

Nathalia Guimarães¹

**O PASSADO MEDIDO EM MICRÔMETROS:
TRAJETÓRIAS E POSSIBILIDADES DA
PALEOHISTOLOGIA HUMANA**

***THE PAST MEASURED IN MICRONS:
TRAJECTORIES AND POSSIBILITIES OF
HUMAN PALAEOHISTOLOGY***

¹ The Australian National University, ndg0601@gmail.com.

RESUMO

A paleohistologia é uma ferramenta com diversas possibilidades de aplicação em contextos arqueológicos, como, por exemplo, na estimativa de idade dos indivíduos, auxílio no diagnóstico de doenças que atingem os ossos, entendimento das estratégias de subsistência e dieta, descrição de processos tafonômicos e na diferenciação entre osso humano e não humano. Apesar das muitas possibilidades relacionadas à técnica, algumas das limitações, como o fato de se tratar de um método invasivo de pesquisa, fazem com que a paleohistologia seja muito pouco usada em contextos sul-americanos, contando com apenas dois estudos. Este artigo busca trazer um panorama geral, histórico e metodológico, apresentando as possibilidades e limitações trazidas pelos estudos paleohistológicos, bem como uma breve reflexão acerca dos desafios e potencialidades que se relacionam ao início das pesquisas em paleohistologia no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Paleohistologia; Paleohistopatologia; Histomorfometria; Histomorfologia; Histotafonomia.

ABSTRACT

Palaeohistology is a tool with several practices that can be applied in archaeological contexts. Some of the possibilities include, the age-at-death estimation, the diagnosis of diseases that may affect bone, for comprehension of subsistence strategies and diet, descriptions of taphonomic processes, and differentiation between human and non-human bones. Despite the numerous applications, palaeohistology does come with some limitations, due to its invasive nature. This leaves the method as a rarely used technique for South American contexts, with only two case studies in which palaeohistology has been employed. This paper aims to construct a general historical and methodological overview of the technique, presenting the possibilities and limitations associated with the palaeohistological approach. It will also present a brief reflection on the challenges, as well as the potentials related to the beginning of paleohistology research in Brazil.

KEYWORDS: Palaeohistology; Palaeohistopathology; Histomorphometry; Histomorphology; Histotaphonomy.

INTRODUÇÃO

A invenção do microscópio trouxe um mundo novo, nunca antes visto a olho nu, revolucionando diversas áreas do conhecimento. Apesar de grande parte das pesquisas em antropologia biológica focarem em marcadores macroscópicos, é possível, também, partir de uma abordagem microscópica, trazendo para discussão um outro ponto de vista com bastante potencial. Paleohistologia é o ramo da antropologia biológica que investiga as estruturas microscópicas do osso e a forma como essas microestruturas respondem a estímulos internos e externos. Ossos são tecidos dinâmicos, dinâmica essa relacionada a diversos fatores, como dieta, atividade física, idade, hormônios e sexo; apresentam duas características que, juntas, fazem com que esse tecido seja uma importante fonte de informações sobre a vida no passado: resistência e dinamicidade. Resistência, aqui, refere-se não apenas à resistência a cargas biomecânicas, mas também à resistência ao tempo, característica fundamental para qualquer estudo arqueológico. Assim, diversas análises são possíveis; em grande parte delas, utilizam-se marcadores macroscópicos nas avaliações, como é o caso da maioria das análises de paleopatologia, análises morfométricas e paleodemografia. Porém, as respostas ósseas a estímulos externos e internos pode ser vista e estudada, também, a nível microscópico. Vários fatores como idade, sexo, dieta, saúde, genética e atividade física afetam o osso a nível microscópico, e, assim, o campo de estudo que se debruça sobre as relações entre esses estímulos e sobre a biologia óssea é chamado paleohistologia.

Enquanto a maior parte dos tecidos decompõe-se em um período curto de tempo, nas condições corretas, o sistema esquelético pode se preservar por milhares de anos. Quanto à dinamicidade, essa refere-se à habilidade de auto-reparo, à adaptabilidade a diferentes estímulos, e às muitas mudanças pelas quais os ossos passam durante a vida do indivíduo que fazem com que o tecido expresse especificidades individuais que podem ser avaliadas, trazendo informações importantes sobre estilo de vida e saúde de populações antigas. Em outras palavras, respostas esqueléticas podem ser esperadas de acordo com o estilo de vida, com o modo de subsistência e a história de vida do indivíduo (ROBLING et al, 2006).

Enquanto, no geral, a antropologia física começou a ganhar popularidade e espaço no século XIX, ainda se apoiando nas perspectivas racistas e eugênicas, o termo paleohistologia foi usado pela primeira vez em 1926 (MOODIE, 1926), mas só foi de fato definido pela primeira vez em 1949 por W. Graf, que estudava histologia em múmias egípcias. O autor definiu paleohistologia como o exame e o reconhecimento de tecidos e células em secções microscópicas de restos humanos antigos (GRAF, 1949).

Nos últimos anos, a paleohistologia tem ganhado espaço, e o entendimento dos fenômenos observados em microscópio também tem crescido na medida em que os próprios equipamentos e tecnologias usadas nas análises avan-

çam. Análises já foram conduzidas em diversos contextos, como, por exemplo, em sítios pré e pós coloniais norte americanos (STOUT & LUECK, 1995; RICHMAN et al, 1979; ERICKSEN, 1980; PFEIFFER, 1998; PFEIFFER, 2006); Império Romano (CHO & STOUT, 2011); Inglaterra medieval (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016); populações caçadoras-coletoras sul-africanas; populações da Núbia (MARTIN & ARMELAGOS, 1985; MULHERN & VAN GERVEN, 1997; MULHERN, 2000). Na América do Sul, os estudos ainda são bastante raros; apenas dois contextos foram analisados: a população pré-colonial peruana do sítio de Paloma, datada entre 6.500 B.P - 4.500 B.P (ROBLING & STOUT, 2003), e recentemente a população pré-colonial Brasileira do sítio de Santana do Riacho, em Minas Gerais, datada entre 8.500 and 9.500 BP (GUIMARÃES, 2019).

Tendo em vista a escassez de estudos no ramo da paleohistologia no Brasil e as possibilidades da técnica, o objetivo deste artigo é apresentar uma revisão histórica, incorporando eventos relevantes desde o século XVII, porém com foco nos acontecimentos do século XX, e metodológica, fazendo assim uma síntese a respeito das potencialidades e limitações da paleohistologia, acompanhada de breves reflexões a respeito das possibilidades de usos das técnicas para contextos brasileiros.

A INVENÇÃO DO MICROSCÓPIO

Desde a descoberta da magnificação óptica, que se atribui a gregos e romanos apesar da ausência de informações ou datas detalhadas, estima-se que 1300 anos transcorreram até o seu primeiro uso prático, a criação de lentes de contatos, e outros 300 anos até a invenção de novas tecnologias, como o telescópio e microscópio (BARDELL, 2004). A invenção do microscópio e do telescópio está interligada, ocorrendo por volta de 1600 d.C, apesar da data ser desconhecida (BARDELL, 2004).

Em relação ao microscópio especificamente, a primeira menção é de março de 1622, pelo alemão Constantijn Huygens, na qual, em uma carta para os pais, o poeta menciona a compra de uma "Luneta de Drebbel" (BARDELL, 2004). O objeto consistia em duas lentes combinadas em um tubo, com a magnificação variando de acordo com a distância entre as lentes (ROSENTHAL, 2009). Devido às lentes duplas, os microscópios produzem aberrações cromáticas e esféricas, e assim o aperfeiçoamento do objeto para o uso de lentes únicas foi sendo feito.

As mais antigas notas a respeito das observações microscópicas foram feitas em 1625 d.C. e 1630 d.C., por Federico Cesi e Francesco Stelluti, que observaram abelhas e besouros com um microscópio provavelmente construído e enviado por Galileu para a Itália, endereçado a Cesi, baseado no modelo de Drebbel (BARDELL, 1983). Já o nome microscópio foi usado pela primeira vez em 1625 por Giovanni Faber, em uma carta enviada a Federico Cesi.

Apesar das notas feitas por Cesi e Stelluti, os nomes mais conhecidos por terem publicado observações microscópicas em detalhe são Robert Hooke e Antoine Van Leeuwenhoek (ROSENTHAL, 2009). Hooke era curador de experimentos da Royal Society em Londres e, em sua obra “Micrographia”, propõe teorias científicas contendo desenhos detalhados de pequenos insetos, sementes e plantas. Hooke também observa e descreve a estrutura porosa da cortiça, nomeando os poros de células (HOOKE, 1665). Obviamente, o autor não se referia a células de fato, mas a nomenclatura foi inspirada em seu trabalho (ROSENTHAL, 2009).

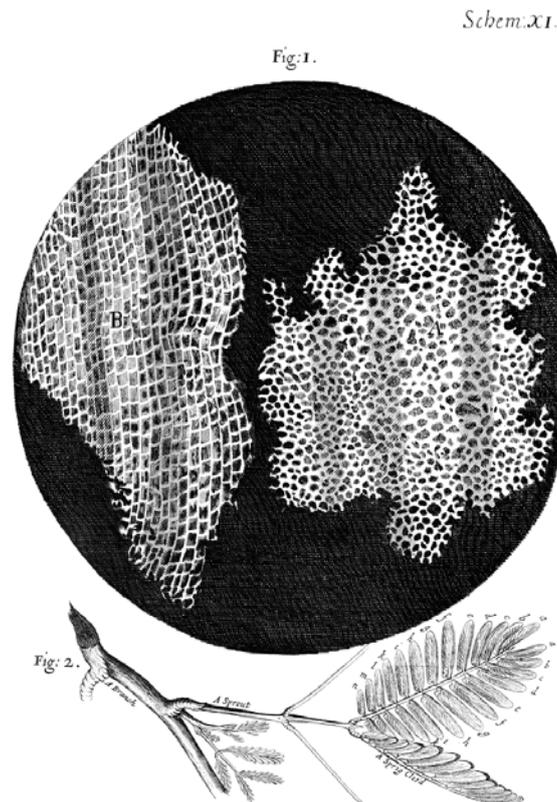


Figura 1 – Ilustração feita por Robert Hooke a partir das observações microscópicas de um fragmento de cortiça. Fonte: Hooke (1665).

Ao contrário de Hooke, o alemão Antoine Van Leeuwenhoek, apesar de não ter passado por treinamento formal, muito se interessava pelo microscópio, tornando-se um profissional reconhecido por ser extremamente habilidoso em lixar e polir lentes e em dissecar objetos para análise; foi, também, capaz de enxergar detalhes de 1 micrômetro, sendo o primeiro a descrever células presentes no esperma, em bactérias e em protozoários presentes em gotas de água (ROSENTHAL, 2009).

Hoje, pode-se classificar o microscópio como essencial para vários campos da ciência, porém, por muito tempo o microscópio foi visto como um objeto para curiosos e amadores, e não propriamente como uma ferramenta científica (BERGE, 1999). Apesar disso, dentre os instrumentos usados na biologia, pode-se dizer que o microscópio, representou a maior contribuição para o avanço do

conhecimento na área (BARDELL, 2004), descortinando um novo mundo nunca antes visto a olho nu, e mudando drasticamente não somente as capacidades técnicas e metodológicas, mas também as perspectivas metafísicas e epistemológicas (WILSON, 1995). A descoberta desse novo mundo de bactérias, protozoários, fungos, vírus, células trouxe uma revolução, feita de vacinas, melhorias na higiene, diagnósticos mais precisos, descoberta da origem de certas doenças, inovações metodológicas e, por resultado, uma recalibração do conhecimento humano (WILSON, 1995). Nesse cenário passou a ser possível dividir o corpo humano em fragmentos microscópicos, entendendo melhor seus componentes, tecidos, a fisiologia dos órgãos e suas interações com as células (ASSIS et al, 2016).

E A PALEOHISTOLOGIA?

Durante o século XIX, enquanto a antropologia biológica, no geral, popularizou-se, a paleohistologia caminhava a passos tímidos. Isso porque o viés racista atrelado ao darwinismo social adotado pela antropologia parecia atender muito bem as demandas vigentes na época enquanto a paleohistologia, por sua vez, não parecia responder ou corroborar com as aspirações científicas da agenda social do período (GARLAND, 1993). Atrelado a isso, dificuldades técnicas em relação à preparação e à natureza das amostras também contribuíram para a baixa popularidade da técnica. Em todo caso, apesar de timidamente, as análises paleohistológicas se iniciaram ainda no século XIX (GARLAND, 1993).

As primeiras aplicações de histologia a restos humanos estava principalmente conectada ao diagnóstico de possíveis patologias. O primeiro caso, por exemplo, foi feito pelo médico tcheco J. N. Czermak, que identificou arteriosclerose em uma múmia egípcia (CZERMAK, 1852). Já no início do século XX, o professor de bacteriologia da Cidade do Cairo Sir Armand Ruffer desenvolve um método de reidratação de materiais mumificados para análise histológica e, assim, identifica diversas doenças em múmias, como antracose pulmonar, doenças arteriais, abscessos no fígado, espondilite anquilosante, entre outras (RUFFER, 1911). Ainda em relação a múmias egípcias, o patologista britânico S. G. Shattock estudou seções histológicas de um faraó egípcio (SHATTOCK, 1909). Apesar das análises com restos mumificados, foi no estudo de lesões ósseas em fósseis não humanos que o nome paleohistologia foi utilizado pela primeira vez por Roy L. Moodie em 1926 (MOODIE, 1926).

As primeiras análises com ossos arqueológicos estão relacionadas ao intenso debate a respeito da origem da sífilis; nesse cenário, o americano Theophil Michael Pruden analisou duas tíbias advindas de um sítio datado do período pré-colonial Animas River, no Colorado. Pruden suspeitava que as tíbias apresentavam indícios de sífilis, porém a análise demonstrou compatibilidade das lesões com periostite e osteomielite (GARLAND, 1993). Outro exemplo de pesquisa paleohistologia do período foi feita por Carl Magnus Fürst, em 1920, diagnosticando

um caso de periostite ossificante na tíbia do Rei Magnus da Suécia, datado do século XIII d.C. (ASSIS et al, 2016).

Conforme apontado por Assis et al (2016), um dos problemas relacionados à expansão dos usos da histologia aplicada a restos humanos arqueológicos está na natureza do material a ser analisado. Por consequência, assim como o microscópio, a preparação do material e das lâminas de microscópio também passaram por diversas adaptações até chegar aos padrões atuais.

No âmbito da medicina, fragmentos ósseos para análise histológica podem ser examinados por meio da descalcificação do osso, sendo processado na parafina, ou não descalcificado e processado em epoxy (ASSAD & JACKSON, 2019). Diferente do campo médico, paleohistologia lida com amostras não tão duras quanto fósseis e sem a elasticidade de tecido moles (ASSIS et al, 2016), e por isso, para fragmentos ósseos arqueológicos, o processo de análise por meio de ossos descalcificados não é recomendado, considerando a fragilidade do material e a perda dos componentes orgânicos do osso durante os processos tafonômicos.

O início do processamento de fragmentos ósseos com materiais plásticos permitiu avanços e mais pesquisas no campo da paleohistologia, impulsionados, também, pelas pesquisas médicas, a partir da década de 1950. As pesquisas do ortopedista Harold Frost com ossos não descalcificados, por exemplo, implementaram um avanço, ao deixar de aquecer as amostras e ao introduzir o lixamento delas (FROST, 1958). Já no ramo da paleohistologia, especificamente, alguns autores se preocuparam em pesquisar os melhores métodos e sua viabilidade, considerando a natureza mais frágil do material arqueológico (STOUT & TEITELBAUM, 1976; PAWLICKI, 1976; CAROPRESO et al, 2000).

Apesar do início dos estudos em paleohistologia óssea terem se desenvolvido paralelamente a antropologia biológica e paleopatologia, é importante ressaltar que os estudos nesse âmbito se intensificaram no mesmo momento em que uma mudança bastante importante ocorreu na antropologia biológica. Durante as décadas de 1970 e 1980 a paleopatologia passa a entender a saúde como indicador biocultural (SOUZA, 2011), e assim o enfoque populacional ganha força.

Nesse cenário, diante das mudanças na disciplina e dos avanços metodológicos, a partir da década de 1980, diversas linhas de estudo na paleohistologia forem desenvolvidas, como por exemplo a diferenciação entre ossos humano e não humano em contextos forenses (MULHERN & UBELAKER, 2001), a identificação de restos humanos queimados e de processos tafonômicos (TURNER-WALKER & JANS, 2008; STOUT, 1978), a estimativa da idade do indivíduo (STOUT & CROWDER, 2011), a identificação de patologias (AARON et al, 1992; WESTON, 2009; WAKELY et al, 1991), além de avaliações a respeito do comportamento e do estilo de vida (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016; MULHERN, 2000; ROBLING & STOUT, 2003). No âmbito dos estudos sobre estilo de vida, a partir da histologia óssea, diversas variáveis foram testadas como, por exemplo, a influência dos pa-

drões de mobilidade sobre as microestruturas ósseas (ROBLING & STOUT, 2003); da divisão sexual do trabalho (MULHERN & VAN GERVEN, 1997), do status socioeconômico (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016), do estresse nutricional (MARTIN & ARMELAGOS, 1985), e das mudanças de dieta (RICHMAN et al, 1979; ROBLING & STOUT, 2003).

O desenvolvimento da paleohistologia desde a década de 1980 faz parte de um processo comum à antropologia biológica como um todo: a tentativa interdisciplinar e integrativa de compreensão, a partir da biologia, das origens, variações, padrões e processos sociais humanos (LARSEN, 2015).

UM POUCO DE BIOLOGIA

Os ossos possuem diversas funções, dentre elas a proteção dos órgãos internos, sustentação dos músculos, ligamentos e tendões, possibilitando a mobilidade corporal; servem também como armazenamento de elementos essenciais, como o cálcio e o fosfato (LYNNERUP & KLAUSS, 2019), além de abrigarem a medula óssea e desempenharem papel fundamental na formação de células sanguíneas. Cerca de 70% dos ossos é de composição mineral e 30% de composição orgânica (MAYS, 2000), sendo um dos materiais mais resistentes, ao mesmo tempo que apresenta certa flexibilidade e leveza, representando apenas cerca de 20% do peso total do corpo.

De todas as características dos ossos, a que mais importa à paleohistologia é a dinamicidade, bem como as formas como ela se revela a nível microscópico. Ossos são altamente vascularizados, constantemente respondendo a estímulos externos e internos em processos que acontecem nos níveis macroscópico e microscópico, o que nos permite avaliar alguns aspectos da vida de um indivíduo ou de um grupo.

A nível microscópico, em volta de cada vaso sanguíneo que corre no osso cortical estão presentes camadas concêntricas de lamela, formadas de fibras de colágeno (WHITE & FOLKENS, 2005). O canal por onde os vasos sanguíneos passam é chamado canal de Havers. Nas lamelas, é possível observar pequenas cavidades que abrigam células ósseas responsáveis pela manutenção do osso, chamadas osteócitos. Assim, longitudinalmente, há, no osso cortical, milhares de estruturas, cada uma delas organizadas de forma concêntrica ao redor de um vaso sanguíneo. Essas estruturas são chamadas “sistemas de Havers” ou “Ósteon” e, como veremos a seguir, são primordiais para compreendermos como a paleohistologia consegue estudar aspectos do passado pelo viés microscópico.

No caso da paleohistologia, é importante ressaltar que, na maioria dos estudos, por se tratar de material arqueológico, essas estruturas não estão presentes; mas, considerando a alta mineralização do osso, os negativos deixados por elas são de fácil visualização.

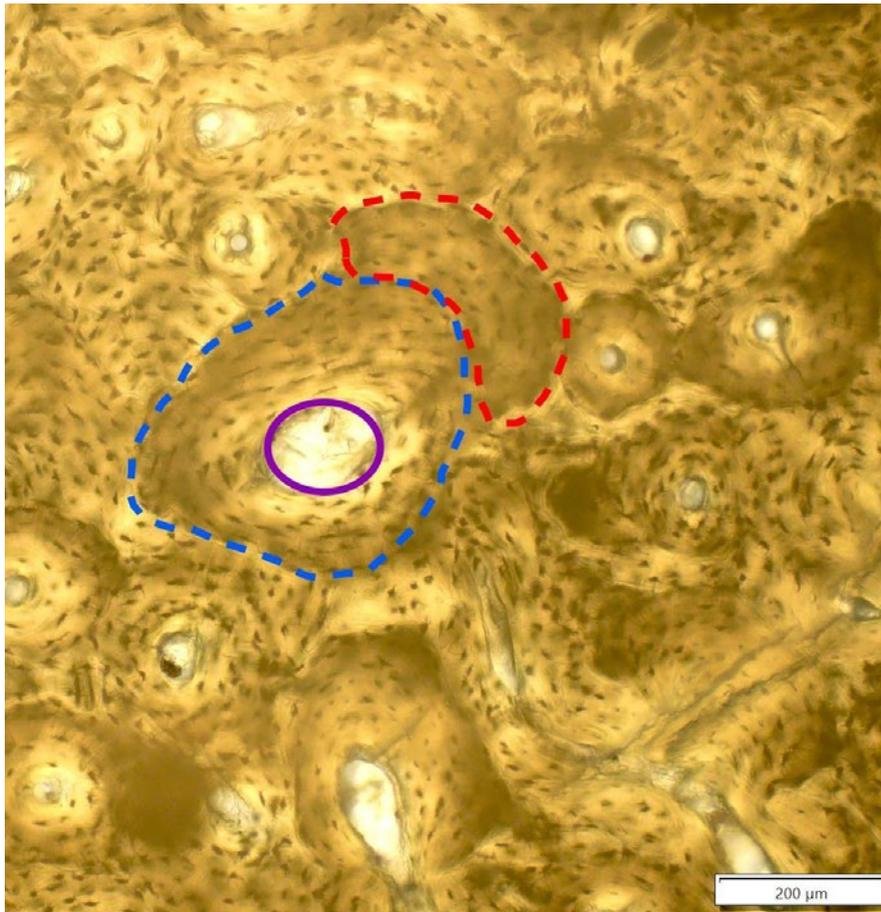


Figura 2 – Imagem obtida em microscópio de osso humano de origem arqueológica com magnificação de 10x. Pode-se observar em azul um ósteon secundário, em vermelho um ósteon fragmentado, e em roxo o canal de Havers. Fonte: autora

Três tipos de células são primordiais para a dinâmica óssea: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Osteoblastos são células mononucleares, responsáveis pela produção óssea, secretando matriz óssea não mineralizada, que consistem em camadas de fibras de colágeno como as descritas anteriormente, seguida pela deposição de cristais hidroxiapatita; processo que mineraliza a região localizada entre as fibras de colágeno (LYNNERUP & KLAUS, 2019). Durante esse processo de mineralização, por vezes os osteoblastos são incorporados à matriz óssea. Esses osteoblastos, já maduros e presos à matriz óssea, tornam-se osteócitos (GARTNER & HIATT, 2006), e adquirem funções relacionadas a manutenção do osso.

Dessa forma, os osteócitos são osteoblastos que ficaram presos no próprio processo de produção óssea e que, assim, adquiriram nova função. Osteócitos, além disso, são o tipo mais abundante de células ósseas, correspondendo a cerca de 90% do número de células presentes no osso (ORTNER & TURNER-WALKER, 2003). Os osteoclastos, por sua vez, são células cuja função é a absorção do osso, função essa oposta à dos osteoblastos. São células gigantes, ativas, móveis e multinucleadas, que medem cerca de 150 μm em diâmetro (GARTNER & HIATT, 2006).

Juntas, essas células são responsáveis pela dinâmica óssea em dois pro-

cessos: modelação e remodelação óssea. A modelação óssea está relacionada diretamente à formação óssea e trata-se de um processo bastante ativo e vigoroso dos primeiros anos até o início da vida adulta de um indivíduo, possibilitando, assim, mudanças no tamanho e na forma dos ossos (SEEMAN, 2008). Já a remodelação óssea está presente durante toda a vida do indivíduo, em intensidades diferentes. Trata-se do mecanismo pelo qual osso antigo é substituído por osso novo, por meio da ação coordenada dos osteoblastos e osteoclastos (STOUT & CROWDER, 2011). O processo de remodelação é essencial para a manutenção do osso, para a adaptação a cargas mecânicas e para reparos de microdanos (BURR, 2002), e o produto do processo de remodelação pode ser visto microscopicamente na forma de um osteon secundário (STOUT & CROWDER, 2011). O processo de formação de um novo osteon leva aproximadamente 120 dias em humanos (ROBLING et al, 2006).

Estudos no ramo da paleohistologia são possíveis pois diversos fatores influenciam o processo de remodelação óssea, bem como a qualidade do tecido produzido. Idade, hormônios, nível de carga mecânica imposta ao osso, dieta e sexo afetam diretamente a saúde desse tecido (ROBLING et al, 2006). Assim, fazendo o caminho inverso e analisando as manifestações ósseas, é possível estimar quais comportamentos e características de um indivíduo ou grupo levaram às respostas que observamos no material arqueológico estudado.

COMO SÃO FEITAS AS ANÁLISES?

Do ponto de vista metodológico, a primeira etapa consiste em cortar a sessão de osso a ser analisada. O corte é feito usando uma pequena serra de mão ou uma mini retífica (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016), e, geralmente, 1 cm de osso é suficiente. O osso escolhido e a localização nele a serem amostradas dependem do problema de pesquisa. Estudos que buscam avaliar o impacto de cargas mecânicas na microestrutura óssea, por exemplo, costumam utilizar sessões da parte posterior do fêmur, por esse ser o osso mais impactado por cargas biomecânicas (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016). Por outro lado, é bastante comum que sessões das costelas sejam avaliadas em conjunto, como forma de contrastar os achados dos fêmures, já que a costela é um dos ossos menos impactados por atividades físicas (MULHERN, 2000). Apesar do potencial do método, é considerado um processo invasivo, no qual parte da amostra é destruída. O termo “invasivo”, nesse caso, é mais adequado que o termo “destrutivo”, considerando que uma mesma lâmina pode ser analisada inúmeras vezes e que parte do osso está retido nela.



Figura 3 – Apesar de se tratar de um método invasivo, a análise histológica não afeta o comprimento do osso, não impedindo a realização de análises morfométricas. A imagem mostra o estado de um fêmur humano, escavado em Santana do Riacho, MG, após a retirada de amostra para análise histológica. Fonte: Autora

Seguido do corte do osso, vem a preparação das lâminas de microscópio, por meio das quais são obtidas as imagens, cuja magnificação varia bastante dependendo de quais aspectos foram escolhidos pelo pesquisador para serem medidos e analisados e da preservação dos ossos utilizados. Em seguida, são escolhidas regiões de interesse da amostra a serem analisadas. Essa seleção, em vez da análise integral da amostra, costuma ser a escolha dos pesquisadores pois, apesar da microestrutura óssea ser variada, as regiões de interesse costumam preservar cerca de 95% da variação geral encontrada na amostra (IWANIEC et al, 1998).

Quanto às características do osso a serem analisadas, três abordagens são possíveis: histomorfometria, histomorfologia e histotafonimia. A histomorfometria analisa quantitativamente as estruturas, avaliando, por exemplo, o número, a área, o diâmetro e o tamanho de ósteons (MISZKIEWICZ, 2018). Já a histomorfometria avalia qualitativamente, e, geralmente, os dados coletados referem-se à aparência dos ósteons, a partir do exame da orientação das fibras de colágeno (MISZKIEWICZ, 2018). Quanto à histotafonimia, essa diz respeito à descrição microscópica dos processos tafonômicos que afetam o osso, como bactérias e fungos (BELL, 2011).

Muitas são as variáveis passíveis de análise, tais como densidade de ósteons intactos, densidades de ósteons fragmentados, densidade populacional de ósteons, área do canal de havers, área do osteon, densidade de lacunas de osteócitos e orientação das fibras de colágeno (DEMPSTER et al, 2013).



Figura 4 – Imagem total de uma amostra de fêmur humano obtida em microscópio. As regiões de interesse são escolhidas de forma a englobar porções diversas do fragmento de osso amostrado.
Fonte: Autora.

AS POSSIBILIDADES DE ANÁLISE

1) Estimativa de idade

Conforme apresentado anteriormente, uma das características mais importantes dos ossos para estudos de paleohistologia é a capacidade desse tecido ser dinâmico, ou seja, de se alterar de acordo com estímulos externos e internos. Um dos fatores importantes que guiam essas alterações é a idade do indivíduo.

Um esqueleto em formação apresentará diversos indícios de modelação óssea, enquanto um esqueleto completamente formado apresentará um índice de remodelamento ósseo maior. A diferença entre esses dois cenários em uma imagem de microscópio pode ser vista com base no número de ósteons primários e ósteons secundários. Ósteons primários ainda não sofreram remodelação e, por isso, não apresentam as fibras de colágeno dispostas concentricamente ao redor do canal de havers (canais onde se localiza o vaso sanguíneo). Por outro lado, ósteons secundários apresentam indícios de remodelação óssea. Assim, a atividade de remodelação, e por consequência a idade do indivíduo podem ser contabilizadas por meio da análise da densidade populacional de ósteons secundários (STREETER, 2011).

À medida que a idade avança, a quantidade de ósteons secundários presentes no córtex do osso vai aumentando, e, como resultado, novos osteons começam a remover porções de ósteons antigos, aumentando, também, o número de ósteons fragmentados (ROBLING & STOUT, 2008). Esse processo ocorre até que os novos osteons comecem a tomar completamente o lugar dos mais antigos, apagando completamente o rastro deles, em um nível no qual a densidade populacional de ósteons já não consegue mais aumentar (ROBLING & STOUT, 2008).

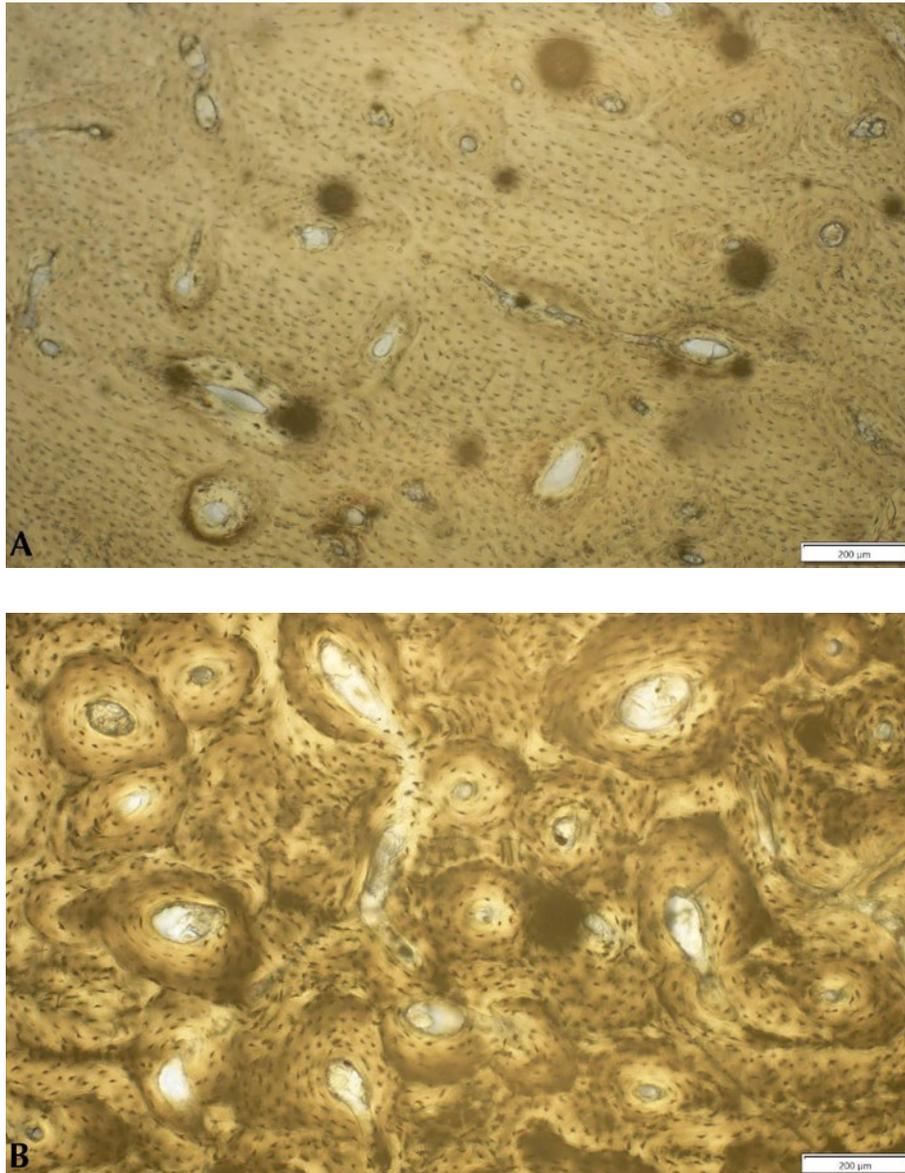


Figura 5 – Duas imagens obtidas em microscópio com magnificação de 10x, a partir delas é possível visualizar a diferença na densidade populacional de ósteons secundários, bem como a diferença no remodelamento. As imagens são relativas a dois indivíduos do sexo feminino escavados no sítio de Santana do Riacho, com as idades estimadas por meio de métodos macroscópicos (DAGLÓRIA, 2012), onde a diferença de idade é também visível pelo método histológico. A) Indivíduo do sexo feminino com idade entre 15 e 25 anos de idade. B) Indivíduo do sexo feminino com idade acima de 50 anos. Fonte: Autora

No caso das estimativas de idade por meio da histologia óssea, vale lembrar que se trata de um método invasivo; no entanto, em certos contextos, como no caso de restos humanos muito fragmentados ou mesmo queimados, a estimativa de idade pelo método histológico pode se tornar a única viável. Enquanto métodos macroscópicos para estimativa de idade apresentam maior chance de precisão em indivíduos jovens (CAVE & OXENHAM, 2017), o método histológico apresenta característica inversa, e a estimativa para indivíduos mais velhos do que 55 anos aparenta ser mais confiável que em indivíduos jovens (NOR et al, 2014).

O primeiro método de estimativa de idade baseado em histologia óssea foi proposto em 1965 (KERLEY, 1965), conhecido como método de Kerley e foi revisado pelo autor em 1978 (KERLEY & UBELAKER, 1978). Um dos problemas associados a esse primeiro método é que ele se utiliza de corte transversal completo, ao invés de apenas uma pequena sessão de osso (STREETER, 2005). Assim, um ano após a revisão do método, Thompson propôs uma nova abordagem, utilizando apenas 0,4 cm de osso (THOMPSON, 1979), porém o método mostrou-se ineficaz quando aplicado a indivíduos jovens. Tanto Kerley quanto Thompson utilizaram-se de ossos longos no desenvolvimento dos métodos, todavia outros métodos também foram desenvolvidos utilizando-se de outros ossos, tais como a clavícula e a costela (STREETER, 2011).

Tendo em vista a dificuldade encontrada pelos pesquisadores em avaliar com precisão a idade em subadultos, Streeter (2005) criou um método histológico para tal, baseado em sessões da costela. A autora dividiu o desenvolvimento microscópico das costelas em 5 fases, sendo que a primeira caracteriza indivíduos mais jovens que 5 anos de idade, e a última fase, jovens adultos com idade acima de 21 anos (STREETER, 2005).

Apesar das críticas, alguns autores argumentam que o método histológico para estimativa de idade é tão confiável quanto métodos tradicionais que utilizam marcadores macroscópicos (CROWDER, 2005; CROWDER & PFEIFFER, 2010). Inegavelmente, há, ainda, muito a ser feito para que a estimativa de idade pelo método histológico seja precisa e completamente confiável, e um outro fator que contribui para essa imprecisão está diretamente relacionada à genética. Os métodos descritos acima fornecem cálculos criados a partir de populações específicas e, quando aplicados a outros contextos, parecem não se adequar completamente (THOMPSON & GUNNERS-HEY, 1981). Vale ressaltar que a dinâmica óssea é determinada por fatores que vão além da idade, e, portanto, em alguns casos fica impossível determinar, com precisão, a causa dos fenômenos observados. De todo modo, a histologia é uma ferramenta em potencial para estimativas de idade com algumas aplicações importantes, oferecendo ao menos ideias gerais a respeito da idade, em cenários que nenhum outro método pode ser aplicado.

2) Comportamento e estilo de vida

Análises paleohistológicas que visam compreender melhor comportamentos de populações do passado baseiam-se no fato de que dieta e níveis de atividades físicas (cargas biomecânicas) influenciam diretamente a dinâmica de remodelação óssea.

Em relação à dieta, o consumo de cálcio, por exemplo, está diretamente relacionado à densidade óssea, sendo essencial para o desenvolvimento e para a manutenção esquelética (GOSMAN, 2011). Deficiência em cálcio, ferro, zinco, vitamina D e vitamina A podem comprometer o crescimento ósseo, causando um desequilíbrio na remodelação óssea, onde os níveis de absorção óssea superam a formação (GOSMAN, 2011).

Outro exemplo pode ser visto em relação ao consumo de proteínas: o alto consumo de proteínas afeta diretamente a microestrutura óssea, e dietas ricas em proteína podem levar ao aumento de níveis de remodelação óssea, levando, conseqüentemente, a um aumento na densidade populacional de ósteons (RICHMAN et al, 1979; MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2017). A malnutrição, ou uma dieta pobre em nutrientes, por outro lado, leva ao retardo da remodelação óssea e pode ser observável histologicamente a partir da baixa densidade de ósteons secundários (PAINE & BRENTON, 2006).

Em relação a casos clínicos que comprovem a relação entre microestrutura óssea e dieta, em indivíduos com dietas extremamente restrita, como é o caso de pacientes diagnosticados com anorexia nervosa, análises histomorfológicas mostram que as conseqüências podem ser várias, como perda óssea, redução da densidade mineral do osso, apoptose dos osteócitos (responsáveis pela manutenção óssea e comunicação) e aumento no número dos osteoclastos (HIRAMATSU et al, 2013).

Visando compreender o efeito de diferentes dietas no esqueleto e a aplicabilidade da paleohistologia no entendimento desses fenômenos, pesquisadores compararam três populações antigas norte-americanas: Inuítes, Arikara e Pueblo. Enquanto os Inuítes são conhecidos por possuírem uma dieta extremamente centrada em proteínas, os indígenas Pueblo, possuem uma dieta que contava com um baixo consumo calórico; o povo Arikara, por sua vez, possui uma dieta mais equilibrada que os dois primeiros povos. A partir das análises, os autores conseguiram identificar que a forma como a remodelação óssea se dava nas três populações era bastante diferente e que os Inuítes apresentavam um maior número de ósteons, seguidos dos Arikara; avaliaram, também, que a diversidade nutricional entre as três populações pode ser a causadora de tais diferenças (RICHMAN et al, 1979).

O impacto de atividades físicas na microestrutura óssea é, também, bastante conhecido e possível de ser avaliado, pois o osso responde aos estímulos

mecânicos por meio do aumento da remodelação óssea. Por outro lado, o desuso ou a falta de estímulo mecânico pode causar o efeito inverso, com a absorção óssea superando a deposição e causando perda óssea (ROBLING et al, 2006). O processo inverso também causa impacto nos ossos, e as consequências do excesso de cargas podem ser vistas na forma de acúmulo de danos, isso porque nesses casos não há tempo hábil para recuperação óssea, levando a fraturas (ROBLING et al, 2006). Pesquisas também mostram que cargas mecânicas induzem melhoras nas propriedades químicas e na mineralização óssea (ROBLING et al, 2006), resultando em mudanças na densidade óssea (GOSMAN, 2011). Além disso, o estímulo mecânico afeta, também, a construção de colágeno durante a remodelação óssea (ROBLING et al., 2006).

Um exemplo claro dos efeitos dos estímulos biomecânicos para a histologia óssea foi descrito por Lazenby e Pfeiffer (1993). Os autores analisaram histologicamente os dois fêmures de um homem que teve uma das pernas parcialmente amputadas, tendo utilizado prótese por anos; enquanto a perna intacta apresentava 28% de remodelação, o fêmur associado ao uso de prótese apresentava 61% de remodelação. Nesse cenário, todos os outros fatores que potencialmente levam a diferenças nos índices de remodelação, como genética, idade e dieta não explicam as diferenças observadas, sendo que o estímulo mecânico é a única explicação para a assimetria examinada.

Em contextos arqueológicos, também foi demonstrado que ossos expostos a maior estímulo mecânico, como é o caso do fêmur, se comparados a ossos que sofrem menos estímulo, como as costelas, apresentam indícios de adaptações a cargas mecânicas, com aumentos nos índices de remodelação (MULHERN & VAN GERVEN, 1997; MULHERN, 2000).

O primeiro estudo de paleohistologia na América Latina, realizado em 2003, teve por objetivo analisar as mudanças de estratégias de subsistência e, conseqüentemente, as mudanças nos níveis de atividades físicas, padrões de mobilidade e cargas impostas aos ossos do ponto de vista da microestrutura óssea (ROBLING & STOUT, 2003). Os autores Alexander Robling e Sam Stout analisaram indivíduos recuperados de um sítio na costa central peruana, datado entre 6.500 e 5.300 B.P. (ROBLING & STOUT, 2003). Era sabido que, durante o período, houve grandes mudanças em relação às estratégias de subsistência, nas quais a população mais antiga priorizava caça e coleta, enquanto a ocupação mais recente dependia mais de recursos marinhos, levando uma vida mais sedentária (ROBLING & STOUT, 2003). Os autores esperavam que as mudanças no estilo de vida ocasionassem, também, mudanças na histologia óssea e tiveram suas expectativas correspondidas. As análises dos fêmures sugerem que as propriedades geométricas das estruturas ósseas e as taxas de remodelamento acompanham as mudanças em estilo de vida, com menos demandas mecânicas, sugerindo a adoção de um estilo de vida mais sedentário (ROBLING & STOUT, 2003).

Tratando-se de paleohistologia, é sempre importante lembrar que a dinâmica óssea é um fenômeno multifatorial e que nenhum comportamento apresenta potencial explicativo suficiente para descrever todas as características observadas; desse modo, análises mais completas, que levem em conta diversas variáveis da vida dos indivíduos, podem trazer resultados mais confiáveis.

Um exemplo interessante de pesquisa que considera não apenas as atividades físicas, mas também dieta, idade e sexo é a conduzida por Justyna Miszkiewicz e Patrick Mahoney, em 2016, com a qual tentaram compreender como o nível socioeconômico - e todas as variáveis afetadas por ele - tem influência no âmbito microscópico do osso. Para tal, os autores compararam variáveis histológicas de homens e mulheres de diferentes classes sociais escavados de sítios medievais ingleses. Como se sabe, a idade média europeia foi um período de grande estratificação social, onde trabalho e alimentação estavam intrinsecamente ligados à classe social (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016). Assim, classes sociais mais altas levavam uma vida sedentária associada a um altíssimo consumo de proteínas, enquanto classes mais baixas consumiam muito menos proteínas e realizavam trabalhos braçais, levando a uma vida bastante ativa (MISZKIEWICZ & MAHONEY, 2016). A complexidade envolvida na dinâmica óssea fica evidente nos resultados, que demonstram diferenças entre sexos e entre classes, em relação à densidade e ao tamanho dos ósteons; se, por um lado, o consumo de proteína aumenta as taxas de remodelação, demandas físicas causam efeito semelhante. O estudo demonstra, ainda, a dificuldade em delinear uma única causalidade para os fenômenos observados e, conseqüentemente, a necessidade de estudos que levem vários fatores em consideração na análise.

3) Patologia

A decomposição da maior parte dos tecidos faz com que, em contextos arqueológicos, apenas algumas doenças sejam identificadas, e, no geral, o que essas doenças têm em comum é o fato de que afetam os ossos. Sendo assim, a análise histológica de amostras arqueológicas potencialmente patológicas podem contribuir em muitos aspectos, aumentando a precisão do diagnóstico (DE BOER et al, 2018).

O campo que cuida das análises arqueológicas de patologias por métodos microscópicos é conhecido como paleohistopatologia e tem objetivos semelhantes ao da paleopatologia; porém, ao contrário dela, os estudos em paleohistopatologia são menos numerosos e suas aplicações, menos conhecidas (ASSIS et al, 2013). Apesar da histologia óssea ser amplamente utilizada na área médica para o auxílio em diagnósticos, quando se trata de contextos arqueológicos, marcadores macroscópicos ainda são mais utilizados. Uma revisão bibliográfica publicada em 2013 levando em consideração a literatura em inglês sobre paleopatologia mostra que apenas 57 estudos se utilizaram da histologia no diagnóstico

(DE BOER, 2013). Outra revisão publicada no mesmo ano mostra que, do total de 5872 publicações em francês e inglês, apenas 94 focaram em paleohistologia e, na maioria das vezes, apenas como ferramenta auxiliar (ASSIS, 2013). O fato de se tratar de uma técnica invasiva que necessita de treinamento científico específico para avaliar os fenômenos observados pode contribuir para falta de popularidade da paleohistopatologia (ASSIS et al, 2016).

Apesar da falta de popularidade, o surgimento da paleohistologia está bastante conectado ao uso da técnica em diagnósticos, não apenas em tecidos ósseos, como também em múmias (SCHULTZ, 2001), e a utilidade de uma visão que englobe o ponto de vista microscópico no diagnóstico de patologias não pode ser negado. Um trabalho que ilustra claramente as contribuições da paleohistopatologia foi realizado por Schultz, em 1993, ao analisar um sítio da idade do bronze na região de Anatólia. No contexto, 144 esqueletos de infantes foram examinados macroscopicamente e, em seguida, microscopicamente; os resultados mostram que o cenário geral mudou radicalmente: De acordo com a análise macroscópica, a anemia estava presente em 7% dos casos, a osteomielite em 8,5 % dos indivíduos, a irritação das meninges em 6.8% e o raquitismo não foi diagnosticado. O cenário após a análise histológica mostrou anemia em 4,7% dos casos, osteomielite em 4,7%, irritação das meninges em 9.5% e raquitismo em 3,9% (SCHULTZ, 1993), demonstrando, assim, o potencial da paleo histopatologia para diagnósticos mais precisos.

A paleohistopatologia pode ser usada no diagnóstico de qualquer doença que afeta o osso e seu alcance é ainda mais fascinante quando se trata de doenças que afetam diretamente a microestrutura do osso, como é o caso da osteomielite hematogênica, osteomielite específica e não específica, escorbuto, treponema, hanseníase, anemia, raquitismo e meningite (SCHULTZ, 2001).

4) Tafonomia

Outra possibilidade para o uso de análises histológicas em contextos arqueológicos é a descrição das transformações nos ossos ocorridas após a morte. A base para esse tipo de estudo está no fato de que o corpo em decomposição passa por severas transformações biológicas, físicas e químicas. Essas alterações, incluindo bioerosão microbiana e bacteriana, podem ser visualizadas e descritas por meio da histologia. Na maior parte dos casos, as alterações observadas são causadas por fungos, bactérias ou cianobactérias em ambientes marinhos (JANS et al, 2004).

A primeira descrição histológica de fatores tafonômicos ocorreu em 1864, por Wedl, que foi o primeiro a descrever ataques microbianos a partir da análise de um dente. Um longo tempo se passou desde então, e hoje a histotafonomia constitui um campo desenvolvido de conhecimento, sendo possível distinguir di-

ferentes tipos de alterações tafonômicas a partir da morfologia, tamanho e forma dos fenômenos observados sob o microscópio (JANS et al, 2004).

A partir de uma análise completa dos fatores tafonômicos, é possível compreender também o potencial de preservação e as possibilidades de estudo para outras áreas muito caras à arqueologia, como DNA e isótopos estáveis (TURNER-WALKER & JANS, 2008). É possível, ainda, que os processos tafonômicos visualizados sob o microscópio permitam compreender os diferentes ambientes pelos quais um corpo passou após a morte, como no caso de sepultamentos secundários (BOOTH E MADGWICK, 2016; TURNER-WALKER & JANS, 2008), fornecendo informações sobre as mudanças ambientais e de condições de sepultamento ao longo do tempo.

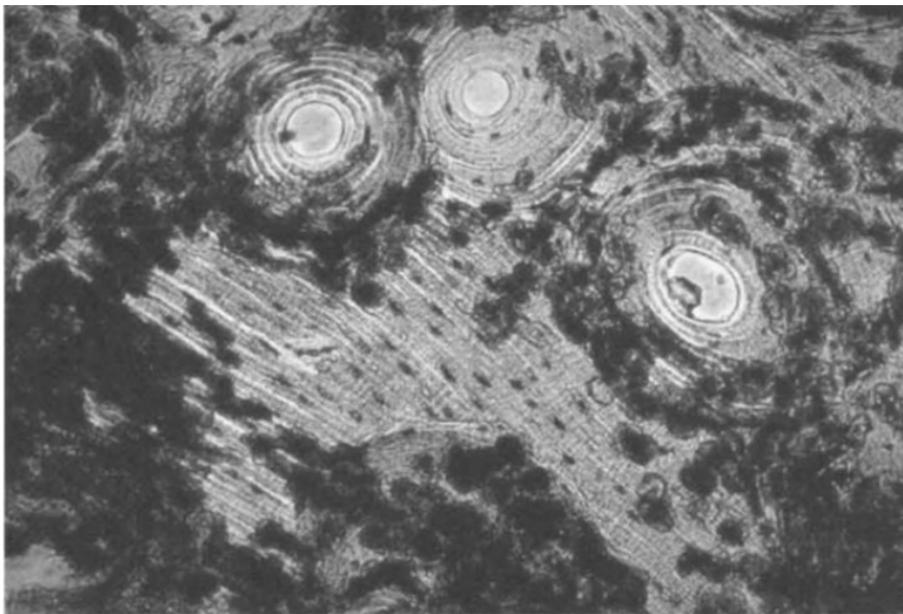


Figura 6 – Vestígios de infecções fúngicas em amostra histológica de fêmur humano. Na imagem é possível observar aglomerações de pontos mais escuros atingindo diversas porções da amostra. Fonte: Schultz (1996).

Um exemplo de pesquisa que demonstra a utilidade singular da histotafonomia foi o estudo conduzido por Thomas J. Booth, Richard Madgwick, em 2016, que utilizaram ossos humanos de 20 indivíduos recuperados de dois sítios arqueológicos ingleses, datados da Idade do Bronze (BOOTH & MADGWICK, 2016). Os resultados obtidos por meio da análise microscópica mostraram que havia uma grande diversidade de ritos mortuários, ao contrário do que se imaginava anteriormente (BOOTH & MADGWICK, 2016). De acordo com os padrões tafonômicos encontrados nos ossos, pode se dizer que algumas práticas incluíam exumação, seguida da remoção de alguns elementos, e exposição do corpo antes do enterramento final (BOOTH & MADGWICK, 2016). Indícios para o rito funerário mais comumente descrito na literatura e mais amplamente usado na época, a exumação, foram encontrados em apenas um dos indivíduos analisados (BOOTH & MADGWICK, 2016).

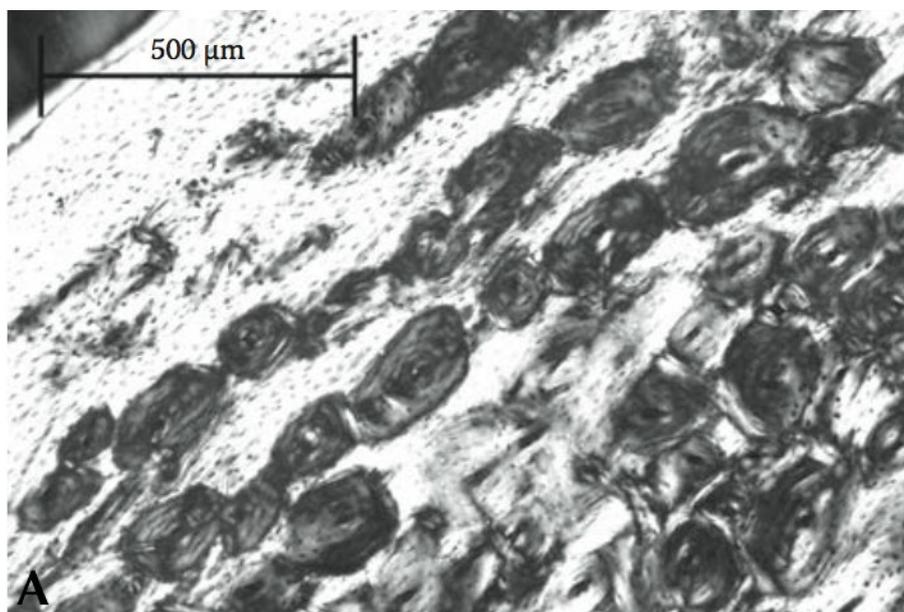
Apesar da histotafonomia corresponder a um campo complexo com possibilidades e limitações próprias, é bastante importante que todo pesquisador que lida diretamente com paleohistologia possua, ao menos, o mínimo de conhecimento sobre o tema e saiba reconhecer as manifestações bacterianas e fúngicas mais recorrentes, uma vez que é importante saber distinguir fatores pré e post mortem, como distinguir lesões ocasionados por doenças infecciosas de infestações bacterianas ou fúngicas causadas durante a decomposição (ASSIS et al, 2016),

5) Distinção entre humano e não humano

Outro uso bastante comum da histologia óssea é a distinção entre osso humano e não humano. Esse tipo de análise é especialmente importante para a zooarqueologia, capaz de auxiliar na classificação taxonômica de vestígios ósseos encontrados em contextos arqueológicos (MULHERN & UBELAKER, 2011).

A aplicação da distinção entre restos humanos e não humanos, por meio da histologia óssea, está ligada, também, a contextos forenses. Nesses casos, ela é importante porque permite a diferenciação usando apenas pequenas porções de osso, podendo utilizar-se de pequenos pedaços e chegar a resultados que não seriam possíveis por meio de outras técnicas.

A diferenciação é feita com base no fato de que humanos apresentam padrões aleatórios na distribuição de ósteons no osso cortical, enquanto grande parte dos outros animais apresenta padrões plexiformes (MULHERN & UBELAKER, 2011). Além disso, a forma como o acúmulo de ósteons relacionados a idade se dá é bastante distinta dos padrões vistos em não primatas (MULHERN & UBELAKER, 2003).



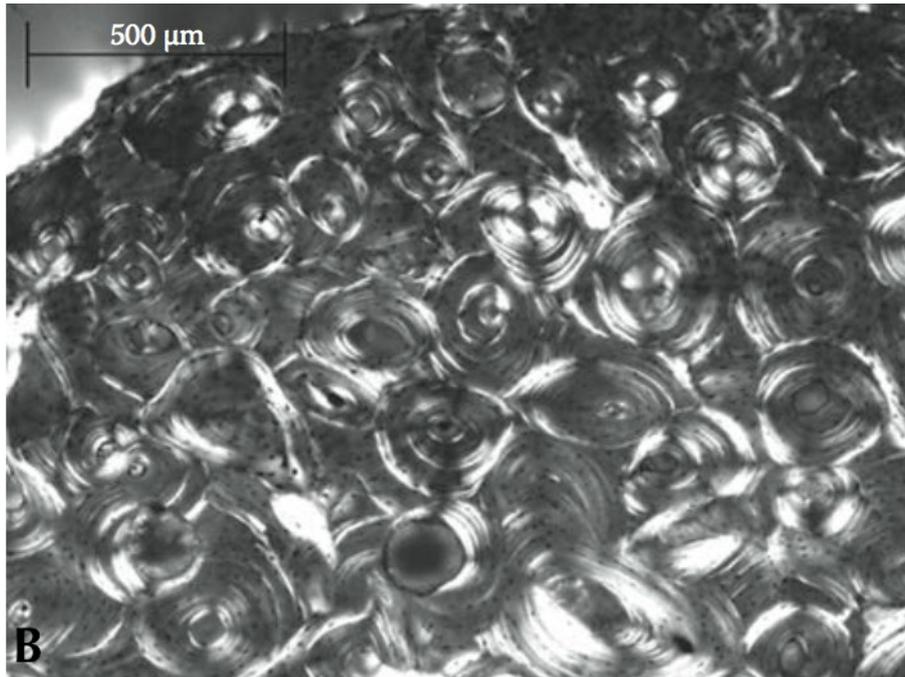


Figura 7 – Diferença na forma e distribuição de ósteons secundários em A) Fêmur de um cachorro e B) Fêmur humano. Fonte: Mulhern & Ubelaker (2011).

Infelizmente, apesar das análises histológicas abrangerem uma dimensão que análises macroscópicas não conseguem, nem sempre a distinção entre ossos humano e não humano é possível. Essa limitação se dá, geralmente, pela falta de informação em relação a qual parte do osso está representada, e, considerando a variabilidade de formas e tamanhos de ósteons em humanos e não humanos, em algumas circunstâncias, as análises podem não ser tão precisas (MULHERN & UBELAKER, 2011).

PALEOHISTOLOGIA E CONTEXTOS BRASILEIROS: O QUE AINDA É PRECISO SUPERAR E O QUE TEMOS A GANHAR?

Conforme o exposto, pode-se notar que são várias as aplicações da paleohistologia, e que as análises podem contribuir em muito não só para o entendimento do passado, como também para o conhecimento sobre biologia esquelética. É inegável que a paleohistologia somaria muito em estudos acerca de contextos arqueológicos brasileiros, tanto históricos quanto pré-coloniais, e, a partir de tal abordagem, seria possível entender, do ponto de vista microscópico, as diversas possibilidades de adaptação óssea a diferentes estímulos, em diversos contextos. Entretanto, até hoje, apenas um estudo paleohistológico foi realizado com contextos brasileiros, analisando o sítio de Santana do Riacho, na região de Lagoa Santa, Minas Gerais (GUIMARÃES, 2019).

Devido à falta de estudos no continente sul-americano, as comparações de resultados restringem-se a contextos muito diferentes do encontrado em Santana do Riacho, tanto em relação à dieta quanto em relação a padrões de subsis-

tência, e, portanto, a interpretação dos resultados acaba não sendo tão precisa quanto poderia, caso houvessem mais estudos para contextos semelhantes, e caso comparações mais significativas fossem conduzidas. Grande parte dos estudos paleohistológicos, como estimativas de idade, efeito de diferentes dietas ou de padrões de mobilidade, é necessariamente comparativa, e, considerando o papel fundamental da genética na biologia esquelética, a construção de conhecimento acerca da paleohistologia tem muito a ganhar com o aumento das pesquisas sobre o tema em contextos brasileiros.

Infelizmente, algumas limitações fazem com que o avanço das pesquisas no Brasil se dê a passos lentos: primeiramente, é importante sempre ter em mente que se trata de um estudo invasivo, no qual parte do material é perdida; além disso, as análises paleohistológicas necessitam de equipamentos específicos, tanto para preparação das amostras quanto para análise em si, equipamentos esses que, no geral, têm valor bastante alto. Ao contrário da maior parte das análises histológicas em casos clínicos, as amostras na paleohistologia óssea não podem ser descalcificadas. Amostras não descalcificadas apresentam um grau maior de fragilidade, e portanto equipamento e métodos específicos na produção das lâminas de microscópio (DE BOER & VAN DER MERWE, 2016).

Outra limitação relaciona-se ao fato de que é necessário que o pesquisador tenha tido familiaridade com a técnica, e isso é um grande empecilho, principalmente considerando que quase todos os laboratórios especializados nesse tipo de análise encontram-se no hemisfério norte, com exceção, apenas, de um laboratório localizado na Austrália. Nesse cenário, é importante ressaltar que a análise paleohistológica em muito se diferencia de uma análise histológica comum, uma vez que a arquitetura e características normalmente usadas como marcadores diagnósticos não estão presentes na amostra arqueológica. A paleohistologia óssea se baseia puramente na matriz calcificada remanescente, e portanto a interpretação deste requer conhecimento profundo sobre a produção, manutenção, remodelação e reabsorção do tecido ósseo (DE BOER & VAN DER MERWE, 2016), necessitando assim de treinamento específico sobre o tema.

Embora o caminho pela frente seja longo, considerando as infinitas possibilidades inexploradas que a paleohistologia tem a contribuir para contextos brasileiros, é importante que mais pesquisas sejam realizadas. Um novo mundo descortinou-se com a invenção do microscópio, e esse novo mundo mudou a forma como a humanidade olhou para o futuro e, da mesma forma, pode mudar a forma como olhamos para o passado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Justyna Miskiewicz e a Karen Cook pelas contribuições na escrita deste artigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, J. E., ROGERS, J.; KANIS, J. A. Paleohistology of Paget's disease in two medieval skeletons. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 89, n. 3, p.325-331, 1992.

ASSAD, M.; JACKSON, N. Biocompatibility Evaluation of Orthopedic Biomaterials and Medical Devices: A review of Safety and Efficacy Models. In: NARAYAN, Roger (Org). **Encyclopedia of Biomedical Engineering**. Elsevier, 2018. p.281-309.

ASSIS, S., KEENLEYSIDE, A.; SANTOS, A. L.. Beyond the visible world: the role of microscopy in the study of past human conditions. **Microscopy and Microanalysis**, v. 19. n. 4, p. 41-42, 2013.

ASSIS, S.; SANTOS, A. L.; KEENLEYSIDE, A. Paleohistology and the study of human remains: Past, Present and future approaches. **Revista Argentina de Antropología Biológica**, v. 18, n. 2, 2016.

BARDELL, D. The first record of microscopic observations. **BioScience**, vol 33, n 1. p. 36-38, 1983.

BARDELL, D. The invention of the microscope. **BIOS**, v. 75, n. 2. p. 78-84, 2004.

BELL, L. S. Histotaphonomy. In: Crowder, C e Stout, S (Org.). **Bone Histology: An Anthropological Perspective**. CRC press. p. 257-268, 2011.

BERGE, A. **The History of Science**. Virginia Polytechnic Institute and State University: MIT Press, 1999.

BURR, D. B. Targeted and nontargeted remodelling. **Bone**. v. 30, n.1, p.2-4, 2002.

BOOTH T. J.; MADGWICK R. New evidence for diverse secondary burial practices in Iron Age Britain: A histological case study. **Journal of Archaeological Science**. v. 67, p. 14-24, 2016.

CAROPRESO, S; BONDIOLI, L; CAPANNOLO, D; CERRONI, L; MACCHIARELLI, R; CONDO, S.G. Thin sections for hard tissue histology: a new procedure. **Journal of Microscopy**, v. 199, n. 3, p. 244-247, 2000.

CAVE, C. M.; OXENHAM, M. F. Sex and the elderly: Attitudes to long-lived women and men in early Anglo-Saxon England. **Journal of Anthropological Archaeology**, v. 48, p. 207-216, 2017.

CHO, H.; STOUT, S.D., Age-associated bone loss and intraskeletal variability in the Imperial Romans. **Journal of Anthropological Science**, v. 89, p.109-125, 2011.

CROWDER, C. **Evaluating the use of quantitative bone histology to estimate adult age at death**. 2005. 247 f. Tese (Doctor of Philosophy)- University of Toronto, Canada, 2005.

CROWDER, C.; PFEIFFER, S. The application of cortical bone histomorphometry to estimate age at death. In: LATHAM, K.; FINNEGAN, M. (Org.). **Age Estimation of the Human Skeleton**. Charles C. Thomas, p.193-215, 2010.

CROWDER, C.; STOUT, S. Bone Remodeling, Histomorphology and Histomorphometry. In: Crowder, C.; Stout, S. (Org.). **Bone Histology: An Anthropological Perspective**. CRC Press, 2011. p.1-22.

CZERMAK J. N. **Beschreibung und mikroskopische Untersuchung zweier**

äggyptischer Mumien, S. B. Akad. Wiss. Wien, 1852.

DA-GLORIA, P. **Health and lifestyle in the Paleoamericans**: Early Holocene bio-cultural adaptation at Lagoa Santa, Central Brazil. 2012. 780 f. Tese de Doutorado (Doctor of Philosophy) - The Ohio State University, Columbus, Ohio, 2012

DE BOER, H.; MAAT, G. Dry bone histology of bone tumours. **International journal of paleopathology**. v. 21. p.56-63, 2018.

DE BOER, H.H.; VAN DER MERWE, A.E. Diagnostic dry bone histology in human paleopathology. **Clinical Anatomy**, v. 29, n 7, p.831-843, 2016.

DEMPSTER, D. W., COMPSTON, J. E., DREZNER, M. K., GLORIEUX, F. H., KANIS, J. A., MALLUCHE, H.; PARFITT, A. M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of bone and mineral research**, v. 28, n. 1, p. 2-17, 2013.

ERICKSEN, M. F. Patterns of microscopic bone remodelling in three aboriginal American populations. Early Native Americans: Prehistoric Demography, Economy, and Technology. **The Hague, the Netherland: Mouton**, p.239-270, 1980.

FROST, H. Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. **Stain Technology**, v. 33, n. 1, p.273-277, 1958.

GARLAND, A. N. An Introduction to the Histology of Exhumed Mineralized Tissue. In: GRUPE, G.; GARLAND, A. N. (Org). **Histology of Ancient Human Bone: Methods and Diagnosis**. Berlin, Springer-Verlag. p 1-17, 1993.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Colour textbook of histology**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, pp.49-69, 2007.

GRAF, W. Preserved histological structures in Egyptian mummy tissues and ancient Swedish skeletons. **Cells Tissues Organs**, v. 8, n. 3, p.236-250, 1949.

GUIMARÃES, N. **Human Palaeohistology At Santana Do Riacho**: First Insights Into Bone Adaptation Of The First Americans. 2019. 167 f. Dissertação (Master of Archaeological and Evolutionary Science)- The Australian National University, Canberra, ACT. Australia, 2019.

GOSMAN, J.H. Growth and development: Morphology, mechanisms, and abnormalities. In Crowder, C.; Stout, S. (Org.). **Bone Histology: An anthropological perspective**. CRC Press. p. 39-60, 2011.

HIRAMATSU, R., UBARA, Y., SUWABE, T., HOSHINO, J., SUMIDA, K., HASEGAWA, E., YAMANOUCI, M., HAYAMI, N., SAWA, N.; TAKAICHI, K. Bone histomorphometric analysis in a patient with anorexia nervosa. **Bone**, v. 56, n. 1, p.77-82, 2013.

HOOKE, R. **Micrographia**. Londres: J. Martyn and J. Allestry, 1665.

IWANIEC, U.T., CRENSHAW, T.D., SCHOENINGER, M.J., STOUT, S.D.; ERICKSEN, M.F. Methods for improving the efficiency of estimating total osteon density in the human anterior mid-diaphyseal femur. **American Journal of Physical Anthropology**: v. 107, n. 1, p.13-24, 1998.

JANS, M. M. E., NIELSEN-MARSH, C. M., SMITH, C. I., COLLINS, M. J., KARS, H. 'Characterisation of Microbial Attack on Archaeological Bone', **Journal of Archaeological Science**, v. 31, n. 1, p. 87-95, 2004.

KERLEY, E.R. The microscopic determination of age in human bone. **American**

Journal of Physical Anthropology, v. 23, n. 2, p.149-163, 1965.

KERLEY, E.R.; UBELAKER, D.H. Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 49, n. 4, p.545-546, 1978.

LARSEN, C.S. **Bioarchaeology: Interpreting Behavior from the Human Skeleton**. 2nd ed. Cambridge Studies in Biological and Evolutionary Anthropology. Cambridge: Cambridge University Press, 2015.

LAZENBY, R.A.; PFEIFFER, S.K. Effects of a nineteenth-century below-knee amputation and prosthesis on femoral morphology. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 3, n 1, p.19-28,1993.

LYNNERUP, N.; KLAUS, H.D. Fundamentals of human bone and dental biology: structure, function, and development. In: BUIKSTRA, J.E. **Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains** (pp. 35-58). Academic Press, 2019.

MARTIN, D.L.; ARMELAGOS, G. J. Skeletal remodeling and mineralization as indicators of health: an example from prehistoric Sudanese Nubia. **Journal of Human Evolution**, v. 14, n. 5, p.527-537, 1985.

MAYS, S. **The archaeology of human bones**. 2^a edition, Routledge, New York, 2010.

MAZZARELLO, P. A unifying concept: the history of cell theory. **Nature cell biology**, v. 1, n. 1, p. 13-15, 1999.

MISZKIEWICZ, J. J.; MAHONEY, P. Ancient Human Bone Microstructure in Medieval England: Comparisons between Two Socio-Economic Groups. **The Anatomical Record**, v. 299, n. 1, p. 42-59, 2016.

MISZKIEWICZ, J. J. Biological Anthropology Research Lab Banks 249: BX53 Imaging Protocol. The Australian National University, 2018.

MOODIE, R. L. **Studies in paleopathology: General consideration of the evidence of pathological conditions found among fossil animals**. Harvard University, 1926.

MULHERN, D. Rib Remodeling Dynamics in a Skeletal Population from Kulubnarti, Nubia, **American Journal of Physical Anthropology**, v. 111,n. 4, p. 519-530, 2000.

MULHERN, D.; UBELAKER, D.H. Differences in osteon banding between human and nonhuman bone. **Journal of Forensic Science**, v. 46.n 2, p.220-222, 2001.

MULHERN, D.; VAN GERVEN, D.P. Patterns of femoral bone remodeling dynamics in a medieval Nubian population. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 104, n. 1, p.133-146, 1997.

NOR, F.M., PASTOR, R.F.; SCHUTKOWSKI, H. Age at death estimation from bone histology in Malaysian males. **Medicine, Science and the Law**, v. 54, n. 4, p.203-208, 2014.

ORTNER, D.J.; TURNER-WALKER, G. The biology of skeletal tissues. In ORTNER, D.J. **Identification of pathological conditions in human skeletal remains**. Academic Press. p.11-35, 2004.

PAINE, R.R.; BRENTON, B.P. Dietary health does affect histological age assessment:

an evaluation of the Stout and Paine (1992) age estimation equation using secondary osteons from the rib. **Journal of forensic sciences**, v.51, n.3, p.489-492, 2006.

PAWLICKI, R.. Methods of preparation of fossil bone samples for light and transmission electron microscopy. **Stain Technology**, v. 53,n. 2, p.95-102, 1978.

PFEIFFER, S. Variability in osteon size in recent human populations. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 106, n. 1, p.219-227, 1998.

PFEIFFER, S. Cortical bone histology in juveniles. **Documenta Archaeobiologiae**, v. 4, p.15-28, 2006.

RICHMAN, E.A., ORTNER, D.J.; SCHULTER-ELLIS, F.P., Differences in intracortical bone remodeling in three aboriginal American populations: possible dietary factors. **Calcified tissue international**, v. 28,n. 1, p.209-214, 1979.

ROSENTHAL, C. "The beginning: Invention of the microscope", **Nature Cell Biology**, vol. 11, n. 1, p. S6, 2009.

ROBLING, A.G., CASTILLO, A.B.; TURNER, C.H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p.455-498, 2006.

ROBLING A.G.; STOUT S.D. Histomorphology, Geometry, and Mechanical Loading in Past Populations. In: Agarwal S.C., Stout S.D. (org.). **Bone Loss and Osteoporosis**. Springer, Boston, MA., 2003.

ROBLING, A. G.; STOUT, S. D. Histomorphometry of human cortical bone: applications to age estimation. In Katzenberg, M. Anne e Saunders, Shelley R (Org.). **Biological anthropology of the human skeleton**: John Wiley & Sons, Inc., 2008. p.149-182.

RUFFER, M.A. **Histological studies on Egyptian mummies** (Vol. 3). Diemer, 1911

SCHULTZ, M. Initial stages of systemic bone disease. In: GRUPE, G e GARLAND, N. **Histology of ancient human bone: methods and diagnosis**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 185-203, 1993.

SCHULTZ, M. Microscopic Investigation of human remains. In: Sorg, M.H. e Haglund, W.D. (Org.). **Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains**. CRC Press, 1996.

SCHULTZ, M. Paleohistopathology of bone: a new approach to the study of ancient diseases. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 116, n. 33, p.106-147, 2001.

SEEMAN, E., 2008. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 26, n. 1, p.1-8, 2008.

SHATTOCK, S. G., A report on the pathological condition of the aorta of King Merneptah. **Proceedings of The Royal Society of Medicine**. vol 2, p. 122-127, 1909.

SOUZA, S. M. F. M. . A Paleopatologia no Brasil: Crânios, Parasitos e Doenças do Passado. In: FERREIRA, L.F ; REINHARD K. J; ARAUJO, A. (Org.). **Fundamentos da Paleoparasitologia**. Rio De Janeiro: Editora Fiocruz. p. 53-68, 2011

STREETER, M. **Histomorphometric characteristics of the subadult rib cortex: Normal patterns of dynamic bone modeling and remodeling during growth**

and development. 2005. 183 f. Tese (Doctor of Philosophy)- University of Missouri - Columbia, 2005.

STREETER, M. "Histological age-at-death estimation." In Crowder, C e Stout, S (Org.). **Bone Histology: An anthropological perspective.** CRC Press. p. 151-168, 2011.

STOUT, S., Histological structure and its preservation in ancient bone. **Current Anthropology**, v.19 n. 3, p.601-604, 1978.

STOUT, S.; LUECK, R.. "Bone remodelling rates and skeletal maturation in three archaeological skeletal populations." **American Journal of Physical Anthropology**, v. 98, n. 2, p.161-171, 1995.

STOUT, S.; TEITELBAUM, S. Histological analysis of undecalcified thin sections of archeological bone. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 44, n. 2, p.263-269, 1976.

THOMPSON, D. The core technique in the determination of age at death in skeletons. **Journal of Forensic Science**, v. 24, n. 4, p.902-915, 1979.

THOMPSON, D.; GUNNESS-HEY, M. Bone mineral-osteon analysis of Yupik-Inupiaq skeletons. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 55, n 1, p.1-7, 1981.

TURNER-WALKER, G.; JANS, M. "Reconstructing taphonomic histories using histological analysis", **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 266, n. 3, p. 227-235, 2008.

WAKELY, J., MANCHESTER, K.; ROBERTS, C. Scanning electron microscopy of rib lesions. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 3-4, p.185-189, 1991.

WESTON, D. **Paleohistopathological analysis of pathology museum specimens: can periosteal reaction microstructure explain lesion etiology.** **American Journal of Physical Anthropology**, v. 140, p.186-193, 2009.

WHITE, T.D.; FOLKENS, P.A. **The human bone manual.** Elsevier, 2005.

WILSON, C. **The invisible world: early modern philosophy and the invention of the microscope.** Princeton: Princeton University Press; 1997.