



Foto: Ubiratan Piovezan

Adaptação da Metodologia: análise de microestruturas de pelos para identificação de Mamíferos – Tricologia

Gisele Aparecida Felix¹
Ubiratan Piovezan²
Juliana Quadros³
Fabiana Villa Alves⁴
Raquel Soares Juliano⁵
Maria Clorinda Soares Fioravanti⁶

Introdução

Várias são as técnicas disponíveis para a caracterização fenotípica e genética de animais, embora somente um limitado número seja rotineiramente utilizado para espécies de interesse zootécnico. Muitas vezes o custo de um exame pode ser um fator limitante para seu uso, como as técnicas de caracterização genética, ainda relativamente caras, principalmente para programas de conservação *in situ* de raças locais, que não dispõem de muitos recursos. A análise microscópica das microestruturas dos pelos “tricologia” é um método que permite determinar uma espécie de mamífero a partir de amostras de pelo, uma vez que a morfologia destes anexos epidérmicos é espécie-específica (MAYER, 1952, WALLIS, 1993).

Este tipo de análise é amplamente utilizada para identificação de espécies em pesquisas taxonômicas, ecológicas, paleontológicas, arqueológicas, como controle de qualidade de alimentos e elucidação de questões forenses (QUADROS; MONTEIRO-FILHO 1998).

Do ponto de vista zootécnico, a utilização de uma metodologia associada a amostras biológicas de fácil acesso, de rápida execução, com baixo custo de realização e tão confiável quantas outras opções é uma alternativa de grande importância. Esta técnica foi proposta, como metodologia em programas de conservação de raças ovinas nativas da Itália com a finalidade de garantir a procedência genética dos animais.

No Brasil, o uso da identificação microscópica de pelos é recente em relação aos outros países não existindo até o presente momento, nenhum trabalho com aplicação zootécnica, sendo, portanto, pouco explorada na agropecuária.

O conhecimento, o estudo e, principalmente, a divulgação desta técnica abre a perspectiva para a pesquisa em diversas áreas da produção animal principalmente nos estudos relacionados aos recursos genéticos animal (RGAs). Do ponto de vista zootécnico a utilização de uma metodologia associada a amostras biológicas de fácil acesso, de rápida execução, com baixo custo de realização e confiável é uma alternativa de grande importância, uma vez que pode viabilizar a identificação de produtos em sistemas de identificação de procedência além de auxiliar no manejo de animais em programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento animal. O presente trabalho foi redigido com o objetivo de descrever detalhadamente uma adaptação da metodologia descrita por Quadros e Monteiro-Filho (2006) para a de colheita, limpeza e preparação de pelos para observação de padrões morfológicos de cutículas e medulas, em microscopia óptica, incluindo morfometria das estruturas. Esse trabalho também visa difundir o uso da técnica de tricologia na atividade de pesquisa e desenvolvimento agropecuário

¹ Zootecnista, Ms, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Campus Samambaia, 74001-970 Goiânia, GO, (gizootecnista@yahoo.com.br)

² Zootecnista, Dr., Embrapa Pantanal, Caixa Postal 109, 79320-900 Corumbá-MS (ubiratan.piovezan@embrapa.br)

³ Bióloga, Dra. Universidade do Pantanal, Setor Litoral, 83260-000 Matinhos, PR (quadros.juliana@hotmail.com)

⁴ Zootecnista, Dra. Embrapa Gado de Corte, 79106-550 Campo Grande, MS (fabiana.alves@embrapa.br)

⁵ Médica Veterinária, Dra., Embrapa Pantanal, Caixa Postal 109 79320-900, Corumbá, MS (raquel.juliano@embrapa.br)

⁶ Médica Veterinária, Dra. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Campus Samambaia, 74001-970, Goiânia, GO (mariaclorinda@gmail.com)

Colheita dos pelos

As amostras de pelos devem ser retiradas manualmente, utilizando-se luvas de látex, da região entre escápulas dos animais, ou seja, na junção da linha mediana com a linha da escapula, no dorso dos espécimes. Os pelos devem ser retirados em quantidade (centenas) e armazenados em envelopes de papel pequenos, rotulados com dados referentes à espécie, o local e data da colheita, coordenadas geográficas e outras informações importantes para o estudo. As amostras devem ficar armazenadas à temperatura ambiente até serem examinadas.

Além da região escapular (dorsal), os pelos também podem ser colhidos de outras regiões do corpo dos animais, uma vez que, trabalhos realizados (DAY, 1966; DREYER, 1966; RIGGOTT; WYATT, 1980) demonstraram que pelos de diferentes regiões podem ser comparados entre si, sem prejuízos na identificação. Da mesma forma, pelos de animais de diferentes sexos e idades podem ser comparados. Isso parece ser relevante, principalmente em espécies pouco estudadas as quais não há informações disponíveis sobre essas características diferenciais.

Os pelos de extremidades tais como orelhas, cabeça, cauda, pescoço, crina, juba, patas, etc, não são utilizados em avaliações tricológicas com a finalidade de diferenciação de espécies, pois apresentam padrões semelhantes. O mesmo se aplica aos pelos de animais jovens ou pelos em crescimento (DAY, 1966; DREYER, 1966; RIGGOTT; WYATT, 1980). Ingberman e Monteiro-Filho (2006) descrevem que é indicado o uso de pelos de espécimes adultos, devido ao fato da pelagem de jovens ser constituída quase que totalmente por subpelos, inapropriados para tricologia.

Conteúdos fecais, gastrintestinais, regurgitos, além de dispositivos coletores de pelos (fitas adesivas), locais de ocorrência forenses, sítios zooarqueológicos e sítios paleontológicos são fontes para obtenção de pelos citadas por Quadros e Monteiro-Filho (2006).

Na produção animal, esta técnica foi proposta, como metodologia a ser aplicada em programas de conservação de raças ovinas nativas da Itália com a finalidade de garantir a procedência genética dos animais, já que nesse país os produtos (principalmente queijos) que tradicionalmente utilizam raças locais, são mais valorizados. A validação dos resultados obtidos foi realizada pelo uso da análise do DNA dos animais, os resultados apresentados foram satisfatórios e os pesquisadores pretendem estabelecer um painel de características do pelo capaz de confirmar a origem racial desses ovinos em Programas de Certificação e Indicação de origem, muito comuns na Europa (TORMEN, 2011).

No Brasil, uma equipe de pesquisadores da Embrapa Pantanal, Embrapa Gado de Corte, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal do Paraná associaram-se a pesquisadores da Universidade de Padova, na Itália, para realizar um estudo visando à

caracterização das raças bovinas locais brasileiras Pantaneiro e Curraleiro por meio do estudo das características dos pelos. A finalidade é disponibilizar uma técnica alternativa, de baixo custo, para a identificação racial desses animais auxiliando programas de conservação das raças brasileiras localmente adaptadas, bem como, outras espécies de interesse zootécnico.

Preparo das lâminas para observação da impressão cuticular

De cada amostra individual a ser analisada, devem ser separadas subamostras de pelos guarda, pertencentes ao grupo dos pelos guarda primários ou secundários que apresentam ao longo de seu comprimento, duas porções principais: a haste e o escudo. A haste é a porção que se segue ao bulbo do pelo, sendo mais estreita podendo apresentar-se tanto reta quanto ondulada. O escudo é mais alargado e fica entre a haste e a extremidade distal do pelo (Figura 1). Esta classificação foi proposta por Day (1966) e Teerink (1991).

Os pelos guarda que contiverem bulbo e ápice devem ser separados e lavados em álcool comercial e detergente. Para facilitar a limpeza, a lavagem dos pelos pode ser feita utilizando um agitador magnético (Figura 2). Após a lavagem, os pelos devem ser secos em papel absorvente.

Os métodos para observação da cutícula envolvem a impressão da superfície do pelo (cutícula) sobre uma fina camada de esmalte. Para que a impressão seja nítida é necessário que os pelos estejam muito limpos a fim de que as escamas cuticulares apresentem sua forma impressa com o detalhamento necessário para análise. Segundo Quadros e Monteiro Filho (2006) somente o uso de álcool etílico comercial na limpeza dos pelos é insuficiente.

Para algumas espécies, como é o caso de *Dasyus novemcinctus* (tatu-galinha), maiores cuidados durante o processo de limpeza são necessários, como ação mecânicas de passar o pelo molhado em álcool, no papel absorvente, várias vezes, para garantir a limpeza. Entretanto, foi observado que para os bovinos esses cuidados ainda não foram suficientes. Diante disso, recomenda-se que os pelos guarda que contiverem bulbo e ápice sejam separados e lavados em uma mistura de álcool comercial e detergente. Além disso, para obter melhores resultados, a lavagem dos pelos deve ser feita utilizando um agitador magnético (Figura 2), para posteriormente serem secos em papel absorvente.

Sobre uma lâmina microscópica de vidro, limpa, espalha-se uma fina camada de esmalte para unhas, incolor. Após a secagem do esmalte, em temperatura ambiente, durante 15 a 20 minutos, o pelo será colocado sobre a camada de esmalte. O tempo de secagem deve ser ajustado de acordo com as condições de temperatura e umidade de cada laboratório, pois há pequenas variações.

Para realizar a impressão da cutícula no esmalte, coloca-se a lâmina contendo o(s) pelo(s) entre pedaços de madeira, previamente revestidos com isopor e fita adesiva transparente, formando um sanduíche. O conjunto deve ser pressionado em uma morsa ou prensa retangular por alguns instantes ou até a confecção da próxima lâmina (Figura 3).

Depois de aberta a morsa, a lâmina com os pelos deve ser separada do resto do conjunto e o(s) pelo(s) deve(m) ser removido(s) pela extremidade distal, esfregando-se gentilmente a ponta do dedo, conforme descrito por Quadros e Monteiro-Filho (2006).

Analisando as imagens em microscópio óptico, notou-se que a presença de células epiteliais da mão danificaram a impressão, por isso recomenda-se o uso de luvas de vinil, sem talco, para a remoção dos pelos.

As impressões de cutícula podem ser guardadas à temperatura ambiente, para posterior observação em microscópio óptico, porém protegidas de pó e de umidade. Cabe ressaltar a importância do uso de luvas para maior durabilidade das lâminas produzidas, uma vez que pode ocorrer a instalação de fungos.

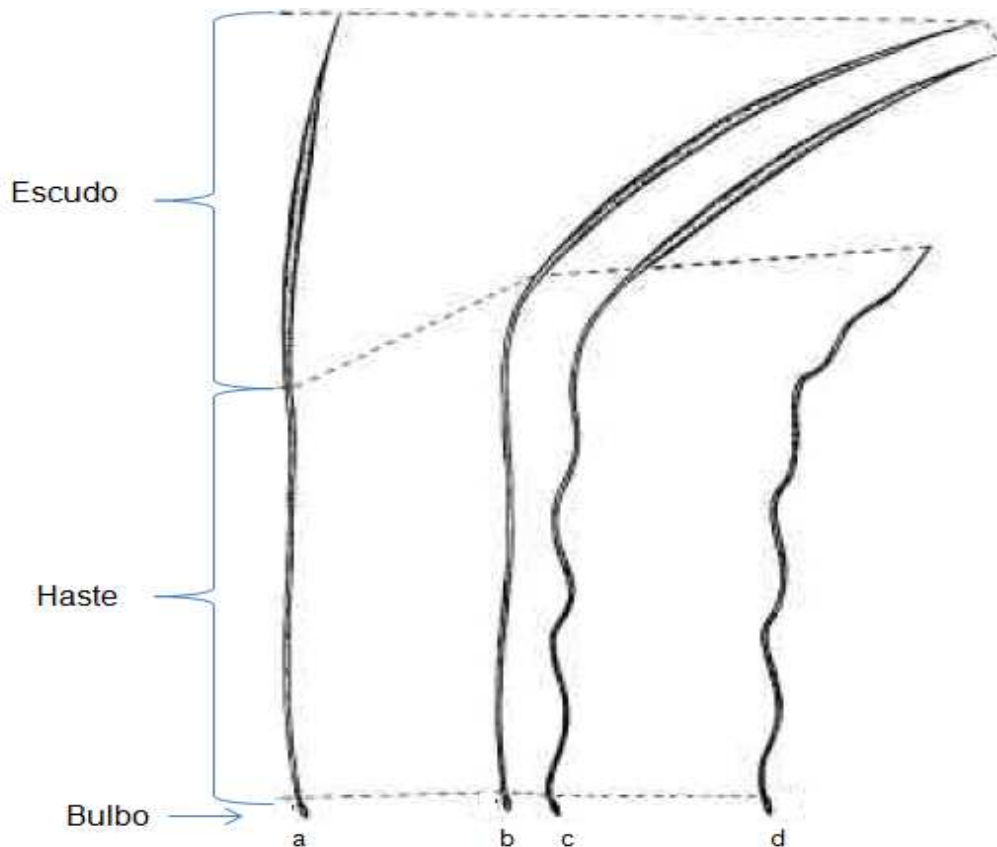


Figura 1. Tipos de pelos de acordo com as chaves de leitura tricológica. (a) pelo guarda primário; (b) pelo guarda secundário com haste reta; (c) pelo guarda secundário com haste ondulada (d) subpelo.
Fonte: Adaptado de Quadros (2002).



Foto: Gisele A. Felix

Figura 2. Lavagem de pelos guarda utilizando agitador magnético.



Foto: Gisele A. Felix

Figura 3. Morsa para impressão de cutícula. Dois pedaços de madeira previamente revestidos com isopor e fita adesiva prensam a lâmina com uma camada de esmalte contra o(s) pelo(s) guarda(s) a serem impressos no esmalte.

Preparo das lâminas para observação da medula

Para que a medula possa ser vista com clareza sob incidência da luz do microscópio, realiza-se a diafanização do pelo com a finalidade de aumentar a transparência (TEERINK, 1991).

Os pelos retirados da lâmina de impressão cuticular são colocados em uma mistura de água oxigenada cremosa 30 volumes e pó descolorante, ambos de uso cosmético, por 60 minutos. Pelos espessos devem ser cortados transversalmente, de uma a três vezes nessa etapa, na altura do escudo. Em seguida os pelos são lavados em álcool e posteriormente em água (sem uso de misturador), sendo finalmente secos em papel absorvente. Nessa fase, não se recomenda o uso do agitador magnético, pois verificou-se o comprometimento da estrutura do pelo, possivelmente porque o uso desses produtos químicos deixou os pelos mais frágeis.

Alguns pesquisadores não utilizam esse processo químico de clareamento do pelo e preferem observar a medula colocando água ou glicerina diretamente sobre o pelo, para confecção de lâminas temporárias. Esse procedimento facilita a substituição dos espaços medulares que contém ar, facilitando a refração e a visualização das estruturas. O pelo deve ser coberto com lamínula.

As lâminas permanentes devem ser montadas com meio sintético transparente e lamínula. A maioria dos pesquisadores que atua na área da tricologia recomenda o Bálsamo do Canadá sintético, entretanto, Quadros e Monteiro-Filho (2006) descreveram que esse método apresenta desvantagens pelo longo tempo de secagem e a coloração amarelada que produz, sendo o Entellan o produto mais vantajoso, por ser totalmente transparente e de secagem rápida. No entanto, para as condições de Corumbá (MS) que apresenta clima tropical com umidade relativa do ar em torno de 75% e

altas temperaturas no verão, o Entellan não se mostrou eficiente, aumentando muito o tempo de secagem. Nessas condições, o produto mais recomendado para a confecção das lâminas permanentes é o Óleo de Cedro para microscopia.

A leitura das lâminas microscópicas deve ser realizada em microscopia óptica, com aumento de 200 a 400x, conforme a dimensão do pelo, pois é necessário que toda a espessura do pelo seja abrangida no campo visual.

Padrões morfométricos das microestruturas dos pelos

Para reduzir a subjetividade do processo convencional da análise de microestruturas dos pelos, a aplicação de técnicas de computação em associação com medidas quantitativas de parâmetros que descrevem características taxonômicas e as relações entre elas, vem se mostrando bastante eficiente (MOYO et al., 2006; STRAVISI, 2007; VALENTIN et al., 1994; VERMA, et al., 2002).

A partir das lâminas elaboradas, cada pelo devem ser fotografado. A fotografia digital permite aumentar o contraste e trabalhar diretamente na imagem (BAYER et al., 2001; STRAVISI, 2007). É recomendada a obtenção de imagens de microscopia em duas zonas distintas dos pelos: no terço distal da haste e na parte mediana do escudo (STRAVISI, 2007).

Para cada pelo, devem ser selecionadas quatro fotografias, sendo duas de cada uma das zonas (escudo e haste). As imagens devem ser gravadas em formato JPG. Para a análise das imagens, sugere-se o software livre "ImageJ - Open software". O ImageJ permite realizar medidas das regiões de interesse dos pelos (MOYO et al., 2006).

As imagens fotográficas podem ser convertidas em tons de cinza, para eliminar o efeito de cor. Se necessário, a imagem pode ser melhorada utilizando as funções de brilho e contraste. O programa permite a conversão de pixels para unidades de medida como micrometro (μm) e definição da escala. As medidas devem ser tomadas tanto para os padrões cuticulares (Figura 4) quanto para os medulares (STRAVISI, 2007).

Para os padrões medulares deve-se medir a espessura total dos pelos e a espessura da medula, por meio de linhas retas correspondentes aos diâmetros.

Já para os padrões cuticulares, deve-se realizar um desenho à mão livre do contorno das escamas da cutícula para mensuração de área e perímetro de escamas, entre outras características (STRAVISI, 2007).

Estas medidas devem ser efetuadas para obtenção dos índices quantitativos relacionados a cutícula, índices quantitativos inerentes a medula, bem como os índices quantitativos relacionados ao córtex e à espessura dos pelos. Para se desenhar as estruturas, sugere-se o uso de uma mesa digitalizadora (STRAVISI, 2007).

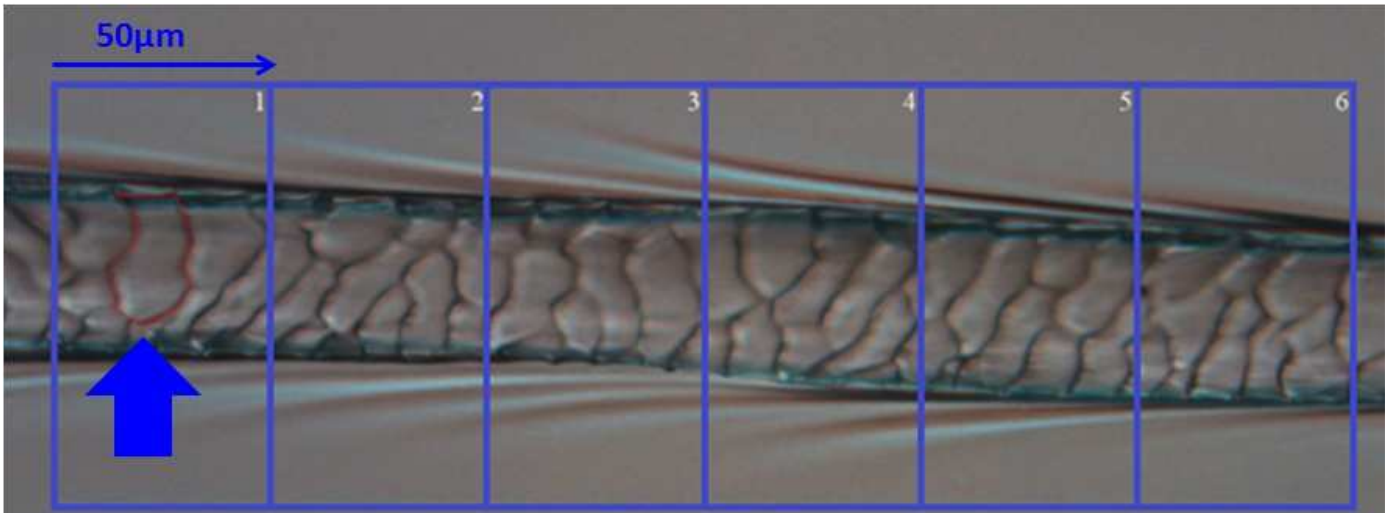


Figura 4. Utilização do Software ImageJ para realização de medidas e obtenção dos índices quantitativos (área e perímetro em μm) relacionados à cutícula.

Fonte: Adaptado de Tormen (2013).

Conclusões e Recomendações

A técnica apresentada é de fácil execução, confiável e economicamente vantajosa, além de viável como ferramenta de identificação de espécies de mamíferos. Sua aplicação na pesquisa e desenvolvimento da produção animal brasileira, ainda incipiente, precisa ser ampliada, principalmente no caso de rebanhos incluídos em programas de conservação e processos de certificação de origem envolvendo espécies domésticas e silvestres de interesse econômico.

Agradecimentos

Rede Pró Centro Oeste, Universidade Federal do Paraná, Embrapa Pantanal, Universidade Federal de Goiás – UFG, Fundect, CNPq e CAPES.

Referências

- BAYER, M. M.; DROOP, S. J. M.; MANN, D. G. Digital microscopy in phycological research, with special reference to microalgae. **Physiological Research**, Praga, v. 49, p. 263-274, 2001.
- DAY, M. G. Identification of hair and feather remains in thegut and faeces of stoats and weasels. **Journal of Zoology**, London, v. 148, p. 201-217, 1966.
- DREYER, J. H. A study of hair morphology in the family Bovidae. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 33, n. 1-4, p. 379-472, 1966.
- INGBERMAN, B.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. Identificação microscópica dos pelos das espécies brasileiras de *Alouatta lacépède*, 1799 (Primates, Atelidae, Alouattinae). **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 1, p. 61-71, 2006.
- MAYER, W. V. The hair of California mammals with keys to the dorsal guard hairs of California mammals. **The American Midland Naturalist**, Notre Dame, n. 48, p. 480-512, 1952.

MOYO, T.; BANGAY, S.; FOSTER, G. The identification of mammalian species through the classification of hair patterns using image pattern recognition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON VIRTUAL REALITY, COMPUTER GRAPHICS, VISUALIZATION AND INTERACTION IN AFRICA, 4., 2006, Cape Town, South Africa. **Anais...** [online]. Cape Town, 2006. p. 177-181. Disponível em:

<<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1108590.1108619>>.

Acesso em: 13 ago. 2013.

QUADROS, J.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Effects of digestion, putrefaction and taxidermy processes on *Didelphis albiventris* hair morphology. **Journal of Zoology**, Londres, v. 224, p. 331-334, 1998.

QUADROS, J. **Identificação microscópica de pêlos de mamíferos brasileiros e sua aplicação no estudo da dieta de carnívoros**. 2002. 127f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

QUADROS, J.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. Coleta e preparação de pelos de mamíferos para identificação em microscopia óptica. **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 274-278, 2006.

RIGGOTT, J. M.; WYATT, E. H. Scanning electron microscopy of hair from different regions of the body of the rat. **Journal of Anatomy**, London, v.130, n.1, p.121-126, 1980.

STRAVISI, A. **Uso del pelo nel monitoraggio dei grandi carnivori**. 2007. 115f. Graduation Thesis (Dottorato di Ricerca in Scienze e Biotecnologie Agrarie) – Faculty of Veterinary, Università degli Studi di Udine, Udine.

TEERINK, B. J. **Hair of west European mammals: atlas and identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 224 p.

TORMEN, N. The trichological analysis in the study of local sheep breeds. **Italian Journal of Animal Science**, v.10, supp. 1, p.37, 2011.

TORMEN, N. **Conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche animali autoctone**. 2013. 87f. Tesis (Graduation in Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Animali) - Faculty of Agraria, University of Padua, Padua.

VALENTIN, D.; ABDI, H.; O'TOOLE, A. J.; COTTRELL, G. W. Connectionist models of face processing: a survey. **Pattern Recognition**, Elmsford, v. 27, p. 1209-1230, 1994.

VERMA, M. S.; PRATT, L.; GANESH, C.; MEDINA, C. Hair-MAP: a prototype automated system for forensic hair comparison and analysis. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 129, n. 3, p. 168–186, 2002.

WALLIS, R. L. A key for the identification of guard hairs of some Ontario mammals. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 71, n. 3, p. 587-591, 1993.

COMO CITAR ESTE DOCUMENTO

FELIX, G. A.; PIOVEZAN, U.; QUADROS, J.; ALVES, F.V.; JULIANO, R.S; FIORAVANTI, M.C.S. **Adaptação da metodologia: análise de microestruturas de pelos para identificação de mamíferos - tricologia**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2014. 6 p. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 96). Disponível em: <www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT96.pdf> Acesso em: 11 nov. 2014.

Comunicado Técnico, 96

Embrapa Pantanal
Endereço: Rua 21 de Setembro, 1880
Caixa Postal 109
CEP 79320-900 Corumbá, MS
Fone: 67-3234-5800
Fax: 67-3234-5815
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição
1ª impressão (2014): formato digital

Comitê Local de Publicações

Presidente: Suzana Maria Salis
Membros: Ana Helena B. M. Fernandes
Dayanna Schiavi N. Batista
Sandra Mara Araújo Crispim
Vanderlei Donizeti A. dos Reis
Secretária: Eliane Mary Pinto de Arruda

Expediente

Supervisora editorial: Suzana Maria Salis
Editoração eletrônica: Eliane Mary Pinto de Arruda
Disponibilização na home page: Marilisi Jorge da Cunha