

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAMILA ALAMPE CARDOSO

Identificação e cultivo de células somáticas do folículo das penas como fonte para banco de recursos biológicos de espécies de aves selvagens.

Pirassununga

2020

CAMILA ALAMPE CARDOSO

Identificação e cultivo de células somáticas do folículo das penas como fonte para banco de recursos biológicos de espécies de aves selvagens.

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof.^a Dr.^a Daniele dos Santos Martins

Pirassununga

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo

**Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

C268i Cardoso, Camila Alampe
Identificação e cultivo de células somáticas do folículo das penas como fonte para banco de recursos biológicos de espécies de aves selvagens. / Camila Alampe Cardoso; orientadora Daniele dos Santos Martins. -- Pirassununga, 2020.
61 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. cultivo celular. 2. células somáticas. 3. criopreservação. 4. aves. 5. penas. I. Martins, Daniele dos Santos, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Cardoso, Camila Alampe

Título: Identificação e cultivo de células somáticas do folículo das penas como fonte para banco de recursos biológicos de espécies de aves selvagens.

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data da Aprovação: ___/___/___

Prof.(a)Dr.(a)_____

Instituição_____

Presidente da Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição _____

Prof.(a) Dr.(a)_____

Instituição _____

COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (C.E.P.-FZEA): 14.1.1465.74.

CEUA Nº: 6378040618

A minha querida Filha Manuela Alampe Cardoso Colleta

Ao meu marido Renan Santo Colleta,

que sempre esteve ao meu lado.

*Aos meus queridos pais Sandra Regina Cardoso e Gilberto Cardoso pelo
incentivo constante, e por me ensinarem a enfrentar os desafios sempre
com coragem e otimismo.*

A minha vó Maria Amélia Martins Pimpão por todo amor e carinho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por tudo que proporciona na minha vida. Obrigada por me dar força e coragem para enfrentar obstáculos, obrigada por me mostrar quais os caminhos devo seguir e principalmente obrigada por iluminar a minha vida.

Ao meu marido *Renan Santo Colleta*, por estar sempre comigo, por me apoiar na realização dos meus sonhos e fazer com que a vida seja mais leve e doce. Obrigada por me dar a família que tanto amo.

Obrigada a minha querida filha *Manuela Alampe Cardoso Colleta* por completar minha vida trazendo mais amor e felicidade.

À meus pais *Sandra Regina Cardoso e Gilberto Cardoso* por toda motivação, incentivo e pelo apoio no meu futuro.

À minha querida avó *Maria Amélia Martins Pimpão* por sempre estar ao meu lado.

À FZEA-USP por ter sido minha segunda casa e dar amigos que trouxeram tantos momentos importantes e felizes da minha vida.

À minha orientadora *Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins*, por acreditar no meu trabalho, me incentivar na pesquisa e por todas as oportunidades de crescimento que me foram dadas.

À Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro e seus profissionais que me receberam de braços abertos e que me fazem cada dia amadurecer como pessoa e como profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos”.

Paulo Freire

RESUMO

CARDOSO, C. A. **Identificação e cultivo de células somáticas do folículo das penas como fonte para banco de recursos biológicos de espécies de aves selvagens** [Identification and culture of somatic cells from feather follicle as a source for the biological resource bank of wild bird species], 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

As penas são consideradas os apêndices epidérmicos de maior complexidade encontrados nas aves. Seu crescimento ocorre mediante uma complexa cascata de indução e comunicação entre a derme e a epiderme, determinado pelo folículo que possui no seu interior uma região chamada polpa, também conhecida por ser a parte mesenquimal da pena. A polpa é uma provável fonte de células somáticas, o qual abriga uma matriz extracelular, fibroblastos e vasos sanguíneos incluindo uma artéria axial central, além de vasos e capilares menores. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de cultivo de células somáticas presentes no folículo das penas e avaliar sua viabilidade para formação de um banco de recursos biológicos de aves selvagens. Utilizar células da polpa é um excelente caminho devido a facilidade de obtenção das células, sendo um método pouco invasivo e que necessita de poucos recursos. Estabelecemos uma metodologia de cultivo para descrição da análise macroscópica e cultivo celular das células do folículo das penas, os cultivos foram divididos em três grupos de acordo com o tempo de cultivo primário até atingir confluência acima de 80%, onde as células do grupo I mantiveram-se mais tempo em cultivo quando comparado com os dos grupos II e III. As células em cultivo apresentaram proliferação celular e presença de células flutuantes como eritrócitos e como células com formato fibroblástico; porém houve a diminuição da quantidade de células e consequente morte celular com o passar do tempo. As células foram

testadas quanto a viabilidade de criopreservação, demonstrando células vivas no pré e pós congelamento, ainda que com menor porcentagem, mas preservando suas morfologias. As células após descongelamento apresentaram viabilidade média de 68,8%. Esses resultados comprovam que é possível o isolamento de células somáticas a partir do folículo das penas de aves, sugerindo que esta é uma fonte de grande valia, viável e eficaz para a obtenção de material biológico para elaboração de um banco.

Palavras-chave: Criopreservação, folículo das penas, células somáticas

ABSTRACT

CARDOSO, C. A. Identification and culture of somatic cells from the feather follicle as a source for the biological resource bank of wild birds species, 2020. 63 p. Dissertation (Masters) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2020.

Feathers are considered the most complex epidermal appendages found in birds. Their growth occurs through a complex cascade of induction and communication between the dermis and the epidermis, determined by the follicle that has inside a region called pulp, also known to be the mesenchymal part of the feather. Pulp is a provable source of somatic cells, which houses an extracellular matrix, fibroblasts and blood vessels including a central axial artery, and smaller vessels and capillaries. The objective of this study was to establish a protocol for the cultivation of somatic cells present in the feather follicle and to evaluate their viability for the formation of a biological resource bank of wild birds. The use of pulp cells is an excellent path due to the ease of obtaining the cells, being a method that is not invasive and requires few resources. We established a cultivation methodology to describe the macroscopic analysis and cell culture of the feather follicle cells, the cultures were divided into three Groups according to the time of primary cultivation until reaching confluence above 80%, where the cells of group I were kept longer in culture when compared with those of groups II and III. Cells in culture showed cell proliferation and the presence of floating cells like erythrocytes, like fibroblast cells; however there was a decrease in the amount of cells and consequent cell death over time. The cells were tested for cryopreservation viability, demonstrating living cells in pre- and post-freezing, although with a lower percentage, but preserving their morphologies. The cells after thawing showed mean viability of 68,8%. These results show that it is possible

to isolate somatic cells from the follicle of birds feathers, suggesting that this is a source of great value, viable and effective for obtaining biological material for a bank.

Key-words: Cryopreservation; feather follicle, somatic cells

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação esquemática da formação das penas. 23
- Figura 2:** Esquema das estruturas da principal zona de atividades das células de um folículo em desenvolvimento em corte seccionado. 24
- Figura 3:** Esquema do ciclo de formação das penas ao longo da iniciação, crescimento, descanso e regeneração. 25
- Figura 4:** Representação das estruturas penáceas e plumuláceas. 25
- Figura 5:** Representação esquemática das estruturas de penas das asas. 32
- Figura 6:** Fotografias demonstrando o local e o método de coleta. Aviário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA-USP. 32
- Figura 7:** Seleção da região do cálamo de *Gallus domesticus* contendo a polpa da pena. 33
- Figura 8:** Fotomicrografia da estrutura da pena de *Gallus domesticus* com 12 dias de vida. 38
- Figura 9:** Fotomicrografias das etapas da preparação do material de cultivo. 40
- Figura 10:** Fotomicrografias das células do Grupo I em diferentes passagens. 42
- Figura 11:** Fotomicrografias da placa de cultivo celular do Grupo II após 72 horas de cultivo. 43
- Figura 12:** Fotomicrografias da placa de cultivo celular do Grupo III. 44
- Figura 13:** Fotomicrografias da placa de cultivo celular do Grupo II, criotubo 2. 45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Número de amostras viáveis de acordo com a idade dos animais. **39**
- Gráfico 2:** Número de células pré e pós congelamento durante o processo de criopreservação. **45**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Degradação Ambiental e conservação das espécies aviárias.....	21
3.2 Anatomia, desenvolvimento e função das penas.....	22
3.3 Células do folículo das penas e seu potencial.....	26
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivos geral.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Procedência das amostras.....	31
5.2 Local da execução do projeto.....	31
5.3 Procedimentos para a coleta do material biológico.....	31
5.4 Padronização do Isolamento e cultivo das células somáticas da espécie <i>Gallus domesticus</i>	33
5.5 Propagação em cultivo: Repique celular.....	34
5.6 Avaliação da capacidade de formação de colônias.....	35
5.7 Contagem Celular.....	35
5.8 Criopreservação de células somáticas do folículo da pena.....	35
5.9 Procedimento de descongelamento e cultivo das células.....	36
6. RESULTADOS	38
6.1 Estudo macroscópico das estruturas da pena.....	38
6.2 Obtenção e preparo do material coletado.....	39
6.3 Cultivo Celular.....	41
6.4 Criopreservação.....	44
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO.....	51
9. REFERÊNCIAS	52



1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os atritos constantes entre as atividades humana e a natureza levam o planeta a mudanças ambientais significativas e são uma das principais questões deste século, sem resolução à vista (PRIETO et al. 2014). Tais mudanças afetam a disponibilidade de recursos naturais causadas pelas alterações climáticas (HAMUDUDU e NGOMA, 2019), fragmentação de habitat e redução de ambientes adequados para diversas espécies (ANDRÉN, 1994; CARRERE et al., 2009; REINO et al., 2013), efeitos diretos ou indiretos da agricultura, como por exemplo, intensificação agrícola ou uso de pesticidas e a densidade de casas e assentamentos humanos derivados da urbanização (TRATALOS et al., 2007; REES e WACKERNAGEL, 2008). Com essas rápidas mudanças atualmente ocorrendo no clima e nos habitats, milhares de espécies selvagens correm o risco de desaparecer (DONALD et al., 2002, 2001; SANDERSON et al., 2013; VICKERY et al., 2004).

Até o ano de 2018, o número de espécies ameaçadas de extinção foi de 26.000, dos quais 14% corresponderam a espécies aviárias (IUCN 2018).

Atualmente, o Brasil é o segundo país do mundo com o maior número de espécies de aves (1.919 espécies), ficando apenas atrás da Colômbia (REMSSEN et al. 2015). Além disso, apresenta o maior número de novas espécies descritas na última década (31 espécies) (CBRO 2014) e também é o país com o maior número mundial de aves ameaçadas de extinção (164 espécies) (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2015).

No total 234 táxons são oficialmente considerados ameaçados, 160 (68,4%) são espécies endêmicas do Brasil. As grandes ameaças às aves brasileiras são representadas pelo desmatamento e a fragmentação de habitat oriundos de atividades antrópicas, especialmente aquelas relacionadas a agricultura, pecuária e a expansão urbana. Outras ameaças são as queimadas e a captura de animais, seja para consumo ou para o comércio ilegal para servirem como animais de estimação (ICMBIO, 2018).

Diante deste quadro, são aplicados diversos recursos tecnológicos e pesquisas científicas para entender as diversidades do problema na tentativa de oferecer soluções viáveis para preservação das espécies de aves selvagens (BLANCO et al. 2009).

Para evitar o agravamento desse quadro crítico devem ser tomadas medidas emergenciais (MMA, 2003). O uso sustentável da diversidade biológica e a preservação desses animais pode ser realizado de diversas maneiras, a conservação *in situ*, mecanismo mais utilizado na conservação de espécies animais, permite que pequenas populações sejam mantidas

em seu ambiente original (ANDRABI & MAXWELL, 2007). Além disso, são utilizados métodos e técnicas de manutenção dos animais vivos fora de seu ambiente (*ex situ, in vivo*), ou ainda a coleta, armazenamento e uso a longo prazo de biomateriais, ou seja, germoplasma, embriões, tecidos, produtos sanguíneos e DNA (HIEMSTRA et al., 2005; ANDRABI e MAXWELL, 2007).

Uma vez que o material biológico seja coletado, armazenado e usado adequadamente, torna-se uma excelente alternativa, pois leva a diminuição das limitações impostas pelo tempo e oferece base para estudo genético e informações sobre populações de uma mesma espécie em ambientes diferentes (LOSKUTOFF, 1998). Com a criopreservação de células somáticas e estaminais em botijões de nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, o biomaterial congelado é capaz de manter as mesmas características após o descongelamento durante anos (SANTOS, 2000).

Sendo assim, a busca de fontes alternativas para conservação de aves por meio de métodos menos agressivos como por exemplo a utilização de embriões, é fundamental para a criação de bancos de recursos biológicos de animais ameaçados de extinção (HARNAL et al., 2002; CROSIER et al., 2006). SASAKI et al. (1968) demonstraram que as penas retiradas de aves de vida livre ou de zoológicos podem ser usadas para o cultivo celular e posterior análise cromossômica em diversas espécies aviárias. Comparado com amostras de sangue ou tecido, a amostra de penas requer pouco treinamento, resulta em pouco tempo para manuseio, não gera resíduos perigosos, requer procedimentos de armazenamento mais simples, além de ser um método pouco invasivo de adquirir uma amostra genética (HARVEY et al., 2006).

As penas promovem diversas funções no organismo das aves como a manutenção da temperatura corporal, a proteção contra choques mecânicos, a impermeabilização do corpo, a comunicação e principalmente o auxílio a biomecânica do voo (CHUONG et al., 2003). As penas são os apêndices epidérmicos mais complexos encontrados nas aves (STETTENHEIM, 2000). Possuem grande diversidade seja pela sua forma, coloração, tamanho e textura (PRUM et al., 2001).

O processo de desenvolvimento das penas tem sido bem elucidado histologicamente e estruturalmente (STETTENHEIM, 2000). As células do folículo das penas são responsáveis principalmente pela reconstrução do tecido epitelial. Quando ativadas, se tornam capazes de gerar proliferação de progênies, das quais são necessárias linhagens celulares para a formação de tecidos específicos (CHANG, 2004). Dependendo dos nichos de células que são criados pela papila dérmica, as células caracterizadas como células estaminais são capazes de desenvolver diferentes formas de penas. Assim, as células do folículo das penas são consideradas um excelente meio para estudo e investigação de mecanismos de regeneração (YUE, 2005).

A elaboração de um banco de germoplasma de aves visa cultivar, isolar e criopreservar células somáticas das aves para análise e estudo das características moleculares, além de ser um modelo alternativo a conservação de espécies com populações reduzidas e/ou risco de extinção. Em casos extremos, é possível utilizar células somáticas para multiplicação de indivíduos pelo processo de clonagem (TROUNSON, 1998). A utilização de células do folículo das penas é um excelente caminho devido a facilidade de obtenção das células somáticas das espécies aviárias (RYDER, 2002).

O objetivo da criação de um banco de recursos genéticos é impedir a diminuição e fragmentação das populações de aves selvagens que por sua vez, levam a perda da diversidade genética e a extinção das espécies mais ameaçadas. Para que todo o material genético colhido seja armazenado em um banco e útil quando necessário é preciso aperfeiçoar a técnica e garantir que ela seja eficaz.

No Brasil, não existem relatos de nenhum biobanco específico para aves selvagens e por isso nossos estudos visam buscar por uma inovação tanto na metodologia quanto na aplicação da conservação *ex situ* in vitro, como um modelo inédito no País.

Diante disso, o projeto utilizou células do folículo das penas da espécie *Gallus doméstico* para padronização da técnica do cultivo celular e posterior criopreservação, visando no futuro a criação de um banco de recursos biológicos como ferramenta valiosa para a preservação do material genético de diversas espécies de aves selvagens ameaçadas.



2. Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

Por muitos anos, foi realizado inúmeros esforços concentrados apenas na ecologia e conservação *in situ* das espécies de animais selvagens. Contudo, depois de diversos estudos realizados está claro que a conservação *in situ* nem sempre é eficaz para a propagação de pequenas populações de animais (GAÑÁN et al. 2010; LEÓN-QUINTO et al. 2009).

Assim, a conservação de recursos genéticos é uma boa opção para garantir a variabilidade genética das espécies ameaçadas devido a perda contínua dos animais pela degradação ambiental. A utilização de métodos não invasivos ou minimamente invasivos, representa uma solução vantajosa para conservação da diversidade genética (XI, et al 2003).

Estabelecer um protocolo padrão de cultivo celular a partir das células presentes no folículo das penas torna-se a melhor opção para elaboração de um banco de germoplasma. Embora a maioria dos bancos existentes que visam a conservação armazenem sêmen e embriões, o interesse em bancos de células somáticas vem aumentando ao longo dos anos, especialmente com a rápida perda de um grande número de espécies (GUBILI et al., 2017; LEÓN-QUINTO, SIMÓN, SÁNCHEZ, MARTÍN, & SORIA, 2011).

A criopreservação de tecidos somáticos é vantajosa e importante pois é capaz de maximizar a preservação de uma população genética específica (LEÓN-QUINTO, SIMÓN, CADENAS, MARTÍNEZ, & SERN, 2014). O material biológico criopreservado pode ser usado para fins biológicos, genéticos, toxicológicos, epidemiológicos, técnicas de reprodução assistida e também a clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) para resgate genético (MOGOLLÓN-WALTERO, MELLO e BURLA-DÍAS, 2014).

Para que um banco de recursos biológicos tenha êxito e consiga desempenhar todas essas funções é necessário estabelecer um protocolo que permita padronizar e aperfeiçoar o cultivo das células somáticas presentes no folículo das penas uma vez que a técnica é recente e pouco estudada.

Galinhas, galos e frangos são animais selecionados para obtenção de biomateriais uma vez que suas penas são facilmente obtidas, possuem alta capacidade de regeneração, possuem seu acesso mais fácil e o número de indivíduos no planeta é elevado. Além disso, os folículos são grandes em comparação com os folículos de outras espécies, e isso torna todos os aspectos técnicos deste estudo mais fácil de ser conduzido.

Com isso iniciamos nossos estudos com a espécie doméstica, *Gallus domesticus* aprovada pelo Comitê de Ética e pesquisa (CEP-FZEA). As aves utilizadas eram provenientes do aviário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, campus Pirassununga/SP.

Esse estudo visa o primeiro passo para elaboração de um banco de recursos genéticos das espécies aviárias ameaçadas no Brasil.



3. Revisão de Literatura

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Degradação Ambiental e conservação das espécies aviárias

Diversas podem ser as consequências da degradação do meio ambiente, entretanto, a perda da biodiversidade é uma das maiores preocupações atuais (LOSKUTOFF, 1998).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2017), a comunidade científica internacional, os governos de diversos países e as entidades não-governamentais ambientalistas alertam para a perda da diversidade biológica em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais. É notório que no Brasil, observa-se uma ocupação dos biomas de uma forma acelerada e, como consequência, está ocorrendo a devastação de extensas áreas de vegetação nativas no Cerrado do Brasil Central, na Caatinga, na Mata Atlântica e na Amazônia (MMA, 2017).

O surgimento e extinção de espécies estão relacionados ao próprio processo evolutivo do planeta, mas, demandam longos períodos de tempo. No entanto, o homem vem auxiliando no elevado crescimento da taxa de extinção das espécies, a ponto de se tornar atualmente, o principal agente desse processo. Em parte, essa situação deve-se ao uso equivocado dos recursos naturais, o que tem provocado um novo ciclo de extinção de espécies, sem precedentes na história geológica da terra (MMA, 2017).

No Brasil, foi elaborada a lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção pelo MMA e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), contando com a parceria da Fundação Biodiversitas para a Conservação da Diversidade Biológica, da Sociedade Brasileira de Zoologia e da “Conservation International”. Essa lista serve de referência para os diversos programas de conservação e recuperação das espécies ameaçadas, para pesquisadores e para a aplicação da Lei de Crimes Ambientais, podendo usar de base para elaborar medidas atenuantes de impactos ambientais (MMA, 2015).

A extinção é um processo natural, porém lento e deve manter uma relação de equilíbrio ao número de especiações, mutações e modificações das frequências dos alelos que geram novas espécies (RICHMOND et al., 2005).

Nem todas as espécies são igualmente frágeis às mudanças ambientais causadas pela ação humana: existem “vencedores” e “perdedores”. As espécies, bem como as populações possuem níveis diferenciais de risco de extinção e essa classificação entre as mais suscetíveis e as menos, é uma questão fundamental em ecologia e conservação (MCGILL et al., 2015).

As espécies generalistas - com sua amplitude de nicho - são capazes de explorar uma variedade de recursos disponíveis e, por esse motivo, podem ser consideradas menos expostas a riscos de extinção do que as espécies com populações limitadas (CALLAGHAN et al., 2019; DEVICTOR et al., 2008).

Espécies com populações restritas fornecem uma baixa quantidade de adaptações em um determinado habitat e assim se tornam mais propensas à ameaças ambientais. (CLAVEL et al., 2011; COLLES et al., 2009; MCKINNEY, 1997).

Uma dos principais objetivos de um zoológico é conservar as populações e espécies raras ameaçadas, além de promover a educação ambiental. Os zoológicos, santuários e criadouros de animais selvagens possibilitam estudos básicos do comportamento animal e reprodutivo, auxiliando na progressão de técnicas de manejo e de recursos emergenciais caso uma espécie tenha um número reduzido nos seus habitats naturais. Assim podemos dizer que estes estabelecimentos atuam como reservatórios genéticos e demográficos (COSTA & MARTINS, 2008).

Devido a alguns fatores importantes como a limitação de espaço, questões econômicas e sociais não é possível instalar um grande número de animais de uma mesma espécie em zoológicos. Dessa forma, o sucesso da criopreservação permite a superação do tamanho limitado de reservas de animais selvagens e dos zoológicos, aparecendo como alternativa imediata de conservação de material genético em potencial (HIEMSTRA et al., 2005).

Bancos de germoplasma podem ser abastecidos com materiais biológicos de populações selvagens com um pequeno ou grande número de indivíduos, isso permite a variabilidade. Esse material é armazenado e pode ser usado posteriormente para auxiliar no aumento populacional, se for necessário (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005).

Se uma população apresenta baixo número de indivíduos e deseja-se aumentar sua variabilidade genética pode-se utilizar germoplasma de indivíduos de outras regiões. Em casos extremos pode ser realizado o processo de clonagem (TROUNSON, 1998; RYDER, 2002).

3.2 Anatomia, desenvolvimento e função das penas

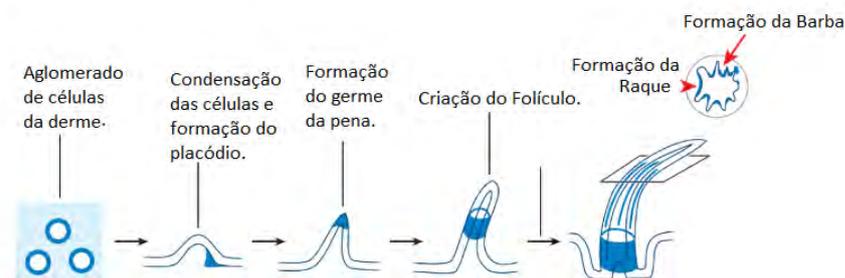
Filogeneticamente relacionadas com as escamas de répteis, as penas são as principais características que identificam as aves. As penas contêm um tipo diferente de queratina e por isso, pesquisadores acreditam que elas evoluíram separadamente das escamas reptilianas (PRUM & BRUSH, 2004).

As penas são estruturas dispostas em repetidos padrões hexagonais presentes na superfície corporal das aves (JIANG et al. 2004). Alguns pesquisadores acreditam que existe um mecanismo chamado pré-padronização (Oster, 1983). Outros apostam no padrão periódico de penas que pode ser gerado por meio de combinações de moléculas que promovem (ativadoras) e suprimem (inibidoras) a formação da condensação dérmica e posterior formação do germe da pena (JIANG et al. 1999; MAINI et al. 2006). Fatores de crescimento de fibroblastos, como FGF2 (fator básico de crescimento de fibroblastos), são ativadores conhecidos e BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas) são inibidores conhecidos nesse processo (TURING, 1952).

O desenvolvimento de uma pena inicia-se ao longo de um engrossamento da epiderme a partir da condensação de células da derme, o chamado placódio. As células dérmicas induzem a diferenciação das células epidérmicas e estabelecem taxas de crescimento e respostas aos hormônios. Então a epiderme assume o controle. Além da capacidade de desencadear o crescimento das penas, a derme tem a capacidade de controlar o tamanho das penas de acordo com a quantidade das suas células presentes na formação do germe (PRUM, 1999).

Assim, após a formação do placódio é gerado um único tubo alongado, que é o germe da pena. Ao redor do germe ocorre uma proliferação de células onde é criado o folículo da pena que apresenta sua estrutura epidérmica e cilíndrica exibindo uma polpa no seu interior composta por uma região mesenquimal da pena e é derivada da papila dérmica (Figura 1) (PRUM, 1999). A papila dérmica tem o formato de uma ampulheta (CHUONG et al. 2001).

Figura 1: Representação esquemática da formação das penas.



Fonte: adaptado de Chih-Feng et al. 2014. **Legenda:** As células indicadas em azul com tons mais escuros indicam áreas de maior proliferação. A proliferação se inicia na ponta da pena, mas logo depois é recuada em direção à base da pena à medida que a morfogênese prossegue. Conforme a formação tubular avança e feito um corte transversal onde é representado pela seta vermelha a formação da barba e pela ponta da seta vermelha a formação da raque.

A polpa é a parte mesenquimal da pena, é composta por uma matriz extracelular e fibroblastos, incluindo laminina e fibronectina, além disso, é rica em vasos sanguíneos que

incluem uma artéria axial central e numerosos vasos e capilares menores (CHUONG E EDELMAN, 1985). A polpa e seu epitélio pulpar circundante acabarão por entrar em apoptose se soltando para permitir que as barbas da pena se abram (YU et al., 2004).

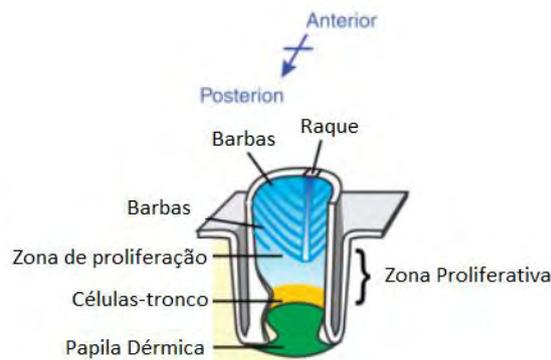
Na base do folículo, existe uma região chamada colarinho. É nessa região que ocorre a proliferação e a produção de queratinócitos dos filamentos das penas, que forçam as células mais velhas a irem para cima e para fora, acabando por criar toda a pena tubular (PRUM, 1999).

A epiderme da parede do folículo possui três camadas: camada germinativa (camada interna), camada intermediária e camada córnea (camada externa). A camada mais externa da epiderme transforma-se na bainha da pena, uma estrutura temporária que protege a pena em desenvolvimento. Já a camada interna da epiderme desenvolve uma série de compartimentos longitudinais, chamados saliências das barbas. Os queratinócitos de dentro das saliências das barbas crescem mais tarde e transformam-se nas bárbulas da pena (JIANG et al. 2004).

As Bárbulas continuam se diferenciando e assumem características diferentes, dependendo dos diferentes tipos de penas. Uma pena penácea típica possui raque e barbas proeminentes capazes de criar uma lâmina planar. As saliências da barba crescem na forma helicoidal ao redor do colarinho até se fundirem para formar a saliência da raque (YU et al., 2004).

Barbas estão presas na lâmina por pares de bárbulas especializadas. As bárbulas que se estendem na direção da ponta da pena são protegidas por uma série de minúsculos ganchos que se entrelaçam, com os sulcos de bárbulas adjacentes (Figura 2) (PRUM, 1999).

Figura 2: Esquema das estruturas da principal zona de atividades das células de um folículo em desenvolvimento em corte seccionado.



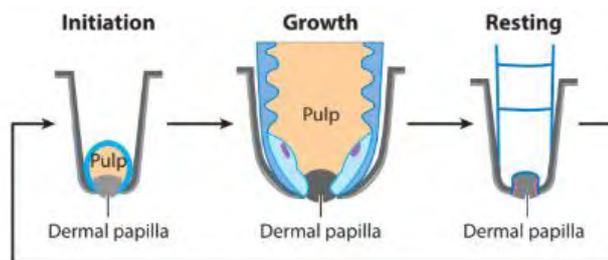
Fonte: Adaptado de Lucas and Stettenheim, 1972, Avia Anatomy-Integument.

À medida que o crescimento se concretiza, a pena emerge da sua bainha superficial. Em seguida, desenrola-se para chegar a sua forma laminar. Quando ela atinge esse estágio, o

colarinho do folículo forma o cálam, um tubo epidérmico homogeneamente diferenciado localizado na base da pena. O cálam é composto por epitélio escamoso estratificado. É transparente, pois não possui pigmento. (LUCAS and STETTENHEIM, 1972).

À medida que o processo de crescimento de uma pena se aproxima da conclusão, a polpa é totalmente absorvida e uma cápsula final é formada sobre a papila dérmica (Figura 3).

Figura 3: Esquema do ciclo de formação das penas ao longo da iniciação, crescimento, descanso e regeneração.

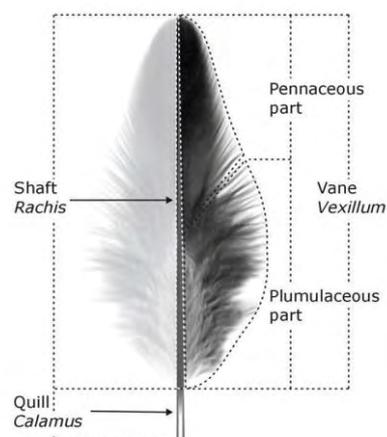


Fonte: adaptado de Chih-Feng et al. 2014. **Legenda:** Epitélio do filamento está representado pela cor cinza, as células-tronco pela cor rosa e a polpa e sua parte mesenquimal pela cor laranja.

Penas penáceas estão presentes por todo o corpo das aves e suas lâminas extremamente próximas criam a superfície aerodinâmica das asas e da cauda (YU et al. 2004).

Diferente das penas penáceas, as plumuláceas ou penas felpudas apresentam apenas uma raque rudimentar e um tufo entrelaçado de barbas com longas bárbulas. As longas e emaranhadas bárbulas atribuem a essas penas suas características fantásticas de isolamento térmico, leveza e ventilação. As penas podem ter uma lâmina penácea e uma base plumulácea (Figura 4) (YU, 2002).

Figura 4: Representação das estruturas penáceas e plumuláceas.



Fonte: Martin Joergensen, The Global Fly Fisher, 2019.

As penas de vôo são penáceas, são de tamanhos distintos nas aves que voam, possuindo um formato de aerofólio para facilitar a elevação. A borda anterior de uma pena de vôo é mais grossa que a borda posterior, esta é larga e achatada (YU et al. 2004).

As penas das asas são compostas por dois tipos de penas de vôo: rêmiges primárias que emergem do perióstio do metacarpo e são numeradas distalmente a partir do carpo e rêmiges secundárias que emergem da ulna sendo numeradas proximal a partir do carpo. Enquanto que as penas da cauda são chamadas de retrizes, são estruturalmente similares as rêmiges, porém simétricas. Podem ser numeradas a partir do centro para as laterais (PRUM, 2004).

3.3 Células do folículo das penas e seu potencial

As penas possuem mecanismos metabólicos, fisiológicos e celulares em relação a regeneração mais complexos se comparado com pêlos de mamíferos. Esses mecanismos incluem a taxa de crescimento, capacidade de expansão, queratinização e formação de diversos padrões, cores e formas. O fácil acesso para a obtenção e o método pouco invasivo tornam as células dos folículos das penas com potencial de células troncos grandes fontes de estudo e investigação sobre seus mecanismos de regeneração (ROGER et al., 2003; YUE et al., 2005).

Jiang 2004 elaborou um sistema de reconstituição para elaboração do germe da pena e posterior formação do folículo e revelou que o crescimento e desenvolvimento da pena é um processo auto-organizado que depende das propriedades das células e do meio ambiente.

A pena inteira é regenerada a partir da organização de algumas células-tronco. As células-tronco devem envolver uma transição múltipla em diferentes tipos de células respondendo aos sinais morfogênicos e gerando novas penas (CHANG, 2004). Uma vez ativadas, essas células possuem a capacidade de gerar a proliferação de progênies, das quais são necessárias linhagens celulares para a formação de tecidos específicos. Em resumo, as células-tronco da epiderme podem produzir células filhas e formar a epiderme interfolicular e os folículos (CLAUDINOT et al., 2005).

Assim, para comprovar o potencial dessas células-tronco do folículo das penas, conseguiu-se obter, sob condições especiais de cultura, o multipotencial para se diferenciarem em adipócitos, neurócitos e queratinócitos (XU et al., 2011). Por meio da influência dos efeitos parácrinos de células diferenciadas e contato direto entre células em uma cultura mista, essas células são capazes de formar a epiderme e seus anexos (XU et al., 2011).

Para a manutenção das características de autorrenovação e diferenciação das células-tronco *in vivo*, é necessário um ambiente especializado denominado nicho. Na ausência desse ambiente natural, ou das misturas artificiais de fatores de crescimento encontrados no meio de cultura para células-tronco *in vitro*, as células começam a se diferenciar. Isso demonstra que, para terem suas características preservadas, essas células são dependentes de fatores que não estão disponíveis em todo o tecido, mas apenas em nichos isolados (MORRISON et al., 2008).

As células-tronco provenientes desses nichos são, portanto, críticas para a reposição e manutenção do balanço de células (homeostase) no tecido e para a regeneração do tecido danificado após injúria (BLANPAIN et al., 2007).

Existem três tipos de cultivos celulares: o cultivo primário, o cultivo secundário (finito) e a linhagem contínua (imortal). O cultivo primário é constituído de células diplóides produzidas a partir de células isoladas diretamente de órgãos ou tecidos por processos de desagregação que podem ser obtidos através da forma mecânica ou enzimática. São caracterizadas por um período de vida médio, limitado e também são sensíveis às infecções causadas por espécies de vírus ao tecido (MATTOS, 2016).

No cultivo secundário ou finito, as células também são diplóides, entretanto, sofreram modificações no seu genoma permitindo sua passagem (ou seja, o processo de renovação de células de uma garrafa para outra) de 60 a 80 subcultivos. Neste tipo de cultivo, as suas células irão morrer ou eventualmente adquirir uma mutação estável, conhecida como transformação ou imortalização, sendo associada à tumorigenicidade (LIU et al., 2003). No cultivo de linhagem contínua, as células são heteroplóides, com números irregulares de cromossomos, e variável permissividade para vários tipos de vírus; no entanto, elas são capazes de propagarem *in vitro* por números indefinidos de passagens (LIU et al., 2003).



4. Objetivos

4. OBJETIVOS

O presente estudo visa estabelecer um protocolo de cultivo celular de células somáticas presentes no folículo das penas e avaliar sua viabilidade para elaboração de um banco de recursos biológicos de aves selvagens.

4.1 Objetivo geral

Isolar, cultivar e criopreservar células somáticas do folículo das penas da espécie *Gallus domesticus*.

4.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar as células somáticas dos folículos das penas.
- Averiguar o potencial celular e a replicação das células.
- Avaliar as concentrações diferentes de células no meio de cultivo.
- Avaliar a proliferação celular pós-criopreservação.
- Obter e cultivar células somáticas do folículo das penas como método alternativo ao uso de embriões na formação de um banco de recursos biológicos para espécies de aves selvagens ameaçadas de extinção.



5. Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Procedência das amostras

A coleta foi realizada no aviário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus Fernando Costa – Pirassununga/SP. O desenvolvimento da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/FZEA/USP número 6378040618.

5.2 Local da execução do projeto

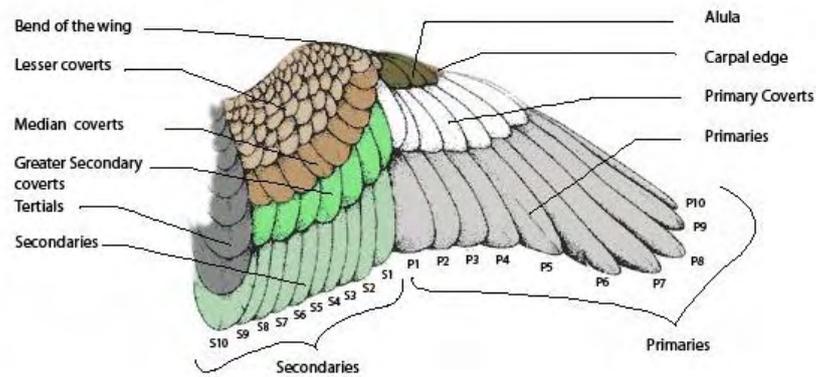
O seguinte estudo foi realizado no Laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Terapias Inovadoras (GDTI) e no Laboratório de Imuno-histoquímica e Fisiologia Experimental (LIFE), ambos pertencentes ao Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo-Pirassununga.

5.3 Procedimentos para a coleta do material biológico

Para realizar a padronização da técnica utilizamos a espécie *Gallus domesticus* por ser uma espécie com grande quantidade de indivíduos presentes no planeta, seu fácil acesso e sua fácil contenção.

Foram utilizadas no total 15 aves provenientes de colônias diferentes do Aviário sem qualquer tipo de parentesco e com diferentes idades, sendo 5 aves com 12 dias, 5 aves com 21 dias e 5 aves com 34 dias, sem distinção de gênero. Cada animal teve 4 penas coletadas sendo 2 retiradas das rêmiges primárias e 2 das rêmiges secundárias, 1 rêmige primária e 1 rêmige secundária do lado direito e 1 rêmige primária e 1 rêmige secundária do lado esquerdo, totalizando 60 amostras (Figura 5).

Figura 5: Representação esquemática das estruturas de penas das asas.



Fonte: Peruaves.org **Legenda:** As penas representadas pela coloração cinza e verde clara são os tipos de penas utilizados para o cultivo celular.

A coleta foi realizada de modo estéril mediante a utilização de luvas, tesoura e pinça de Hadson. Realizamos a antisepsia dos tecidos próximos ao local da coleta da pena com solução de clorexidina a 1% e EtOH 70%.

O método de coleta do material foi feito por arrancamento das penas (Figura 6A e B) e durante a coleta esteve a disposição um frasco de nitrato de prata caso houvesse sangramento da artéria axial presente na base de inserção da pena.

Após retiradas, as penas foram armazenadas em 3 tubos tipo Falcon de 15 mL contendo 8 mL de solução PBS até que as amostras ficassem submersas. Seguidamente o material foi transportado até as instalações do Laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Tecnologias Inovadoras (GDTI/FZEA/USP) em caixa térmica, mantida a aproximadamente 4 °C para evitar a desidratação e preservar a viabilidade do tecido.

Figura 6: Fotografias demonstrando o local e o método de coleta. Aviário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, FZEA-USP.



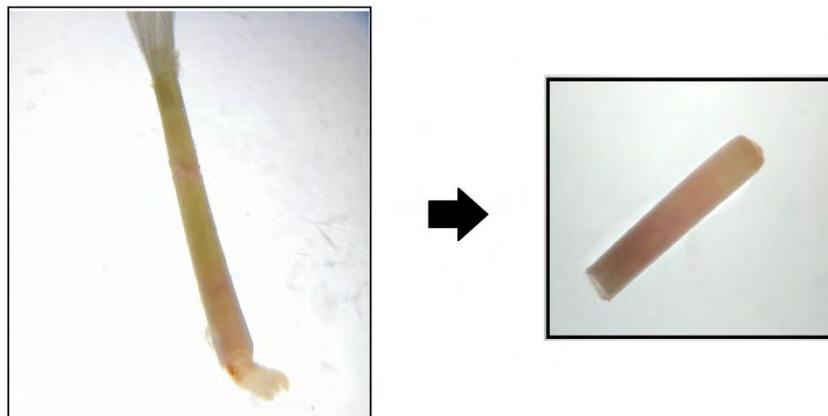
Fonte: CARDOSO, 2019. **Legenda:** **A)** Local de realização das coletas das amostras de pena **B)** Procedimento de coleta da pena através do método de arrancamento em *Gallus domesticus*.

5.4 Padronização do Isolamento e cultivo das células somáticas da espécie *Gallus domesticus*

O protocolo de cultivo foi adaptado de XI et al. (2003)), onde realizaram cultivo de células do fólculo de galinhas, com o objetivo de estabelecer as características das células tronco das penas para manipulação genética. Dentro do fluxo laminar, sob condições estéreis as 60 amostras foram lavadas 3x em meio contendo PBS, 2% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 1% de anfotericina B durante aproximadamente 2 minutos cada lavagem. Após a lavagem e com auxílio de uma lupa estereomicroscópica LABOMED modelo Luxeo 4Z, a morfologia da pena foi analisada e as estruturas foram identificadas.

As amostras das penas foram colocadas em 5 placas de Petri (100 x 20 mm) estéreis contendo PBS e as amostras dos indivíduos de mesma idade foram colocadas juntas. Seguidamente, realizou-se um corte transversal para secção da região do cálamo contendo a polpa da pena (Figura 7), com o auxílio de um bisturi e uma pinça *Drop ship* foi realizado um corte longitudinal da parede do cálamo em toda extensão e o conteúdo interno foi completamente removido.

Figura 7: Seleção da região do cálamo de *Gallus domesticus* contendo a polpa da pena.



Fonte: CARDOSO, 2019. **Legenda:** Estrutura da pena de *Gallus domesticus* antes do corte e depois do corte transversal com utilização de bisturi estéril.

Posteriormente o material biológico foi submetido ao processo de fragmentação mecânica, seguido pela digestão enzimática, colocadas em tubo tipo Falcon de 15mL na proporção 1:1 Colagenase IV 0,1% (Sigma) durante 1 hora em estufa a 38,5 °C, com umidade relativa de aproximadamente 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂, até a obtenção de suspensão celular, sendo posteriormente inativada com meio de cultura.

Após o término do intervalo, as amostras foram transferidas para tubos eppendorf para neutralização; realizada com a adição de 1 mL de meio DMEM (Gibco®). O conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm; o sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 2 mL de Meio de Eagle Modificado por Dulbecco- DMEM (Gibco®), acrescido de 10% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone, Logan, Utah, EUA) previamente preparado com 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®), 1% de gentamicina, 1% de anfotericina B e 1% de aminoácido não essencial (cat. # M-7145) (Solução 100X).

As amostras foram então transferidas para placas de 96 poços, em cada poço foi transferido 120 µL das células ressuspensas e 180 µL de meio DMEM (Gibco®) completando assim 300 µL de conteúdo por poço. A placa foi então incubada a 38,5 °C de temperatura, com umidade relativa de aproximadamente 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado em intervalos de 24 horas.

5.5 Propagação em cultivo: Repique celular.

Após 24 horas, a placa foi fotomicrografada com microscópio *FLoid™ Cell Imaging Station* para análise morfológica e a viabilidade celular foi determinada mediante a contagem de células vivas e células mortas na câmara de Neubauer.

Todo o meio foi cuidadosamente removido dos poços e amplificado. Para tal procedimento retirou-se o meio de cultivo e em seguida os poços foram lavados com PBS 2x para retirada de todo o resíduo do meio de cultivo, em seguida adicionou-se tripsina a 0,25% (Tryple Express Enzyme- Gibco™) até cobrir o fundo dos poços de cultivo, as placas permaneceram em incubação por 7 minutos em estufa a 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

Com a completa desagregação enzimática das células aderentes, adicionou-se 150 µL de meio de cultivo. Toda suspensão celular foi transferida para 2 tubos tipo Falcon de 15 mL cada e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” resultante da centrifugação foi ressuspendido em 2 mL de meio de cultura. Para contagem foi adicionado 10 µL do meio contendo as células ressuspensas na Câmara de Neubauer para obter contagem total das células. Já para a distribuição do meio contendo as células ressuspensas dividimos os poços em duas concentrações diferentes; 50.000 células sendo adicionado 5,20 µL em cada poço e 100.000 células sendo adicionado 10,43 µL em cada poço. Posteriormente em ambas concentrações adicionou-se meio até atingir 300 µL. O produto final foi transferido para uma placa de 96 poços, incubadas a 38,5 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

5.6 Avaliação da capacidade de formação de colônias

Para testar a capacidade de formação de unidade de colônia (UFC) foram plaqueadas diferentes densidades de células 5×10^4 e 10^5 em placa de 96 poços incubadas a $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . Foi efetuado a reposição do meio de cultivo e seu monitoramento a cada 3 dias em um período de 2 semanas. Em cada repique foi plaqueado o mesmo número de células do cultivo primário, ou seja, novamente nas duas densidades 5×10^4 e 10^5 células. Posteriormente foi utilizado microscopia eletrônica Nikon Eclipse 80i para localização e avaliação das colônias de células.

5.7 Contagem Celular

Para contagem das células e determinação da concentração de células ressuspendidas em meio de cultivo com o objetivo de replaqueamento, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\frac{Q_1+Q_2+Q_3+Q_4}{4} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}^* = \text{n}^\circ \text{ de células/ mL}$$

- **Fator de diluição = 1mL**

As letras “Q” são representadas pelos quatros quadrantes de contagem da Câmara de Neubauer, ou seja, é contado o quanto de células é encontrado em cada área, somando os 4 campos e tirando a média. Em seguida, multiplica-se pelo fator de correção da câmara e o valor final é multiplicado pelo fator de diluição (valor que foi diluído as células ressuspendidas para contagem). O total será representado pelo número de células em cada ml de meio ressuspendido.

5.8 Criopreservação de células somáticas do folículo da pena

A criopreservação ocorreu assim que as células atingiram 70 a 80% de confluência a partir da primeira passagem (P1), sendo realizado a contagem celular. As células foram tripsinizadas, contadas em câmara hemocitométrica (Neubauer).

Após o desprendimento devido a reação enzimática com a tripsina (Tryple Express Enzyme (Gibco™) e a centrifugação, ocorreu a formação de um *pellet* o qual foi ressuspensionado rapidamente em meio específico para congelamento a saber: 45% de DMEM (Gibco®), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®) e 45% de Soro Fetal Bovino (FBS, Hyclone, Logan, Utah, EUA).

Durante este processo, as células foram ressuspensas no meio de congelamento, transferidas em 4 criotubos (1 ml para cada tubo) contendo 4.10^5 células em cada tubo e acondicionadas em *Mister Frost* (Nalgen®) contendo álcool isopropílico para auxílio de congelamento lento, garantindo a viabilidade celular. Quando adicionadas em local a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, as caixas promovem congelamento gradual e constante das suspensões celulares (a $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Passadas 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados durante 7 dias para posterior utilização.

5.9 Procedimento de descongelamento e cultivo das células

Passados os 7 dias, as células cultivadas e criopreservadas em nitrogênio líquido iniciou-se o processo de descongelamento e viabilidade celular. Mediante a utilização de banho maria a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$, os criotubos foram retirados do nitrogênio mantendo por 30 segundos na água aquecida. Depois de descongeladas, o conteúdo foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL com meio DMEM (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Hyclone, Logan, Utah, EUA), 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®), 1% de gentamicina, 1% de anfotericina B e 1% de aminoácido não essencial (cat. # M-7145) (Solução 100X). Com uma pipeta o meio foi homogeneizado, transferido para eppendorffs e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi então desprezado e o “*pellet*” reconstituído com 180 μL de meio de cultivo.

O conteúdo foi transferido para placas de 96 poços contendo no total 300 μL em cada poço e mantidos em condições de cultivo a $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . A viabilidade celular foi determinada mediante contagem de células vivas versus células mortas na câmara de Neubauer com o corante Tripán Blue.



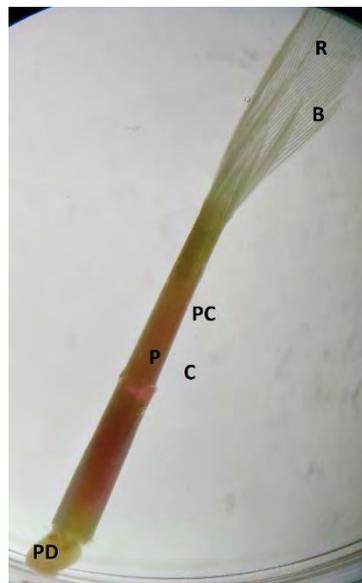
6. Resultados

6. RESULTADOS

6.1 Estudo macroscópico das estruturas da pena

O estudo macroscópico das estruturas epidérmicas altamente especializadas de *Gallus domesticus* permitiu uma análise visual da conformação morfológica (Figura 8) e do posicionamento da região da polpa da pena. Destacamos aqui uma constituição rígida e um eixo longitudinal que é composto por duas estruturas: o cálamo e a raque. O cálamo é a extremidade proximal da pena em relação a pele do animal, o qual não apresentou pigmentação e com isso observou-se suas estruturas internas. Na região que apresenta coloração vermelha, localiza-se a zona de proliferação, composta pela artéria axial e pequenos vasos e capilares sanguíneos. Essa região foi utilizada para o cultivo junto com a papila dérmica que está presente no umbigo proximal da pena, região representada na nossa amostra por um material gelatinoso na porção do cálamo. Na zona distal encontramos uma estrutura chamada raque de onde partem uma série de ramos chamadas bárbulas.

Figura 8: Fotomicrografia da estrutura da pena de *Gallus domesticus* com 12 dias de vida



Fonte: CARDOSO, 2018. **Legenda:** R) Raque, B) Barbas, PC) Parede do Cálamo, C) Cálamo, P) Polpa e PD) Papila Dérmica.

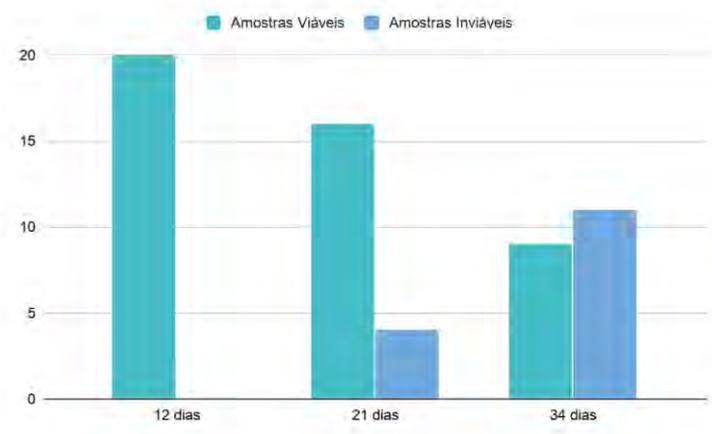
6.2 Obtenção e preparo do material coletado

Das 60 amostras de penas coletadas, 45 foram utilizadas para cultivo. As amostras restantes foram descartadas devido ao interior do cálamo não haver polpa suficiente para cultivo, ou seja, seu conteúdo interno já apresentava tecido de formação de barbas.

Todas as 45 penas continham polpa o suficiente para o cultivo, entretanto encontramos diferença quando analisamos a quantidade de amostras necessárias para obtenção do conteúdo.

Todas as amostras (n.20) de indivíduos de 12 dias continham polpa o suficiente para o cultivo, apenas 16 amostras de indivíduos com 21 dias continham polpa suficiente para cultivo e nas amostras (n.20) de aves com 34 dias apenas 9 continham polpa o suficiente (Gráfico 1).

Gráfico 1: Número de amostras viáveis de acordo com a idade dos animais.



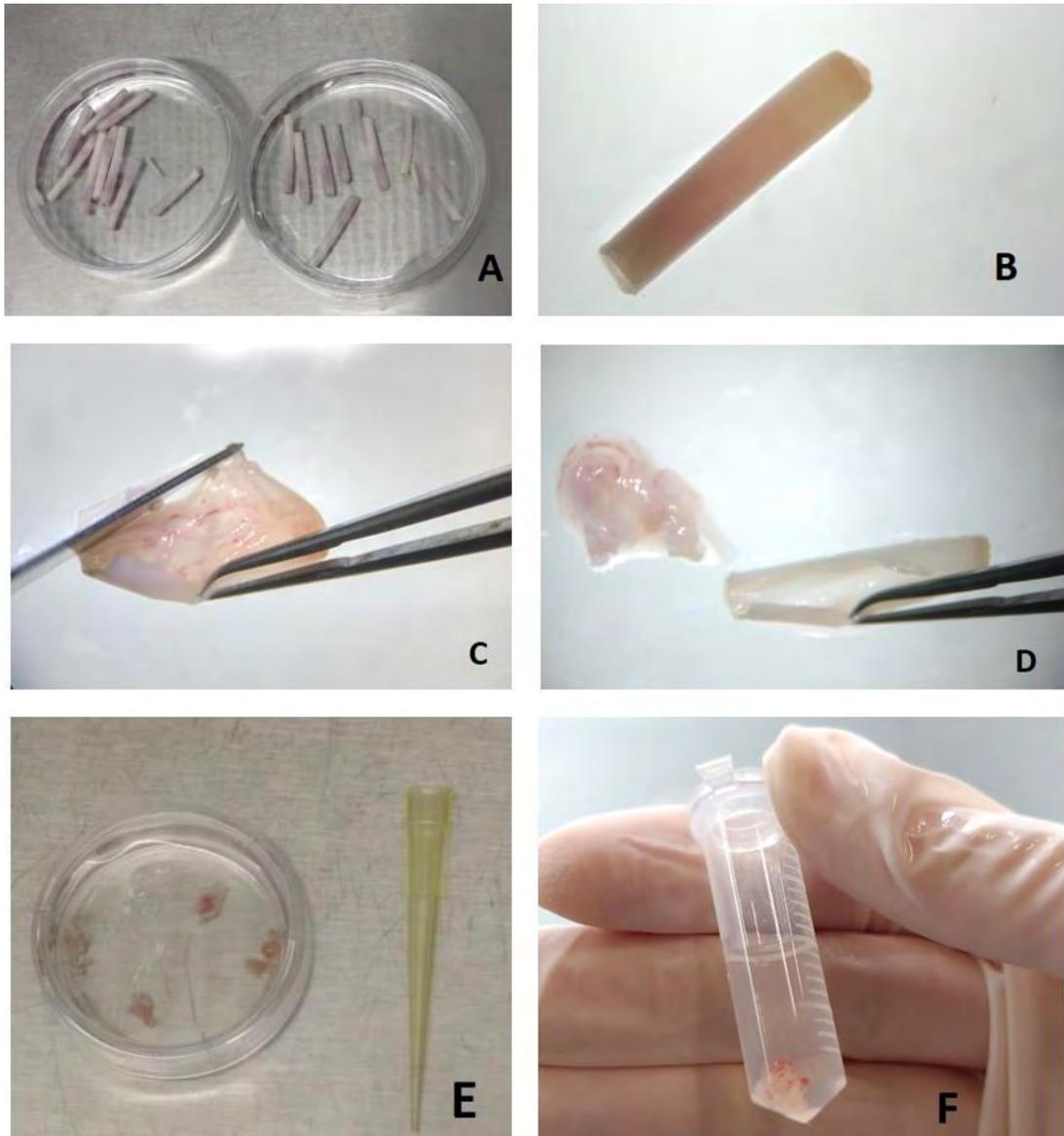
Fonte: CARDOSO, 2019. **Legenda:** A coloração verde indica o número de amostras viáveis e a coloração azul evidencia o número de amostras inviáveis em cada idade apresentada, 12 dias, 21 dias e 34 dias.

A preparação da amostra pós seleção do cálamo contendo a polpa deu origem a fragmentos de cerca de 3 a 4 cm de dimensão (Figura 9A e B). As quantidades de polpa presente no interior dos cálamos variaram, bem como a presença de vasos sanguíneos visíveis. As lavagens em meio PBS tornaram a consistência do material mais maleável e conseqüente mais fácil foi o corte longitudinal (Figura 9C). A pinça *Drop ship* forneceu uma boa segurança na hora de realizar o corte impedindo que o cálamo se movimentasse e prejudicasse o material

Ao seccionar o cálamo observou-se aderência da polpa a parede do cálamo e com cuidado realizou-se o destacamento das estruturas cabendo por separá-las por completo (Figura 9D). A polpa apresentada era um material gelatinoso com colorações distintas variando entre vermelho, rosa e incolor. As polpas sofreram fragmentação mecânica e foram fragmentadas em

dimensões menores e seguidamente sofreram a digestão enzimática. Após a neutralização, o material foi centrifugado e foram obtidos “pellets” em quantidade suficiente para retirada e suspensão do meio (Figura 9E e F).

Figura 9: Fotomicrografias das etapas da preparação do material de cultivo.



Fonte: CARDOSO, 2018. **Legenda:** **A)** Lavagem das amostras em meio PBS contendo 2% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 1% de anfotericina B, **B)** Cálamo, **C)** Secção longitudinal da parede do cálamo com auxílio de um bisturi e uma pinça Drop ship, **D)** Polpa separada da parede do cálamo, **E)** Lavagem com solução PBS e **F)** Eppendorf contendo a polpa e Meio de Eagle Modificado por Dulbecco- DMEM (Gibco®) para neutralização pós digestão enzimática.

6.3 Cultivo Celular

Após o cultivo celular, em 24 horas, as placas foram visualizadas e fotomicrografadas evidenciando a proliferação de células aderidas ao fundo da placa. Para melhor entendimento dos resultados de cultivo celular optamos por dividirmos nossos resultados de acordo com o tempo necessário para atingirem de 70% a 80% de confluência e a partir disso foram criados III grupos. Assim obtivemos: Grupo I representado por 13 poços com confluência acima de 80% em 24 horas, grupo II representado pelos 7 poços que atingiram confluência de 70% a 80% passados 48/72 horas e grupo III poços que não atingiram confluência e portanto não sofreram passagem.

Grupo I

O grupo I apresentou o maior número de células por poço de cultivo, após 24 horas de cultivo, houve preenchimento acima de 80% de toda área a ser cultivada (Figura 10A). Grandes quantidades de células não aderentes ao fundo da placa se fizeram presentes, além de aglomerados celulares e células com formato semelhante as fibras das bárbulas. Essas células foram excluídas conforme a mudança do meio de cultivo. Ao fundo da placa células com morfologia fibroblastóide estiveram presentes por toda extensão do cultivo.

As células sofreram tripsinização e contagem celular. Um montante de 9.580.000 células contando as células aderidas e outros fenótipos flutuantes foram obtidas em passagem “P0”. Esse grupo foi então subdividido em 2 concentrações diferentes de cultivo para avaliação da melhor quantidade de células em cultivo por poço. Para a distribuição das células em meio de poço de 50.000 células foi adicionado 5,20 μL e no poço de 100.000 células foi adicionado 10,43 μL . Ambas foram completadas com meio de cultivo até atingir 300 μL por poço.

Os dois subgrupos formados sofreram no total 3 passagens (P3) e essas passagens foram avaliadas pela visualização dos cultivos e da morfologia das células presentes. A fase inicial foi marcada por uma alta taxa de proliferação, com pouca diferença na quantidade de células visíveis, mas grande diferença morfológica das células; células em formato elíptico com núcleo também em formato elíptico compatível com eritrócitos, células com formato oval e um núcleo redondo compatível com trombócitos, células com formato semelhante a fibras da bárbula e aglomerados celulares no poço de cultivo de 10^5 em relação ao poço de 5×10^4 célula. O subgrupo de 10^5 células apresentou uma grande concentração de eritrócitos por toda a extensão

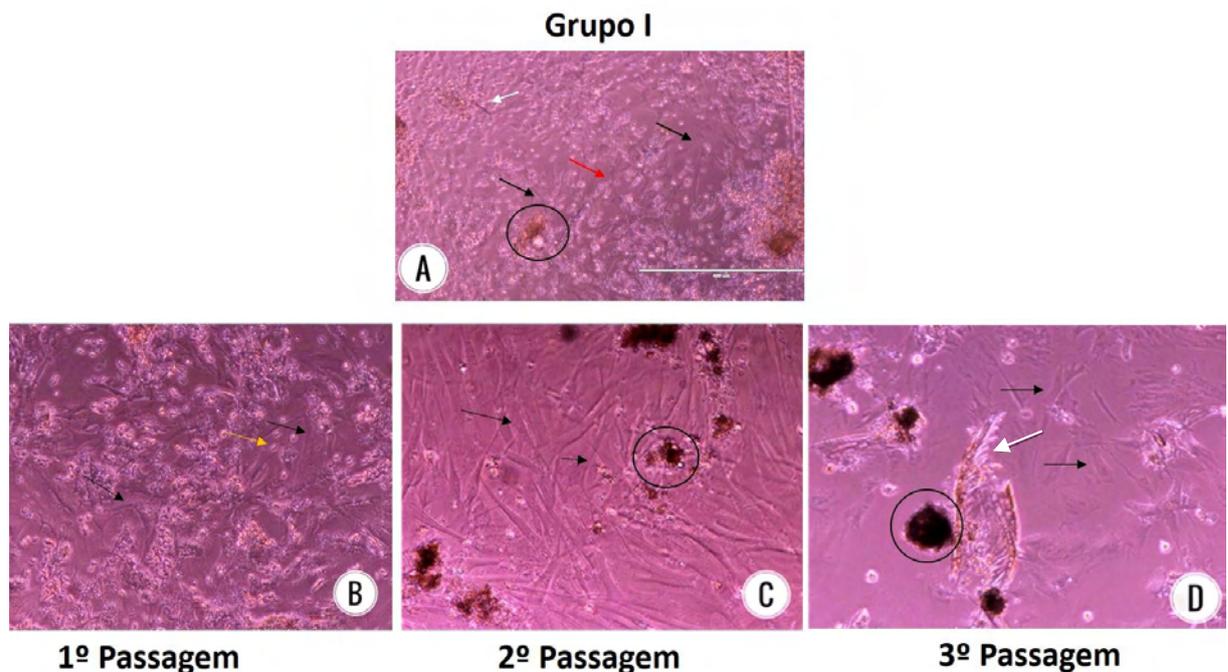
da placa. Em cada repique foi plaqueado o mesmo número de células do cultivo primário ou seja 10^5 células e 5×10^4 células respectivamente.

As células cultivadas em “P1” em ambas concentrações de cultivo, apresentaram grande quantidade de células satélites, principalmente com formato arredondado e elíptico. Havia presença de aglomerados celulares e elevada quantidade de células com formato fibroblastóide aderidas ao fundo da placa (Figura 10B).

No cultivo representado por 10^5 células havia presença de grande quantidade de eritrócitos por todo campo de cultivo. Os poços das células em “P2” apresentavam menor quantidade de células flutuantes, porém maior quantidade de aglomerados celulares. As células com formato fibroblastóide obtiveram então destaque semelhantes nos dois subgrupos de cultivo (Figura 10C).

Foi registrado um decréscimo significativo de células presentes no cultivo de terceira passagem “P3”. Em ambos subgrupos se notam presentes células aderidas mas em menor quantidade que as passagens anteriores, maior formação de colônias celulares, possivelmente formada por queratinócitos e células com morfologia característica de morte celular (Figura 10D).

Figura 10: Fotomicrografias das células do Grupo I (subgrupo 5×10^4) em diferentes passagens.



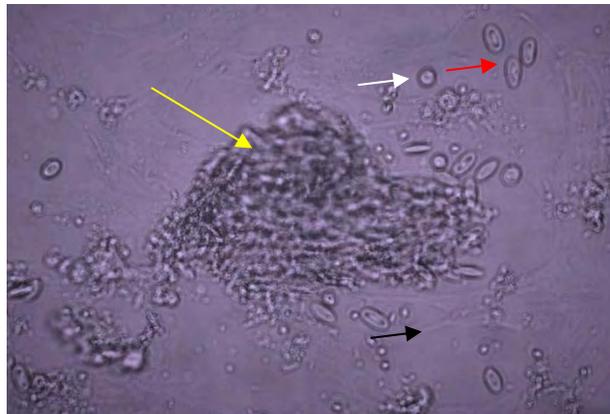
Fonte: CARDOSO, 2018. **Legenda:** **A** Visão geral do campo de células em “P0”. Observamos a presença de diversos tipos de células não aderidas ao fundo da placa, em formato elíptico (seta vermelha), aparência de fibras de células da bárbara (seta branca), além da presença de aglomerados celulares (círculo), é possível visualizar também células aderentes ao fundo da placa com morfologia similar a fibroblastos (seta preta). Em **B** observamos grande quantidade de células flutuantes, como por exemplo eritrócitos (seta amarela) e também

grande quantidade de células com morfologia similar a fibroblastos ao fundo da placa (seta preta), em **C** observamos uma diminuição da quantidade de células flutuantes e um aumento na quantidade de aglomerados celulares (círculo) e células com formato de fibroblasto (seta preta) e em **D** é possível notar perda da confluência, aglomerados celulares (círculo), estruturas barbulares estão presentes (seta branca) bem como células aderidas ao fundo da placa (seta preta). Aumento de 10x. Barra = 400 μm

Grupo II

Este grupo apresentou confluência de 80% passadas 48/72 horas e apresentaram diferentes tipos celulares. Observou-se algumas células em formato e núcleo na posição central, característico de eritrócitos aviários, algumas apresentaram formato redondo compatíveis com reticulócitos, aglomerados celulares de grandes dimensões compatíveis com células epiteliais, assim como células aderidas ao fundo compatíveis com formato fibroblastóide (Figura 11). Após a confluência de 80% o Grupo II sofreu passagem celular e foi posteriormente selecionado para o processo de criopreservação.

Figura 11: Fotomicrografias da placa de cultivo celular do Grupo II após 72 horas de cultivo.

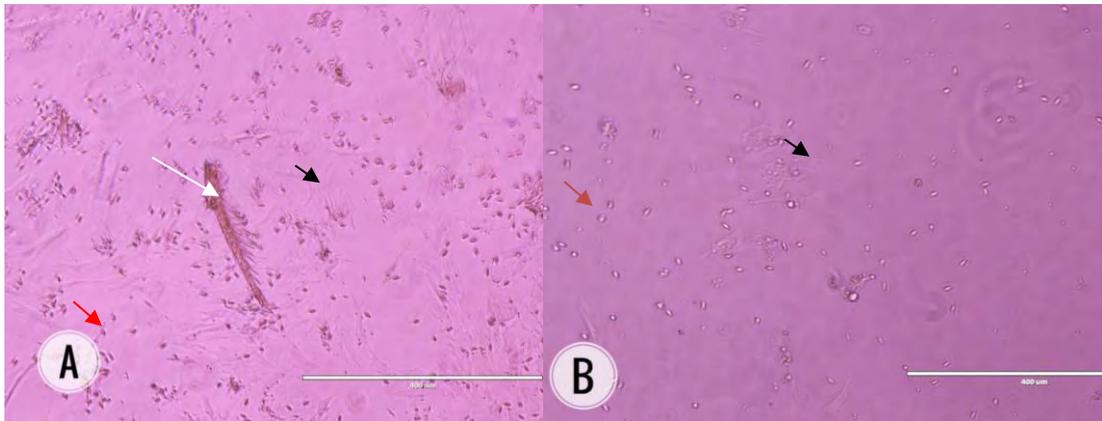


Fonte: CARDOSO, 2018. **Legenda:** Seta vermelha: Células com formato e núcleo elíptico central, seta branca células em formato arredondado característico de trombócitos, seta amarela indicando aglomerado celular e seta preta célula com morfologia de células fibroblastóides.

Grupo III

Passadas 24 horas de cultivo, os poços apresentaram pouca diversidade de tipos celulares e aglomerados celulares. Havia presença de células aderidas ao fundo da placa porém com baixa confluência (Figura 12A). Passados 5 dias após o cultivo o número de células com formato fibroblastóide diminuiu consideravelmente e os cultivos do grupo III foram então descartados do estudo (Figura 12B).

Figura 12: Fotomicrografias da placa de cultivo celular do Grupo III.



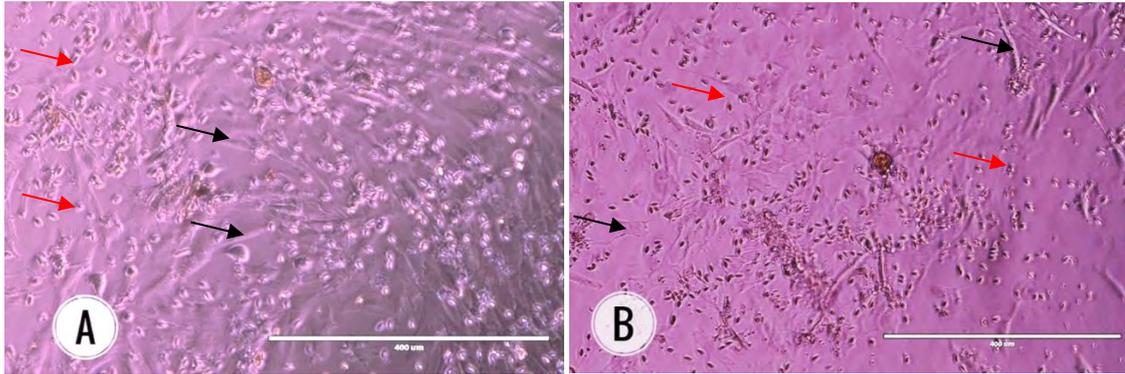
Fonte: CARDOSO, 2018. **Legenda:** **A)** Após 24 horas de cultivo com poucas quantidades de células aderidas ao fundo da placa (seta preta), presença de eritrócitos (seta vermelha) e fibras da bábula (seta branca) e **B)** 5 dias após cultivo grande diminuição de células aderidas (seta preta) e apresentação de células sugestivas de morte celular (seta vermelha).

6.4 Criopreservação

Para avaliar a viabilidade celular utilizamos o Grupo II em 1º passagem “P1”. Nesse processo observamos a reação das células submetidas a criopreservação. Este consiste em testar as células por meio de dois tipos de lesão: a desidratação e o dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior.

Diante disso, quatro criotubos contendo células cultivadas foram submetidas à criopreservação. Todos os criotubos apresentaram células viáveis no descongelamento, embora o número de células vivas tenha diminuído visualmente. Após o descongelamento as células apresentaram as mesmas características morfológicas que consistem em eritrócitos, que são células com formato elíptico e núcleo central e células com formato fibroblastóide (Figura 13B).

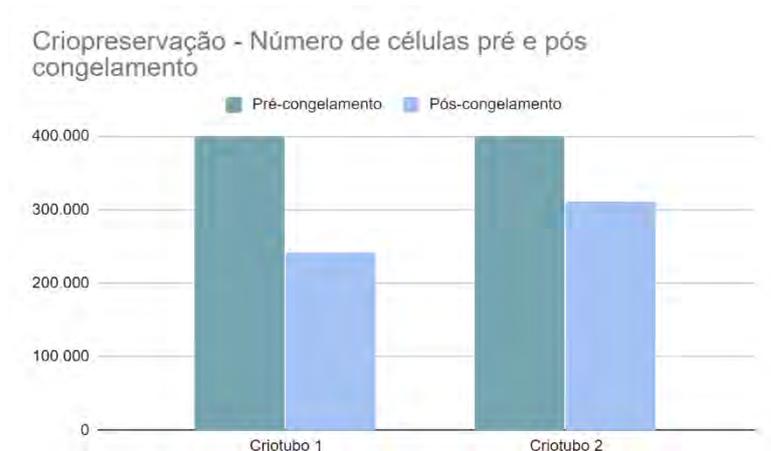
Figura 13: Fotomicrografias comparativas das placa de cultivo celular do Grupo II pré e pós congelamento.



Fonte: CARDOSO, 2018. **Legenda:** Em **A** células cultivadas em “P1” antes do congelamento. **B** células 24 horas pós descongelamento, ambas pertencentes ao criotubo II. Notar em **A** presença de grande quantidade de células com formato fibroblastóide (seta preta) e células com formato elíptico (seta vermelha). Notar em **B** a presença de células aderidas porém com uma diminuição da quantidade (seta preta), bem como as células de formato elíptico (seta vermelha).

Todos os tubos foram criopreservados contendo 400.000 células em cada frasco. Foram descongelados somente 2 criotubos e feita a contagem das células com a membrana intacta através da utilização do corante Tripan blue. O resultado pós descongelamento foi: Criotubo 1: 60% (242.500) células sobreviveram, e criotubo 2: 77,6% (310.500) das células sobreviveram (Gráfico 2). A viabilidade média entre os dois criotubos foi então de 68,8%, o que nos mostra que aproximadamente 70% das células resistiram ao processo de desidratação e danos mecânicos.

Gráfico 2: Número de células pré e pós congelamento durante o processo de criopreservação.



Fonte: CARDOSO, 2020. **Legenda:** Os valores do gráfico representam a quantidade de células antes do congelamento (barra verde) e depois do congelamento (barra azul) respectivamente no criotubo 1 e criotubo2.



7. Discussão

7. DISCUSSÃO

Marsden and May (1984) mediante seus estudos descobriram que as penas da asa (rêmiges), cauda (retrizes) e penas de contorno apresentavam regiões com presença de tecido em suas penas. Em nos nossos achados encontramos a presença de tecido em praticamente todas as penas coletadas das rêmiges, porém em quantidades distintas dependendo da idade que a ave apresentava, o que vai ao acordo com Yu et al. (2004), o qual destacou que em penas maduras, a polpa eventualmente degenera e suas células entram em apoptose para permitir que as barbas da pena se abram e com Marsden e Maio (1984), os quais relataram que na maioria dos casos, penas desenvolvidas reabsorvem a polpa, tornando o cálamo uma estrutura tubular oca. Tais informações justificam a maior quantidade de material viável obtido em aves com 12 dias em relação as de 21 e 34 dias.

A análise dos resultados a partir da observação macroscópica das estruturas da pena iniciou-se pela identificação do eixo que percorre toda a extensão da pena e divide o cálamo e a raque apresentando semelhanças como descrito por Pass, 1995. Ainda foi possível identificar a região interna do cálamo contendo a polpa por meio da coloração avermelhada obtida, que posteriormente foi selecionada junto com a papila dérmica para o cultivo celular. Tais achados também são descritos por Pass, 1995 que mostrou nas penas em desenvolvimento a presença de um núcleo central ou polpa que consiste em tecido conjuntivo vascular.

A respeito dos achados do cultivo celular, obtivemos sucesso no método de coleta e isolamento. Separamos nossos resultados em grupo I, grupo II e grupo III. No grupo I, o cultivo e propagação das células do folículo das penas ocorreu até a terceira passagem celular. No cultivo primário obtivemos confluência nas primeiras 24 horas demonstrando a alta capacidade de proliferação deste tipo de células. Estes resultados vão ao encontro com os descritos por Xi et al., (2003) onde após 2 horas de cultivo as células provenientes do folículo das penas em cultivo primário, se apresentaram semelhantes a fibroblastos aderidos ao fundo da placa, assim como encontrado nos nossos estudos.

Durante o cultivo celular conforme ocorreram as passagens, as células satélites representadas pelos eritrócitos, trombócitos, células das bárbulas, aglomerados celulares e outras não aderidas foram diminuindo de quantidade devido a troca do meio de cultivo. Mostramos que mesmo havendo uma diminuição na quantidade celular todos os diferentes tipos de células, incluído as células aderidas conseguiram sobreviver e se proliferarem durante 3 passagens.

Kjelland e Kraemer, 2012 encontraram as mesmas morfologias de células descritas no nosso estudo, bem como obtiveram confluência acima de 70 e 80% até a terceira passagem, uma vez que as células em “P3”, diminuíram em quantidade e perderam morfologia, entrando em apoptose celular. Entretanto Xi et al., (2003) conseguiram obter células viáveis e com alta confluência após terceira passagem e ainda realizaram diferenciação celular em adipócitos, neurócitos e queratinócitos.

Os resultados do grupo II mostraram confluência de 80% do cultivo primário passados 48/72 horas, então seleccionamos esse grupo para criopreservação das células em “P1”, obtendo resultados superiores ao descrito por Kjelland e Kraemer, 2012 que criopreservou dois criotubos em seu estudo de cultivo de células do folículo das penas e obteve células com formato fibroblastóide nos 2 tubos, resultando em 10% de viabilidade pós descongelamento, devido a cerca de 90% das células congeladas não sobreviveram a criopreservação. Em nosso estudo obtivemos a viabilidade média entre os 2 criotubos de 68,8%, devido a uma quantidade de células não ter sobrevivido em ambos, mas mantivemos as características morfológicas encontradas no pré congelamento, ou seja, todos os criotubos cultivados apresentaram células com formato de fibroblasto aderido ao fundo da placa no pós congelamento, porém tivemos uma taxa de sobrevivência bem mais elevada, de 60% no criotubo I e 77,6% no criotubo II.

No grupo III, nossas amostras cultivadas não conseguiram atingir confluência necessária para permanecer em cultivo e serem replicadas, assim como o descrito por Léon-Quintino et al., (2011) que reportou em seus estudos de obtenção de materiais biológicos de animais selvagens ameaçados de extinção que a quantidade de tecido obtido pode não ser suficiente para o cultivo e propõe como solução a partir da utilização de meios de cultura suplementados com fatores de crescimento como por exemplo *Fibroblast Growth basic* (bFgF/ β FGF), conferindo ao cultivo uma elevada capacidade de crescimento. XU et al., (2011) estudaram as características das células do folículo da pena e seu potencial de regeneração e durante seu cultivo utilizaram os fatores de crescimento descrito acima, diferentemente do realizado em nossa pesquisa uma vez que nosso grupo III permaneceu durante 5 dias em cultivo, apenas com troca de meio e não apresentou confluência suficiente para sofrer passagem.

Cultivar as penas e saber de que células são formadas e como se comportam são de grande interesse, porque sua grande capacidade regenerativa pode produzir diferentes morfologias a partir de células precursoras comuns. Na última década, muito se aprendeu sobre as células-tronco capilares (MORRIS et al., 2004, TUMBAR et al., 2004). Em comparação, pouco se sabe sobre as células-tronco das penas.

Comprovamos aqui que o cultivo de células do folículo das penas é um método viável e que promove células capazes de se multiplicar e serem criopreservadas. Mais pesquisas podem tentar aplicar essa técnica a outras espécies aviárias bem como abordarem a criopreservação e viabilidade pós-descongelamento desses tipos celulares.



8. Conclusão

8. CONCLUSÃO

A partir das metodologias empregadas neste projeto, pode-se comprovar o isolamento e manutenção de células somáticas presentes no folículo das penas, onde a diversidade dos resultados obtidos esteve relacionada com os diferentes grupos formados, sendo que o grupo I manteve mais tempo em cultivo quando comparado com os grupos II e III, apresentando assim proliferação celular e presença de diferentes tipos de células. Foi possível obter uma linhagem de células com formato fibroblastóide importantes para elaboração de um banco de recursos genéticos. E foi possível testar a viabilidade de criopresevação gerando células vivas no pré e pós congelamento, ainda que com menor porcentagem, mas preservando suas morfologias.

Com isso nossos achados mais significativos comprovam o isolamento de células somáticas a partir do folículo das penas de aves, sugerindo que esta é uma fonte de grande valia, viável e eficaz para a obtenção de material biológico para elaboração de um banco.

Bancos de germoplasma são apenas um elo dentro de uma complexa cadeia que envolve a conservação das espécies, assim propomos um método pouco invasivo como alternativa para manter as espécies aviárias preservadas e estimulamos que mais estudos sejam realizados, criando-se um banco de recursos biológicos de espécies aviárias a fim de manter as diversas espécies preservadas.

9. REFERÊNCIAS

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 223-243, 2007.

ANDRÉN, H. Effects of Habitat Fragmentation on Birds and Mammals in Landscapes with Different Proportions of Suitable Habitat: A Review. **Oikos** v. 71, p. 355, 1994. doi:10.2307/3545823.

BLANCO J. M et al. Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. **Theriogenology** v. 71, p. 200–213, 2009.

BLANPAIN, C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. **Cell.**; v. 128, p. 445–458, 2007.

CALLAGHAN, C.T.; MAJOR, R. E.; WILSHIRE, J. H.; MARTIN, J. M.; KINGSFORD, R.T.; CORNWELL, W. K. Generalists are the most urban-tolerant of birds: a phylogenetically controlled analysis of ecological and life history traits using a novel continuous measure of bird responses to urbanization. **Oikos** p. 1–14, 2019. doi:10.1111/oik.06158.

CARRETE, M.; TELLA, J. L.; BLANCO, G.; BERTELLOTT, M. Effects of habitat degradation on the abundance, richness and diversity of raptors across Neotropical biomes. **Biol. Conserv.** v. 142, p. 2002–2011, 2009. doi:10.1016/j.biocon.

CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). **Lista das aves do Brasil**. 11ª Edição, 2014. Available at: <http://www.cbro.org.br>.

CHANG, C. H.; JIANG, T. X.; LIN, C. M.; BURRUS, L.W.; CHUONG, C. M.; WIDELITZ, R. Distinct members regulate the hierarchical morphogenesis of skin regions (spinal tract) and individual feathers. **Mech Dev.** v. 121, p. 157–171, 2004.

CHUONG, C. M.; CHODANKAR, R.; WIDELITZ, R. B.; JIANG, T. X. Evo-devo of feathers and scales: building complex epithelial appendages. *Curr. Opin. Genet. Dev.* v. 10, p. 449-56, 2001.

CHUONG, C. M.; EDELMAN, G. M. Expression of cell-adhesion molecules in embryonic induction. II. Morphogenesis of adult feathers. *J. Cell. Biol.* 101: 1027- 43, 1985.

CHUONG C. M.; W. U. P.; ZHANG, F. C.; XU, X.; Yu, M.; WIDELITZ, R. B. Adaptation to the sky: defining the feather with integument fossils from mesozoic China and experimental evidence from molecular laboratories. *J Exp Zool B Mol dev Evol* **298** (1): p. 42-56, 2003. <https://doi.org/10.1002/jez.b.25>.

CLAUDINOT, S.; NICOLAS, M.; OSHIMA, H.; ROCHAT, A.; BARRANDON, Y. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* p. 82, 2005.

CLAVEL, J.; JULLIARD, R.; DEVICTOR, V. Worldwide decline of specialist species: Toward a global functional homogenization? *Front. Ecol. Environ.* v. 9, p. 222–228, 2011. doi:10.1890/080216.

COLLES, A.; LIOW, L.H.; PRINZING, A. Are specialists at risk under environmental change? Neocological, paleoecological and phylogenetic approaches. *Ecol. Lett.* v.12, p.849–863, 2009. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01336.x.

COMIZZOLI, P.; HOLT, W. V. Recent Advances and Prospects in Germplasm Preservation of rare and Endangered Species. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, p. 331-345, 2014.

CROSIER, A. E.; PUKAZHENTHI, B.; HENGHALI, J. N.; HOWARD, J. G.; DICKMAN, A. J.; MARKER, L.; WILDT, D. E. Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival. *Cryobiology* v. 52, p. 169–181, 2006.

DEL HOJO, J.; COLLAR, N. J.; CHRISTIE, D. A.; ELLIOT, A., FISHPOOL, L. D. C. **HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World**. v. 1 Non-passerines. Barcelona: Lynx Edicions, 2014.

DEVICTOR, V.; JULLIARD, R.; JIGUET, F. Distribution of specialist and generalist species along spatial gradients of habitat disturbance and fragmentation. **Oikos** v. 117, p. 507–514, 2008. doi:10.1111/j.0030-1299.2008.16215.x.

DONALD, P. F.; PISANO, G.; RAYMENT, M. D.; PAIN, D. J. The Common Agricultural Policy, EU enlargement and the conservation of Europe's farmland birds. **Agric. Ecosyst. Environ.** v. 89, p. 167–182, 2002. doi:10.1016/S0167-8809(01)00244-4.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique**; 3rd edition; WILEY-LISS Pub. New York, 1994.

GAÑÁN, N.; SESTELO, A.; GARDE, J.; MARTINEZ, F.; VARGAS, A.; SANCHEZ, I.; PÉREZ, M. J.; LÓPEZ, J. V.; PALOMARES, F.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E. R. Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Reproduction** v. 139 p. 275–285, 2010.

GUBILI, C.; MARIANI, S.; WECKWORTH, B. V.; GALPERN, P.; MCDEVIT, A. D.; HEBBLEWHITE, M.; MUSIANI, M. Environmental and anthropogenic drivers of connectivity patterns: A basis for prioritizing conservation efforts for threatened populations. **Evolutionary Applications**, v. 10, p. 199–211, 2007.

HAMUDUDU, B. H.; NGOMA, H. Impacts of climate change on water resources availability in Zambia: implications for irrigation development. **Environ. Dev. Sustain.** p. 1–22, 2019. doi:10.1007/s10668-019-00320-9.

HARNAL, V. K.; WILDT, D. E.; BIRD, D. M.; MONFORT, S. L.; BALLOU, J. D. Computer simulations to determine the efficacy of different genome resource banking strategies for maintaining genetic diversity. **Cryobiology** v. 44, p. 122–131, 2002.

HARVEY, M. G.; BONTER, D. N.; STENZLER, L. M.; LOVETTE, I. J. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. **J. Field Ornithol.**, v. 77, p. 136-140, 2006.

HIEMSTRA, S. J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, p. 25-35, 2005.

HOLT, W. V.; COMIZZOLI, P. Conclusions: Environmental Change, WildLife conservation and reproduction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 503-514, 2014.

IUCN. **IUCN red list of threatened species**. Species Survival Commission, Gland, Suíça e Cambridge, Reino Unido, 2004.

ICMBIO. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III – Aves**, Brasília, 2018.

JIANG, T. X.; JUNG, H. S.; WIDELITZ, R. B.; CHUONG, C. M. Self-organization of periodic patterns by dissociated feather mesenchymal cells and the regulation of size, number and spacing of primordia. **Development** v.126, p. 4997–5009, 1999.

JIANG, T. X.; WIDELITZ, R. B.; SHEN, W. M.; WILL, P.; WU, D. Y.; LIN, C. M.; JUNG, H. S.; CHUONG, C. M. Integument pattern formation involves genetic and epigenetic controls: feather arrays simulated by digital hormone models. **Int J Dev Biol**. v. 48, p. 117–35, 2004.

KJELLAND, M. E.; KRAEMER, D. Feathers and post-hatch eggshells: sources of fibroblast cells for conserving genetic diversity. **Avian Biology Research**, v. 5(3), p. 123-130, 2012.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERN, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, p. 227–233, 2014.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, HENANDE, Z.; MORENO, J. M.; VARGAS, A.; MARTINEZ, F.; SORIA, B. Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation the Iberian lynx bank as a model for other endangered species. **Anim Reprod Sci** v. 112 p. 347–361, 2009.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M. A.; SÁNCHEZ, Á.; MARTÍN, F.; SORIA, B. Cryobanking the genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. **Cryobiology**. v. 62, p. 145–151, 2011.

LIU, J.; CHENG, K.M.; PURDY, P. H.; SILVERSIDE, F. G. A simple vitrification method for cryobanking avian testicular tissue. *Poult. Sci.*, v. 91, p. 3209-3213, 2012.

LIU, Y.; Lyle, S.; Yang, Z.; COTSARELIS, G. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. **J Invest Dermatol**. v. 121, p. 963-8, 2003.

LOSKUTOFF, N. M. Biology, Technology and Strategy of Genetic Resource Banking in Conservation Programs for Wildlife. **Gametes: Development and Function**. p. 275-286, 1998.

LUCAS, A. M.; STETTENHEIM, P. R. Avian anatomy—integument. Washington, DC: **US Department of Agriculture Handbook**, 1972.

MAINI, P. K.; BAKER, R. E.; CHUONG, C. M. Developmental biology. The Turing model comes of molecular age. **Science** v. 314, p. 1397–98, 2006.

MARSDEN, J. E.; MAY, B. Feather pulp: a non-destructive sampling technique for electrophoretic studies of birds. **The Auk**, v. 101, p. 173-175, 1984.

MARTINEZ, P. F., et al. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, [S.l.], v. 64, p. 958- 974, 2005.

MATTOS, L. M. Recuperação e criopreservação de germoplasma de mamíferos silvestres mortos no bioma Cerrado do Distrito Federal: uma estratégia para conservação animal ex situ. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) Universidade de Brasília**, Brasília, 2016.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Rev Bras Reprod Anim**. Belo Horizonte, v. 31, n. 4, p. 433-442, 2007.

MCGILL, B. J.; DORNELAS, M.; GOTELLI, N. J.; MAGURRAN, A. E. Fifteen forms of biodiversity trend in the anthropocene. **Trends Ecol. Evol.** 30, p. 104–113, 2015. doi:10.1016/j.tree.2014.11.006.

MCKINNEY, M. L.; LOCKWOOD, J. L. Biotic homogenization: a few winners replacing many losers in the next mass extinction. **Trends Ecol. Evol.** v. 14, p. 450–453, 1999.

MINGKE, Y.; ZHICAO, Y.; PING, W.; DA-YU, JULIE-ANN, MAYER.; MARCUS M.; RANDALL, B.; WIDELITZ, TING-XIN, J.; CHENG, M. The developmental biology of feather follicles. **Int J Dev Biol.** v. 48 p. 181–191, 2004. doi:10.1387/ijdb.031776my.

MMA- Ministério do Meio Ambiente. **Lista Nacional da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Instrução Normativa nº 3, de 27 de Maio de 2003. Diário Oficial da União. Brasília: MMA, p. 88-97, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/por/sbf/fauna/index.cfm>, 2019.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE: **Política Nacional da Biodiversidade**. Brasília, 2017.

MOGOLLÓN, W. E. M.; MELLO, M. R. B.; BURLA, D. A. J. Cloning bovine embryos from somatic cells. **Orinoquia**, v. 18, p. 95–104, 2014.

MORRIS, R. J. et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. **Nature Biotechnol.** v. 22, p. 411-417, 2004.

MORRISON, S. J.; SPRADLING, A. C. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. **Cell**, v. 132(4), p. 598–611, 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.01.038.

OSTER, G. F.; MURRAY, J. D.; HARRIS, A. K. Mechanical aspects of mesenchymal morphogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* v. 78, p. 83–125, 1983.

PASS, D. A. Normal anatomy of the avian skin and feathers. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 4(4), p. 152–160, 1995. doi:10.1016/s1055-937x(05)80013-1.

PRIETO, M. T et al. “Sperm cryopreservation in wild animals.” *European Journal of Wildlife Research* v. 60, p. 851–864, 2014.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação. Planta*. Londrina. p. 327, 2001.

PRUM, R. O. Development and evolutionary origin of feathers. *J. Exp. Zool.* v. 285 p. 291–306, 1999.

PRUM, R. O.; BRUSH, A. H. The evolutionary origin and diversification of feathers. *Quarterly Review of Biology* p. 77, 2004.

PRUM, R.; BRUSH, A. Which came first, the feather or the bird? *Scientific american*. Special edition. p. 72–82, 2004.

PRUM, R. O.; WILLIAMSON, S. Theory of the growth and evolution of feather shape. *Journal of Experimental Zoology*, v. 291(1), p. 30–57, 2001. doi:10.1002/jez.4.

SANDERSON, F. J.; KUCHARZ, M.; JOBDA, M.; DONALD, P. F. Impacts of agricultural intensification and abandonment on farmland birds in Poland following EU accession. *Agric. Ecosyst. Environ.* v. 168, p. 16–24, 2013. doi:10.1016/j.agee.2013.01.015.

REINO, L.; BEJA, P.; ARAÚJO, M.B.; DRAY, S.; SEGURADO, P. Does local habitat fragmentation affect large-scale distributions? The case of a specialist grassland bird. *Divers. Distrib.* v. 19, p. 423–432, 2013. doi:10.1111/ddi.12019.

REMSEN, J. V. Jr.; ARETA J. I.; CADENA, C. D.; JARAMILLO, A.; NORES, M.; PACHECO, J. F.; PÉREZ-EMÁN, J.; ROBBINS, M. B.; STILES, F. G.; STOTZ, D. F. & ZIMMER K. J. A classification of the bird species of South America. **American Ornithologists' Union**. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>, 2015.

RICHMOND, C. E.; BREOTBURG, D. L.; ROSE, K. A.. The role of environmental generalist species in ecosystem function. **Ecol. Modell.** v. 188, p. 279–295, 2005. doi:10.1016/j.ecolmodel.2005.03.002.

ROGER, H. S.; LOREN, W. K. Avian skin development and the evolutionary origin of feathers. **J Exp Zool.** v. 298B: p. 57–72, 2003.

RYDER, O. A. Cloning advances and challenges for conservation. **Trends in biotechnology**, [S.l.], v. 20, n. 6, p.231-232, 2002.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [S.l.], v. 12, ed. especial, p. 70-84, 2000.

SASAKI, M.; IKEUCHI, T.; MAKINO, S. A feather pulp culture for avian chromosomes, with notes on the chromosomes of the peafowl and the ostrich. – **Experimentia**, v. 24, p. 1923–1929, 1968.

SELVARAJ, V.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat. Methods*, v. 8, p. 805-807, 2011.

SENGEL P. The determinism of the differentiation of the skin and the cutaneous appendages of the chick embryo. **In The Epidermis**, ed. W Montagna, WC Lobitz, p. 15–33, 1964.

STETTENHEIM, P. R. The Integumentary Morphology of Modern Birds—An Overview. **American Zoologist**, v. 40(4), p. 461–477, 2000. doi:10.1093/icb/40.4.461.

TABERLET, P.; BOUVET, J. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. **The Auk**, v. 108, p. 959-960, 1991.

TRATALOS, J.; FULLER, R. A.; EVANS, K. L.; DAVIES, R. G.; NEWSON, S. E.; GREENWOOD, J. J. D.; GASTON, K. J. Bird densities are associated with household densities. *Glob. Chang. Biol.* v. 13, p. 1685–1695, 2007. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01390.x.

TROUNSON, A. et al. Manipulation of development: opportunities for animal breeding. **Gametes: development and function**, [S.l.], p. 485-498, 1998.

TUMBAR, T. et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. **Science** v. 303, p. 359-363 2004.

TURING AM. The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 237, p. 37–72, 1952.

VICKERY, J.; BRADBURY, R. B.; HENDERSON, I.G.; EATON, M. A.; GRICE, P. V. The role of agri environment schemes and farm management practices in reversing the decline of farmland birds in England. **Biol. Conserv.** v. 119, p. 19–39, 2004. doi:10.1016/j.biocon.2003.06.004.

WILDT, D. E. Genome resource banking: Impact on biotic conservation and society. In: Karow A, Critser J, eds. *Reproductive Tissue Banking*. New York: **Academic Press**, p. 399-439, 1997.

WILDT, D. E.; SEAL, U. S.; RAIL, W. F. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. In: Cloud JG, Thorgaard GH, eds. *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*. New York: **Plenum**, p. 159-173, 1993.

WILDT, D. E.; RAIL, W. F.; CRITSER, J. K.; MONFORT, S. L.; Seal, U. S. Genome resource banks: "Living collections" for biodiversity conservation. **BioScience** v. 47, p. 689-698, 1997.

WILSON, E. O. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: **Nova Fronteira**, p. 657, 1997.

XI, Y.; NADA, Y.; SOH, T.; FUJIHARA, N.; HATTORI, M. Establishment of feather follicle stem cells as potential vehicles for delivering exogenous genes in birds. **J. Reprod. Devel.** v. 49, p. 213-219, 2003.

XU, Y. L.; SUN, G. J.; WU, F. B.; XI, M. Y. Investigation of characteristics of feather stem cells and their regeneration potential. **J. Stem Cells Regen. Med.** 7(2):69-74, 2011.

YUE, Z.; JIANG, T. X.; WIDELITZ, R. B.; CHUONG, C. M. Mapping stem cell activities in the feather follicle. **Nature.**, v. 438 p. 1026-1029, 2005.

YU, M., WU, P.; WIDELITZ, R. B.; CHUONG, C. M. The morphogenesis of feathers. **Nature** v. 420: p. 308-12, 2002.

YU, M.; YUE, Z.; WU, P.; WU, D. Y.; MAYER, J. A.; MEDINA, M.; WIDELITZ, R. B.; JIANG, T. X.; CHUONG, C. M. The biology of feather follicles. **Int J Dev Biol**, v. 48 p. 181-191, 2004.

YUE, Z.; JIANG, T. X.; WIDELITZ, R. B.; CHUONG, C. M. Mapping stem cell activities in the feather follicle. **Nature** v. 438(7070): p. 1026–1029, 2005. doi:10.1038/nature04222.