luz quando comparados aos tecidos fixados por Bouin. Resultados semelhantes em cães puderam ser observados no presente estudo. Em contrapartida, resultados no laboratório de pesquisa da UFMG, que trabalharam com diversos tecidos de cães fixados em Carnoy e FT e incluídos tanto em glicol metacrilato quanto em parafina, mostraram que tecidos fixados em Carnoy e incluídos em glicol metacrilato apresentam qualidade histológica superior quando comparados aos mesmos tecidos fixados em FT e incluídos em parafina. Estes resultados foram superiores para as seguintes colorações: (1) hematoxilina-eosina; (2) azul de toluidina; (3) ácido periódico de Schiff (PAS); (4) prata amoniacal e (5) Dominici (dados não publicados). Entretanto, estes resultados não se aplicaram quando tecidos fixados em Carnoy e incluídos tanto em glicol metacrilato quanto em parafina foram submetidos às diversas técnicas de imuno-histoquímica. Contudo, trabalhos mostram como resultados a utilização de técnicas de imuno-histoquímica para marcações de membrana e núcleos celulares em tecidos fixados em Carnoy e concluem que os fixadores à base de álcool são excelentes ferramentas para este tipo de estudo (Milcheva *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos descrevem o Carnoy como sendo um importante fixador para imuno-histoquímica, conservação de DNA e mRNA, além de apresentar preservação de morfologia celular igual ou superior ao FT (Cox *et al.*, 2006; Delfour *et al.*, 2006). Neste trabalho, foi demonstrado que o Carnoy foi inferior ao Bouin

e ao FT. Este resultado pode estar associado a dois principais fatores: (1) a fixação de tecido de pele apresenta baixa celularidade e abundância de matriz extracelular e (2) por ser tecido extraído de biópsia e devido a sua pequena espessura (aproximadamente 2cm), deveria ter sido reduzido o tempo de fixação para menos de 30 minutos. Em outros tecidos, como estômago, intestinos e tecidos extraídos de biópsias retais, já foram relatados associados a uma excelente fixação tanto em Carnoy quanto em Bouin (Puchtler *et al.*, 1970; Mitchell *et al.*, 1985; Milcheva *et al.*, 2012; Rieger *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015).

O uso do FT foi superior, entre os quesitos avaliados, na qualidade final da histologia quando comparado a outros fixadores. Entretanto, trabalhos como o de Buesa (2008) descrevem algumas desvantagens do uso da formalina como fixador: (1) é potencialmente tóxico e cancerígeno, (2) é pobre na preservação de ácidos nucleicos e (3) o processo de fixação é lento e pouco penetrante. Mas, por outro lado, os autores afirmam que ainda não existem substitutos quando se compara relação custo-benefício deste.

Tecidos fixados em fixadores à base de alcoóis ainda precisam de maiores estudos para avaliação das suas características quando comparados ao uso do FT tanto nos aspectos histológicos quanto naqueles relacionados à biossegurança do profissional que manuseia as amostras. O uso do FT pode trazer riscos à saúde do profissional que trabalha diretamente com ele durante a confecção de lâminas histológicas, principalmente quando utilizado rotineiramente, portanto se faz necessária a busca por fixadores com as mesmas qualidades do FT, porém menos nocivo à saúde (Buesa, 2008).

### CONCLUSÃO

O presente estudo revela que amostras de pele de orelha de cães fixadas com FT, por período máximo de 24 horas sob refrigeração (a 4°C), apresentam melhores resultados quanto à qualidade histológica quando comparado com os fixadores Bouin e Carnoy. Entretanto, o fixador FT demonstrou maior predisposição ao surgimento de artefatos como retração e dobramento tecidual.

### AGRADECIMENTOS

Ao Centro Especializado em Histologia Cajal (CEHC); aos técnicos do Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); à Dra. Izabela Ferreira Gontijo de Amorim e à Dra. Carolina Carvalho de Souza, pelas contribuições; à Faculdade de Estudos Administrativos de Minas Gerais FEAD-MG; ao coordenador do curso de Medicina Veterinária da FEAD, Prof. Paulo Gabriel Pereira da Silva Júnior, e ao Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte, MG. A FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) APQ-01378-12 e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) 474665/2012-7 e 303022/2013-2.

### REFERÊNCIAS

- AMARAL, D.; CHIARINI-GARCIA, H.; VALE FILHO, V.R.; ALLEN, W.R. Efeito dos fixadores formalina e Bouin na preservação de biópsias de endométrio de éguas após inclusão em resina plástica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.7-12, 2004.
- BANKS, W.J. *Histologia veterinária aplicada*. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 627p.
- BUESA, R.J. Histology without formalin? *Ann. Diagn. Pathol.*, v.12, p.387-96, 2008.
- CHIARINI-GARCIA, H.; PARREIRA, G.G.; ALMEIDA, F.R. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. *Methods. Mol. Biol.*, v.689, p.3-18, 2011.
- COX, M.L.; SCHARAY, C.L.; LUSTER, C.N. *et al.* Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp. Mol. Pathol.*, v.80, p.183-91, 2006.
- DELFOUR, C.; ROGER, P.; BRET, C. *et al.* RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. *J. Mol. Diagn.*, v.8, p.157-169, 2006.

- DIAS, A.R.; PEREIRA, M.A.; MELLO, E.S. *et al.* Carnoy's solution increases the number of examined lymph nodes following gastrectomy for adenocarcinoma: a randomized trial. *Gastric Cancer*, v.19, p.136-142, 2014.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. *Histologia básica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.427.
- LORETO, C.; MAEDA, M.Y.S.; UTAGAWA, M.L. Garantia de qualidade em citopatologia: aspectos da correlação cito-histopatológica. *Rev. Assoc. Med. Brasil.*, v.43, p.195-198, 1997.
- MILCHEVA, R.; JANEGAA, P.; CELEC, P. Alcohol based fixatives provide excellent tissue morphology, protein immunoreactivity and RNA integrity in paraffin embedded tissue specimens. *Acta Histochem.*, v.115, p.279-289, 2012.
- MITCHELL, F.; IBRAHIM, S.; GUSTERSON, B.A. Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified methacarn fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, v.33, p.491-495, 1985.
- PEREIRA, M.A.; DIAS, A.R.; FARAJ, S.F. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology*, v.66, p.388-397, 2015.
- PIRES, M.A. Recolha e envio de material para análise histopatológica. In. CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002, Oeiras. *Anais...* Oeiras: SPCV, 2002. p.229-238.
- PUCHTLER, H.; WALDROP, F.S.; MELOAN, S.N. *et al.* Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. *Histochem. Cell Biol.*, v.21, p.97-116, 1970.
- RIEGER, J.; TWARDZIOK, S.; HUENIGEN, H. Porcine intestinal mast cells. Evaluation of different fixatives for histochemical staining techniques considering tissue shrinkage. *Eur. J. Histochem.*, v.57, p.133-142, 2013.
- SOUZA, T.M. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta da dermatopatologia. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.29, p.177-190, 2009.
- TIMM L.L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. *Cad. Salle XI*, v.2, p.231-239, 2005.
- TOSTES, R.A.; BANDARRA, E.P.; Biopsia hepática em cães: relação entre qualidade da amostra e grau de conclusão do diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.468-472, 2002.
- VASCONCELOS, A.B. *Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária*. Brasília: Associação Brasileira Agrícola Superior, 1988. 74p.
- WERNER, B. Biópsia de pele e seu estudo histológico. Por quê? Pra quê? Como? Parte II. *An. Bras. Dermatol.*, v.84, p.507-513, 2009.