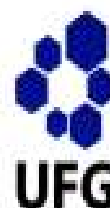


UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS BOVINAS BRASILEIRAS POR MEIO DE  
ANÁLISE TRICOLÓGICA**

Gisele Aparecida Felix  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIANIA  
2016



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1**            **1. Identificação do material bibliográfico:**         **Dissertação**         **Tese**

**1**            **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

**2**


Nome completo do autor: Gisele Aparecida Felix

Título do trabalho: Identificação de raças bovinas brasileiras por meio de análise tricológica

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  **SIM**         **NÃO**<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
 \_\_\_\_\_  
 Gisele Ap. Felix

Data: 09 /12 /2016

GISELE APARECIDA FELIX

**IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS BOVINAS BRASILEIRAS POR MEIO DE  
ANÁLISE TRICOLÓGICA**

Tese apresentada para obtenção o grau de Doutorado em  
Ciência Animal junto ao Programa de Pós-Graduação da  
Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade  
Federal de Goiás

**Área de Concentração:**  
Produção Animal

**Linha de Pesquisa:**  
Fatores genéticos e ambientais que influenciam o  
desempenho dos animais

**Orientadora:**  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti – UFG

**Comitê de Orientação:**  
Dr. Ubiratan Piovezan – EMBRAPA Pantanal  
Dr<sup>a</sup>. Fabiana Villa Alves – EMBRAPA Gado de Corte

GOIANIA  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Felix, Gisele Aparecida

Identificação de raças bovinas brasileiras por meio de análise tricológica [manuscrito] / Gisele Aparecida Felix. - 2016.

XVIII, 73 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co orientador Dr. Ubiratan Piovezan; co-orientador Dra. Fabiana Villa Alves .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Bos taurus indicus. 2. Bos taurus taurus. 3. marcador racial. 4. microestrutura dos pelos. 5. recursos genéticos animais. I. Soares Fioravanti, Maria Clorinda, orient. II. Título.

CDU 635

**Gisele Aparecida Felix**

Tese defendida e aprovada em 24/06/2016 pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



---

Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti  
(ORIENTADOR (A))



---

Profa. Dra. Juliana Quadros



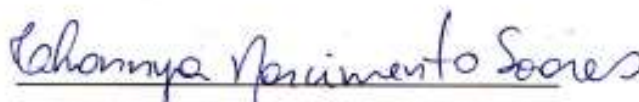
---

Profa. Dra. Eliandra Maria Bianchini Oliveira



---

Prof. Dr. Rodrigo Zaiden Taveira



---

Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares

1 ATA NÚMERO 232 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-  
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA  
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR Gisele Aparecida Felix. Às  
4 08h00min do dia 24/06/2016, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em  
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II  
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao  
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) Gisele  
8 Aparecida Felix, intitulada "Identificação de raças bovinas brasileiras por meio de análise  
9 tricológica", apresentada para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal, junto à Área de  
10 Concentração: Produção Animal desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora Profa.  
11 Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a)  
12 candidato (a) Gisele Aparecida Felix para exposição em cinquenta minutos do seu trabalho. A  
13 seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os  
14 quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de vinte minutos, assegurando-  
15 se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se  
16 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento,  
17 considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

18	Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti	<u>Aprovada</u>
19	Profa. Dra. Juliana Quadros	<u>APROVADA</u>
20	Profa. Dra. Eliandra Maria Bianchini Oliveira	<u>Aprovada</u>
21	Prof. Dr. Rodrigo Zaiden Taveira	<u>Aprovado</u>
22	Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares	<u>Aprovada</u>

23 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) Gisele  
24 Aparecida Felix, Habilitado [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a)] pelo(s)  
25 motivo(s) abaixo exposto(s):

26 \_\_\_\_\_  
27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_  
31 \_\_\_\_\_  
32 \_\_\_\_\_

33

34

35

36

37 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

38

39

40

41

42

43

44 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti**, lavrei a presente  
45 ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

46 Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

47 Profa. Dra. Juliana Quadros

48 Profa. Dra. Eliandra Maria Bianchini Oliveira

49 Prof. Dr. Rodrigo Zaiden Taveira

50 Profa. Dra. Thannya Nascimento Soares

*Aos meus pais **Gildo** e **Maria**, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim, pois mesmo em meio às dificuldades, vocês nunca mediram esforços para me ajudar e sempre caminharam junto comigo, acreditando nos meus sonhos e me apoiando. Ao meu sobrinho **Pedro** que nos últimos anos se tornou um dos principais motivos para eu sorrir. Não existem palavras que expresse o quanto vocês representam para mim. Posso apenas dizer:*

**Amo muito vocês!**

## AGRADECIMENTOS

"Não há no mundo excesso mais belo que o da gratidão"  
*La Brayère*

Por esta razão, depois de quatro anos de lutas, alegrias e conquistas, chegou o momento de agradecer:

À Deus: obrigada pelo milagre maravilhoso que é a vida. Obrigada Senhor por mais uma etapa concluída. Obrigada pela vida dos meus pais, irmão, sobrinho, professores, amigos e colegas que fizeram e fazem parte da minha história.

Aos meus pais, por todo o apoio, compreensão e amor que foram a mim dedicados.

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Clorinda Soares Fioravanti por toda confiança depositada em mim. Agradeço pela orientação, por todas as palavras de conforto e incentivo todas as vezes que eu me desesperei e agradeço principalmente por me forçar a realizar a melhor experiência que eu tive em minha vida que foi o meu doutorado sanduíche. Muito obrigada por me ajudar a crescer como pessoa e como profissional.

Em especial ao meu coorientador Dr. Ubiratan Piovezan que faz parte da minha vida acadêmica a partir do ano de 2010 e que desde o momento em que me conheceu confiou suas pesquisas e acreditou na minha capacidade para fazer parte de várias das suas realizações. Agradeço por todo apoio, orientação e paciência. Apesar de todos os desafios e lutas conseguimos realizar um bom trabalho que nos proporcionou e ainda nos proporcionará grandes frutos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFG, às coordenadoras Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Naida Cristina Borges e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danieli Brolo Martins, a ex-coordenadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cíntia Silva Minafra e Rezende, à assistente em administração Andréia Oliveira de Santana e a todos os professores pela oportunidade.

À Pesquisadora da EMBRAPA Pantanal Dr<sup>ª</sup>. Raquel Soares Juliano eu não tenho palavras e nem sei como agradecer a todo apoio, amizade, auxílio que recebi de você ao longo desses quatro anos de doutorado. Agradeço por me deixar fazer parte da “Pensão da Izirdinha”, por deixar fazer parte da minha vida todos os moradores de quatro patas que ali habitam e que muitas das vezes foram os meus maiores confidentes e amigos.

Aos funcionários e pesquisadores da Embrapa Pantanal que de uma forma ou de outra contribuíram com as minhas atividades em especial Sr Antônio Arantes, Sr. Wibert de Avellar,

João Batista Garcia, Rosilene Gutierrez, Dr. Urbano Gomes de Abreu, Dr<sup>a</sup>. Sandra Santos, Dr<sup>a</sup>. Aiesca Oliveira Pellegrin e tantos outros que fizeram com que essa minha temporada nessa instituição se tornasse mais agradável.

As amigas conquistadas Jovana Silva Garbelini, Juliana Macedo e Darliane de Castro Santos por todo companheirismo durante esses cinco anos que nos conhecemos, por dividirmos todas as nossas preocupações com relação ao doutorado, nossas dúvidas e nossas conquistas.

Aos colegas da Rede Pró Centro Oeste e em especial as amigas conquistadas Maria Ivete de Moura e Liliane Aparecida Tanus Benatti por todo companheirismo, aconselhamento e acima de tudo por ter feito dessa jornada um pouco mais prazerosa.

À Universidade de Padova na Itália em especial ao prof. Dr. Martino Cassandro e Dr. Nicola Tormen fundamentais para a realização desta tese. A todos os funcionários e estudantes de doutorado do DAFNAE em especial aos amigos conquistados Nadia Guzzo, Roberta Rostellato, Hugo Toledo, Wilson José Fernandes (Júnior Lemos), Lesly Penunuri Fernandez, Simone Beux, Edimir Andrade, Paola Semenzato, Cristina Sartori e a todos os alunos, funcionários e em especial aos professores Dr. Giuseppe Radaelli e Dr<sup>a</sup>. Lisa Maccatrozzo do departamento BCA por todo o carinho e acolhimento que recebi durante a minha estadia na Universidade. Agradeço também a prof. Dr<sup>a</sup>. Laura Guidolin do Departamento de Biologia por disponibilizar o uso do laboratório e equipamentos.

A prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana Quadros por toda a ajuda que foi fundamental para a realização desta tese por toda disponibilidade e atenção.

A pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Andrea Alves do Egito por todo auxílio na análise dos dados genéticos que foram de grande importância para finalização da tese.

A CAPES por todas as bolsas (Nacional e Sanduíche) concedidas para a realização desse doutorado. Ao CNPq e FUNDECT pelo auxílio financeiro para execução desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste estudo.

O meu muito obrigada!

*Sem sonhos, as perdas tornam-se insuportáveis,  
as pedras do caminho tornam-se montanhas,  
os fracassos transformam-se em golpes fatais.*

*Mas, se você tiver grandes sonhos...  
seus erros produzirão crescimento,  
seus desafios produziram oportunidades,  
seus medos produzirão coragem.*

***Por isso: nunca desista dos seus sonhos!***

(Augusto Cury)

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
1 Introdução.....	01
2 Conceitos - novo sistema de classificação de raças.....	02
3 Bovinos locais brasileiros.....	04
4 Pecuária brasileira no século XX.....	06
5 Rede Pró-Centro Oeste.....	06
6 Justificativa.....	07
7 Objetivo.....	08
Referências.....	08
CAPÍTULO 2 - TRICHOLOGY FOR IDENTIFYING MAMMAL SPECIES AND BREEDS: ITS USE IN RESEARCH AND AGRICULTURE.....	11
Summary.....	11
Resumo.....	12
Introduction.....	12
Fundamentals of trichology.....	16
Method of trichological analysis.....	17
Morphological patterns of hair microstructure.....	18
Morphometric patterns of the hair microstructure.....	19
Applying trichological analysis in agriculture.....	21
Conclusion.....	22
Acknowledgements.....	22
References.....	23
CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO RACIAL DE BOVINOS POR MEIO DE ANÁLISE TRICOLÓGICA.....	26
Resumo.....	26
Introdução.....	26

Metodologia.....	28
Resultados e discussão.....	38
Conclusão.....	59
Referências.....	60
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
Anexo.....	67

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 Schematic structure of the guard hair..... 14
- FIGURA 2 Cuticular patterns of different species A) Cuticular pattern *Bos gaurus* (400x); B) Cuticular pattern *Puma yagouaroundi* (200x); C) Cuticular pattern *Leopoldamys edwardsi* (400x); D) Cuticular pattern *Lepus tolai* (400x); E) Cuticular pattern *Micoureus paraguayanus* (400x); F) Cuticular pattern *Oreotragus oreotragus* (5,000x). Medullary patterns of different species G) Medullary pattern *Lutra lutra* (400x); H) Medullary pattern *Monodelphis domestica*; I) Medullary pattern *Holochilus brasiliensis* (400x); J) Medullary pattern *Sus scrofa*. (Padrões cuticulares de diferentes espécies A) padrão cuticular *Bos gaurus* (400x); B) padrão cuticular *Puma yagouaroundi* (200x); C) padrão cuticular *Leopoldamys edwardsi* (400x); D) padrão cuticular *Lepus tolai* (400x); E) padrão cuticular *Micoureus paraguayanus* (400x); F) padrão cuticular *Oreotragus oreotragus* (5,000x). Padrões medulares de espécies diferentes G) padrão medular *Lutra lutra* (400x); H) padrão medular *Monodelphis domestica*; I) medular padrão *Holochilus brasiliensis* (400x); J) padrão medular *Sus scrofa*..... 15
- FIGURA 3 Cuticular patterns of the shaft of 64 Brazilian mammal species (1) large leafy shape; (2) narrow leafy shape; (3) conoid shape; (4) large rhombus; (5) narrow rhombus; (6) mosaic; (7) double oblique wavy shape; (8) simple oblique wavy shape; (9) simple oblique wave shape with scales with ornamented edges; (10) transverse wavy shape; (11) transverse wavy shape with scales with incomplete edges; (12) transverse wavy shape with scales with ornamented edges; (13) irregular wavy shape; (14) irregular wavy shape with scales with incomplete edges; (15) irregular wavy shape with scales with ornamented edges. Medullary patterns of the shield of 64 Brazilian mammal species (16) absent; (17) discontinuous; (18) uniseriate ladder; (19) diagonal uniseriate; (20) anisocellular; (21) polygonal; (22) glandular; (23) string shape; (24) spindle shape, (25) corn shape; (26) amorphous; (27) matricial; (28) trabecular; (29) reticular; (30) sieved; (31) alveolar; (32) striped. (Padrões cuticulares do eixo de 64 espécies de mamíferos brasileiros (1) forma grande de folhas; (2) forma de folhas estreitas; (3) forma conóide; (4) grande losango; (5) losango estreita; (6) em mosaico; (7) forma ondulada dupla oblíquo; (8) forma ondulada oblíqua simples; (9) forma de onda oblíquo simples com escalas com bordas ornamentadas; (10) transversal forma ondulada; (11) forma ondulada transversal com escalas com bordas incompletos; (12) forma ondulada transversal com escalas com bordas ornamentadas; (13) forma ondulada irregular; (14) forma ondulada irregular com escalas com bordas incompletos; (15) forma ondulada irregular com escalas com bordas ornamentadas.

Padrões medular do protetor de 64 espécies de mamíferos brasileiros (16) ausente; (17) descontínuo; (18) escada uniseriate; (19) uniseriate diagonal; (20) anisocellular; (21) poligonal; (22) glandular; (23) forma cadeia; (24) forma de fuso, (25) a forma de milho; (26) amorfo; (27) matricial; (28) trabecular; (29) reticular; (30) crivado; (31) alveolar; (32) listrado.....

20

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1	Tipos de pelos de acordo com as chaves de leitura tricológica. (a) pelo guarda primário; (b) pelo guarda secundário com haste resta; (c) pelo guarda secundário com haste ondulada (d) subpelo.....	30
FIGURA 2	Estrutura esquemática de um pelo guarda.....	30
FIGURA 3	Lavagem de pelos guarda utilizando agitador magnético.....	31
FIGURA 4	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) que são impressos no esmalte.....	31
FIGURA 5	Leitura e análise das lâminas microscópicas.....	33
FIGURA 6	Esquema indicando os locais de medidas de escamas cuticulares de pelos guarda. Em vermelho destaque do perímetro de uma das escamas da cutícula.....	35
FIGURA 7	Esquema indicando os locais onde foram tomadas medidas da medula, (considerando seis secções de 50 µm de comprimento de pelo foram consideradas).....	35
FIGURA 8	Padrão da cutícula na haste dos bovinos locais brasileiros Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro (ondeado transversal com bordas das escamas lisa).....	40
FIGURA 9	Padrão da cutícula na haste do bovino local brasileiro Caracu e o zebuino Nelore (ondeado irregular com bordas das escamas lisa).....	40
FIGURA 10a	Padrão da medula no escudo do bovino local brasileiro Pantaneiro (contínua, multisseriada, anastomosada, trabecular com margens fimbriada e presença acentuada de vacúolos).....	44

FIGURA 10b	Padrão da medula no escudo dos bovinos locais brasileiros Caracu e Curraleiro Pé-Duro (contínua, multisseriada, anastomosada, trabecular com margens fimbriada e presença moderada de vacúolos).....	44
FIGURA 10c	Padrão da medula no escudo do bovino zebuino Nelore (contínua, multisseriada, anastomosada, trabecular com margens fimbriada e sem presença de vacúolos).....	44
FIGURA 11	Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais, obtidos de nove variáveis morfológicas e morfométricas de pelos guarda de bovinos pertencentes as raças Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore. EC = índice de escama cuticular; PERIM: perímetro da cutícula; DP = índice diâmetro pelo; DM índice diâmetro medular; CM = índice córtex medular; ORT_CUT: orientação da cutícula; LG_MD: largura da medula; VAC_MD: presença de vacúolo.....	52
FIGURA 12	Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais para observar a dissimilaridade entre as raças (Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore).....	53
FIGURA 13	Magnitude de $\Delta K$ em função de K dada pela média de 5 corridas independentes com x interações cada e período de <i>burn-in</i> de x. O valor que sobressai representa o valor real de K, ou seja, o numero de populações inferidas.....	56
FIGURA 14	Agrupamento individual dos x indivíduos das quatro raças bovinas analisadas inferido pelo método estatístico Bayesiano utilizando-se o programa STRUCTURE. Cada um dos x animais é representado por uma linha vertical dividida em segmentos classificados de acordo com a cor e tamanho corresponde à proporção relativa do genoma do animal que corresponde a um agrupamento particular. As diferentes raças estão separadas pelas linhas pretas. (1 = Caracu; 2 = Nelore; 3 = Curraleiro Pé-Duro e 4 = Pantaneiro).....	56

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 3

TABELA 1	Análise de variância e teste de comparação de médias das variáveis cuticulares de pelos guarda de bovinos Pantaneiro, Curraleiro Pé-Duro, Caracu e Nelore.....	49
TABELA 2	Análise de variância e teste de comparação de médias das variáveis medulares de pelos guarda de bovinos Pantaneiro, Curraleiro Pé-Duro, Caracu e Nelore.....	50
TABELA 3	Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação das cutículas dos pelos guarda.....	54
TABELA 4	Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação das células medulares dos pelos guarda.....	54
TABELA 5	Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação obtidas a partir das características microestruturas dos pelos guarda (análise tricológica).....	55
TABELA 6	Proporção de indivíduos de cada um dos quatro grupos genéticos analisados em relação às quatro populações inferidas pelo programa STRUCTURE.....	57
TABELA 7	Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação obtidas a partir das características microestruturas dos pelos guarda de 155 bovinos das raças Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore (análise tricológica).....	59

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AnGRs	Animal genetic resources
BCA	Departamento de Biomedicina Comparada e Alimentação
CM	Índice córtex-medular
DAFNAE	Departamento de Agronomia Animal, Alimentos, Recursos Naturais e Ambiente
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DM	Índice de diâmetro medular
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Índice de diâmetro do pelo
EC	Índice de escama cuticular
GH0	Pelo guarda
GH1	Pelo guarda primário
GH2	Pelo guarda secundário
LG_MD	Largura da medula
ORT_CUT	Orientação da cutícula
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PERIM	Perímetro da cutícula
RAPD	<i>Random amplified polymorphicDNA</i>
RGA	Recursos genéticos animais
UH	Subpelo
VAC	Presença de vacúolo
VCP	Variância explicada pelos componentes

## RESUMO

A tricologia é um método que permite analisar os padrões microestruturais de arranjos de escamas cuticulares e células medulares encontradas em pelos guarda de mamíferos. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de identificar as raças bovinas Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore por meio da morfologia e morfometria tricológica, bem como validar a técnica comparando com resultados da caracterização genética. Esse estudo foi apresentado em forma de capítulos, com uma revisão de literatura sobre a aplicação da tricologia na identificação de espécies de mamíferos e de raças de interesse zootécnico, onde foram disponibilizadas informações sobre os conceitos básicos necessários ao entendimento da análise tricológica e suas aplicações. O capítulo seguinte foi composto pela caracterização de pelos guarda das raças bovinas Caracu, Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro (*Bos taurus taurus*) e da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), por meio de análise tricológica, a fim de avaliar a possibilidade de uso desta técnica como marcador racial. Realizaram-se descrições morfológicas e morfométricas dos pelos de 160 bovinos (40 animais/raça). De cada bovino foram feitas subamostras de pelos até serem obtidas lâminas de qualidade. A morfologia foi determinada por meio de chave dicotômica e as medidas foram realizadas na escama cuticular e na medula e os resultados dessa metodologia foram comparados à caracterização genética dos animais amostrados. Os resultados indicaram que a tricologia e a avaliação genética foram similares no ponto de vista de classificação dos indivíduos dentro dos grupos raciais. Portanto, a técnica pode ser considerada útil como marcador racial para raças bovinas.

**Palavras-chave:** *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*, marcador racial, microestrutura dos pelos, pelos guarda, recursos genéticos animais

## ABSTRACT

### Identification of Brazilian bovine breeds through trichology analysis

Trichology is a method to analyze micro-structural patterns of scarf-skin scales arrangements and medullary cells found in mammals guard hair. The present study was conducted to identify Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro and Nellore bovine breeds by trichological morphology and morphometry, as well as validate the technique compared with genetic characterization. This study was presented in chapters. First, a review on trichology application on mammal species and breeds identification with basic concepts necessary for understanding trichology analysis and its applications. The second chapter was composed by characterization of guard hair of Caracu, Curraleiro Pé-Duro and Pantaneiro (*Bos taurus taurus*) and of Nellore (*Bos taurus indicus*), Brazilian bovine breeds, through trichology analysis, to assess the possibility of using this technique as a racial marker. Morphological and morphometric descriptions were held by 160 cattle (40 animals/breeds). Sub-samples of each bovine were made until quality slides were obtained. Morphology was determined through dichotomous keys and measures were carried out in the cuticle scale and in the hair shield matrix. Results indicated that trichology and genetic evaluation were similar in the point of view of classification of individuals within racial groups. Therefore, the technique can be considered useful as a marker for bovine breeds.

Keywords: animal genetic resources, *Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus*, guard hair, microstructure of hair, racial markers

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1 Introdução

Várias espécies de animais domésticos consideradas atualmente como raças locais brasileiras têm em comum sua origem nos primeiros animais trazidos para o país a partir da Península Ibérica, no período em que o país foi colônia do Reino de Portugal. O bovino Pantaneiro e o Curraleiro Pé-Duro são exemplos dessas raças. Resultado de um processo de seleção natural, esses animais caracterizam-se pela rusticidade, adaptação e resistência a amplas variações ambientais, fundamentos da sobrevivência nos ambientes onde vivem atualmente. Em função disso, as raças locais brasileiras constituem importante recurso genético para a bovinocultura tanto para sistemas de produção sustentáveis de carne como para o uso em programas de melhoramento genético.

Modificações de ordem econômica e social provocaram progressiva e importante redução, tanto em número quanto na distribuição geográfica dos rebanhos de bovinos de raças locais brasileiras. Com a melhoria no desempenho das raças melhoradas, esses recursos genéticos estão sendo progressivamente perdidos, em decorrência da substituição das raças tradicionais por raças mais produtivas, ameaçando sua conservação e implicando no empobrecimento da biodiversidade local<sup>1</sup>. Desse modo, muitas raças que já foram economicamente importantes são atualmente raras e, na maioria dos casos, altamente ameaçadas de extinção, ainda que possuam características interessantes<sup>1,2</sup>.

A caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos animais (RGA), pois permite a avaliação da variabilidade genética que é um elemento fundamental na elaboração estratégica de melhoramento e planos de conservação<sup>3</sup>. O objetivo da conservação é a manutenção da diversidade genética máxima de cada espécie, ou seja, a conservação da diversidade genotípica de cada espécie<sup>4</sup>.

Os resultados da caracterização podem auxiliar na avaliação da distância entre populações reduzindo as dúvidas existentes sobre expressão genotípica e na escolha dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, mediante a estimativa de índices de similaridade entre os grupos analisados<sup>5,6</sup>. Estudos desta natureza são fundamentais para o melhoramento animal

e sua realização com bovinos de raças locais é de grande importância já que seus genes e as suas combinações podem ter muita utilidade no futuro, sobretudo com a perspectiva de mudanças climáticas globais.

O uso da tricologia permite analisar e comparar os padrões microestruturais de arranjos de escamas cuticulares e células medulares encontradas em pelos guarda de mamíferos. Tais padrões permitem a identificação dos animais quanto à ordem, família, gênero, espécie e até subespécie ou raças para alguns grupos zoológicos, uma vez que a morfologia dos pelos se mostra bastante específica<sup>7</sup>. No Brasil, o uso da identificação microscópica de pelos é recente em relação a outros países. Entretanto, a análise tricológica foi largamente utilizada na identificação de espécies desde o início do século XX em diversos campos da pesquisa em ecologia<sup>8</sup>, na área forense<sup>9</sup> e contaminantes de alimentos<sup>7</sup>.

Esse tipo de análise foi pouco empregado na pesquisa científica agropecuária sendo conhecido um único trabalho realizado por pesquisadores italianos que propuseram esse tipo de metodologia na tentativa de discriminar raças ovinas locais italianas em prol de uma estratégia de registro e controle de procedência dos animais, já que naquele país as raças locais são mais valorizadas. Foi constatada elevada acurácia na discriminação de grupos raciais ovinos com base na avaliação tricológica<sup>10</sup>. Além disso, a análise macro e micro estrutural de pelos guarda em 21 espécies de ungulados indicaram interferência do processo de domesticação sobre características medulares e cuticulares de pelos de ovelhas, ocorrendo um agrupamento racial da população doméstica, diferindo dos seus ancestrais selvagens<sup>11</sup>.

## **2 Conceitos - sistema de classificação de raças**

O termo "raça" é comumente utilizado em relação a animais domesticados. Uma raça pode ser definida como sendo um grupo de subespécie de animais domésticos com características externas definíveis e identificáveis que lhe permitem ser separadas por avaliação visual de outros grupos definidos de forma semelhante, dentro da mesma espécie, ou um grupo para o qual a separação geográfica e/ou cultural de grupos fenotipicamente semelhantes levou à aceitação de sua identidade própria<sup>12</sup>.

Entretanto, não existe uma definição universalmente aceita da palavra ou uma forma objetiva de classificar os animais em uma determinada raça. Em vez disso, é um termo técnico, ou seja, uma palavra que tem um significado definido em um contexto particular<sup>13</sup>.

O conceito de raças bovinas surgiu no final do século XVIII na Grã-Bretanha, quando houve um período de intensa consanguinidade e abates para alcançar objetivos específicos de reprodução. De tal modo, as raças tornaram-se fenotipicamente, e até certo ponto genotipicamente distintas e passaram a receber nomes específicos<sup>13</sup>.

A noção de raça no contexto dos países em desenvolvimento é mais complexa. Muitas vezes existe um grande número de genótipos animais localmente adaptados, fenotipicamente e, possivelmente genotipicamente semelhantes, que recebem nomes diferentes para designar a “raça” como, por exemplo, diferentes grupos étnicos. Inversamente, grupos fenotipicamente/genotipicamente diversos de animais podem ser agrupados sob um mesmo nome comum<sup>13</sup>.

Durante a avaliação da situação dos recursos genéticos animais em escala mundial surgiram algumas dificuldades metodológicas uma vez que na estrutura do sistema a classificação era baseada em populações de raças no âmbito nacional<sup>13</sup>. Diante disso, foi criado um novo sistema de classificação de raças desenvolvido para o relatório "Situação Mundial dos Recursos Genéticos para Agricultura e Alimentação".

Atualmente, as raças são classificadas como sendo locais ou transfronteiriças, ou seja, quando as raças só ocorrem em um país, são chamadas de raças locais, e quando ocorrem em mais de um país, chamadas de raças transfronteiriças. Dentro da categoria de raça transfronteiriça, introduz-se mais uma distinção entre raças transfronteiriças regionais, as que ocorrem em mais de um país dentro de uma única região (ou continente), e as raças transfronteiriças internacionais, as que ocorrem em mais de uma região (ou continente)<sup>14</sup>. Já o rebanho bovino comercial existente no Brasil pode ser classificado, de acordo com sua origem, em comerciais e exóticos. As raças exóticas são aquelas que foram importadas nos últimos 100 anos, independentes de serem taurinas e zebuínas.

### 3 Bovinos locais brasileiros

Segundo dados da FAO<sup>15</sup> existem evidências claras de três eventos distintos no início do processo de domesticação dos bovinos para três raças distintas onde a partir do Auroque *Bos primigenius* considerado o precursor da espécie. Esses bovinos espalharam-se a partir da Ásia para o continente africano, originando o *Bos primigenius opisthonomus* domesticado a cerca de 9.000 anos. Na Europa deram origem ao *Bos primigenius primigenius*, domesticado a 8.000 anos. A forma *Bos primigenius nomadicus* permaneceu na sua forma original e estas formas primitivas deram origem às raças atuais<sup>16</sup>. Os bovinos europeus descendem de quatro formas primitivas: o *Bos taurus primigenius*, o *Bos taurus brachyceros*, o *Bos taurus frontosus* e o *Bos taurus akeratos*<sup>17</sup>. A domesticação dos auroques em sítios tão diversos pode ter contribuído para a formação dos diferentes tipos de bovinos observados atualmente<sup>18</sup>.

Neste século as raças bovinas se distribuem em duas subespécies. A primeira, constituída pelo tipo setentrional, também denominado taurino, o *B. taurus taurus*, disseminada pelas regiões de clima temperado, representa as raças bovinas européias<sup>15</sup>. Os zebuínos, *B. taurus indicus*, vivem nas regiões tropicais, tendo como característica mais importante a presença de barbela e cupim<sup>15, 16</sup>.

Acredita-se que os indivíduos zebuínos, também denominados de Zebu ou Cebu nos países latinos, tenham sido domesticados em uma data posterior, cerca de 7 000 a 8 000 anos atrás, na região do Vale do Indo do Paquistão moderno a partir da subespécie *B. p. nomadicus*<sup>19</sup>. Esses animais teriam surgido inicialmente na Índia e só mais tarde foram introduzidos na África<sup>20</sup>.

No Brasil, os primeiros rebanhos bovinos desembarcaram em São Vicente no ano de 1534<sup>15</sup>. Considera-se que existiam três rotas principais de introdução: São Vicente (São Paulo), Pernambuco e Bahia<sup>21, 22</sup>. Enquanto todos os outros países sul-americanos receberam somente raças espanholas, devido à colonização lusitana, o Brasil foi o único país do continente americano que recebeu além das raças espanholas as raças portuguesas<sup>23</sup>.

Existe controvérsia a respeito das raças trazidas pelos espanhóis<sup>16, 23</sup>, porém acredita-se que os primeiros animais que chegaram eram originados da Andaluzia, no sudoeste da Espanha<sup>24</sup>, havendo uma grande semelhança entre algumas raças nativas Andaluzadas como a Retinta e a Berrenda<sup>16</sup>. Das raças portuguesas, que deram origem a maioria dos bovinos locais brasileiros, incluindo a raça Caracu, destacam-se a Barrosã, a Mirandesa, a Minhota, a Alentejana e a Arouquesa<sup>21, 25</sup>.

Assim que chegaram ao Brasil, os bovinos desembarcados em São Vicente foram irradiados para os campos sulinos, Goiás e o Vale do São Francisco (Minas e Bahia) chegando também até o Piauí e o Ceará. Os que desembarcaram em Pernambuco e na Bahia emigraram para os sertões nordestinos, norte de Minas, oeste da Bahia, onde encontraram os rebanhos originários de São Vicente<sup>16</sup>.

A seleção natural destes rebanhos atuando em ambientes extremamente variáveis em todo o país, juntamente com os eventos recorrentes da miscigenação destas raças levaram ao desenvolvimento das raças adaptadas a uma ampla gama de ambientes com níveis excepcionais de variabilidade fenotípica e melhor adequação às condições locais<sup>16</sup>. No Nordeste do país surgiu o bovino Curraleiro ou Sertanejo, que migrou para Minas Gerais e Goiás. No sudeste desenvolveu-se o Junqueira e o Franqueiro, além das raças Caracu e Mocho Nacional. No sul, formou-se o Crioulo Lageano e no Pantanal, o bovino Pantaneiro<sup>16</sup>.

Os bovinos ibéricos de raça pura dos quais originaram as raças locais brasileiras, filiavam-se a três troncos diferentes: o batávio (*Bos taurus batavicus*), representados pelas raças Barrosã e Turina, o aquitânico (*Bos taurus aquitanicus*), representado pelas raças Galega, Arouquesa, Alentejana, Mertolenga, Agarvia, Minhota e o ibérico (*Bos taurus ibericus*) representado pelas raças Mirandesa e Brava<sup>17, 22</sup>. As raças Curraleiro Pé-Duro, Crioulo Lageano e Pantaneiro possuem um ancestral comum, o *Bos taurus ibericus* e as raças Caracu, Junqueira e Mocho Nacional possuem como provável ancestral o *Bos taurus aquitanicus*<sup>25</sup>.

O longo período de seleção natural durante as etapas iniciais da formação destas raças, provavelmente ocasionou perda da diversidade genética, bem como, concentração e fixação de características específicas, tais como rusticidade, adaptação às condições adversas, dentre outras,<sup>26, 27</sup> uma vez que a adaptação ao novo ambiente produziu mudanças no comportamento e em aspectos físicos e morfológicos dos bovinos europeus, dando origem a diferentes ecótipos<sup>23</sup>. Nesse caso, os bovinos locais brasileiros seriam então uma população de bovinos isolada em determinada região ou regiões, de modo a apresentar características próprias de adaptação a influencia do meio onde habitam moldadas pela seleção natural<sup>28</sup>.

#### **4 Pecuária Brasileira no século XX**

A partir de meados do século XIX os bovinos locais mesmo apresentando características próprias de adaptação moldada pela seleção natural<sup>28</sup> sofreram a influência de raças exóticas comerciais europeias como, por exemplo, as raças Hereford e Angus e também de bovinos zebuínos importados da Índia<sup>18</sup>. Os bovinos zebus foram transportados inicialmente para o Brasil em 1870 e eram em sua maioria machos que foram utilizados em cruzamentos com fêmeas crioulas<sup>29</sup>.

As raças com aptidão para a produção de leite como, por exemplo, Jersey e Holandesa (Holstein-Friesian) também foram introduzidas, mas com menor impacto na diluição genética das raças locais<sup>20</sup>. Esse fato foi o resultado da busca por raças mais produtivas, ocasionada pela crescente demanda por alimentos de origem animal<sup>30</sup>. O grupo de raças exóticas inclui os animais importados nos últimos 50 a 100 anos, tanto zebuínos quanto taurinos, que atualmente compõem a maior parte das populações comerciais<sup>17, 20</sup>.

Essas populações embora altamente produtivas não apresentam as características adaptativas, encontradas em raças locais<sup>6, 30</sup>. Deste modo, por meio do uso intensivo de cruzamentos absorventes com animais importados, houve uma rápida substituição das raças locais pelas exóticas<sup>26, 30</sup>.

A tendência de substituição das raças locais por exóticas promoveu mudança nos padrões de produção pecuária, colocando grande parte das raças bovinas locais brasileiras sob risco de extinção<sup>24, 30</sup>. Hoje existem apenas cinco raças bovinas localmente adaptadas no Brasil, sendo que quatro delas encontram-se sob risco de extinção (Curreleiro Pé-Duro, Pantaneiro, Crioulo Lageano e Mocho Nacional). A raça Caracu é uma exceção e pode ser considerada como já estabelecida<sup>27, 30</sup>.

#### **5 Rede Pró-Centro Oeste**

No ano de 2010, por intermédio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), o Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT), as Fundações de Amparo à Pesquisa (FAP's) da Região Centro-Oeste, o Ministério da Educação (MEC) e a Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), foi lançada uma chamada de projetos (Edital 31/2010). O objetivo foi apoiar projetos de pesquisa científica e tecnológica que contribuíssem significativamente para o desenvolvimento científico e tecnológico do país, fortalecendo e consolidando a formação de recursos humanos e a produção de conhecimentos científicos, tecnológicos e de inovação, favorecendo o desenvolvimento sustentável da Região Centro-Oeste, tendo em vista a conservação e o uso sustentável dos recursos naturais do Cerrado e do Pantanal.

Foram apoiados 131 projetos de pesquisa na Região Centro-Oeste do Brasil, sendo a Universidade Federal de Goiás (UFG), por meio da Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti, uma das instituições que coordenou a Rede 12 intitulada “Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro”. O principal objetivo da Rede 12 foi estabelecer uma estrutura inter-regional e interdisciplinar de pesquisas e transferência de conhecimento, com a finalidade de caracterizar duas raças bovinas brasileiras locais em risco de extinção (Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro) e gerar dados para subsidiar o desenvolvimento de um modelo de exploração pecuária para o Cerrado e Pantanal, utilizando essas raças, priorizando a conservação dos ecossistemas, a sustentabilidade e a diversidade genética.

Dentre os nove projetos aprovados ligados à Rede 12, houve a proposta de realizar a caracterização das raças bovinas locais brasileiras por meio de morfometria tricológica com o objetivo de encontrar métodos mais econômicos para a identificação de raças. O principal foco desse projeto, coordenado pelo pesquisador Dr. Ubiratan Piovezan da Embrapa Pantanal, foi caracterizar pelos de bovinos de raças locais brasileiras com a finalidade de verificar a possibilidade de uso dessa técnica como marcador racial. Esta tese é fruto das abordagens realizadas com esse intuito.

## **6 Justificativa**

Embora os bovinos locais brasileiros sejam provenientes de rebanhos domésticos, essas populações sofreram importante processo de seleção natural nas regiões onde foram introduzidas, independente da participação do homem. Tais diferenciações podem ter influenciado nas

características microestruturais dos pelos dessas raças que pode ser verificado com a utilização da tricologia.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos semelhantes envolvendo raças bovinas no Brasil. Do ponto de vista zootécnico a utilização de uma metodologia associada às amostras biológicas de fácil acesso, com baixo custo de realização e de rápida execução é uma alternativa relevante, pois abre a perspectiva para a pesquisa em diversas áreas da produção animal principalmente nos estudos relacionados aos RGA.

## 7 Objetivo

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de identificar as raças bovinas Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore, por meio da morfologia e morfometria tricológica, bem como validar a técnica comparando-a com resultados da caracterização genética.

## Referências

1. Taberlet, P, Coissac, E, Pansu, J, Pompanon, F. Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. *C. R. Biol.* 2011; 334:247–254.
2. Mariante, AS, Cavalcante, N. *Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 2006.274p.
3. Sharma, R, Kishore, A, Mukesh, M, Ahlawat, S, Maitra, A, Pandey, AK, Tantia, MS. Genetic diversity and relationship of Indian cattle inferred from microsatellite and mitochondrial DNA markers. *BMC Genetics*; 2015; 16-73.
4. Barker, JSF. Conservation of livestock breeds diversity. *Anim. Genet. Resour. Inf.* 1999; 25:33-43.
5. Spritze, A, Egito, AA, Mariante, AS, McManus, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 2003; 38(10): 1157-1164.
6. Mariante, AS, Albuquerque, MSM, EGITO, AA, McManus, C, Lopes, MA, Paiva, SR. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. *Livest Sci.* 2009; 120:204–212.

7. Silveira, F, Navarro, MA, Monteiro, PKA, Quadros, J, Monteiro-Filho, ELA. Proposta de utilização da microestrutura de pelos-guarda para fins de estudos forenses e no controle de qualidade de alimentos. RBC. 2013; 2(1): 32-41.
8. Quadros, J, Monteiro-Filho, ELA. Identificação dos mamíferos de uma área de floresta atlântica utilizando a microestrutura de pelos-guarda de predadores e presas. Arq. Mus. Nac. 2010; 68:47-66.
9. Sato, I, Nakaki, S, Murata, K, Takeshita, H, Mukai, T. Forensic hair analysis to identify animal species on a case of pet animal abuse. Int J Legal Med. 2010; 124:249–256
10. Tormen, N. Conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche animali autoctone. Padova. [Tesis]. Padova: Universita degli Studi di Padova, Faculta of Agrária; 2013.
11. De Marinas, AM, Aspire, A. Hair identification key of wild and domestic ungulates from southern Europe. Wilde. Biol.2006; 12: 305-320.
12. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources – Executive Brief. FAO,Rome.1999.
13. Marshall, K. Optimizing the use of breed types in developing country livestock production systems: a neglected research area. J. Anim. Breed. Genet. 2014;131: 329–340.
14. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Comissão de Recursos genéticos para agricultura e alimentação. Situação Mundial dos Recursos Genéticos Animais para Agricultura e alimentação - versão resumida. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2010. 42p.
15. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome: Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling; 2007. 512p.
16. Egito, AA. Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia; 2007. [acesso 31 maio 2016]. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/1136>.
17. Santiago, AA. O Guzerá. Recife: Ed. Tropical. 1984. 450 p.
18. Alderson, L. The categorization of types and breeds of cattle in Europe. Arch. Zootec. 1992; 41:325-333.
19. Loftus, RT, MacHugh, DE, Bradley, DG, Sharp, PM, Cunningham, P. Evidence for two independent domestications of cattle. Proc Natl Acad Sci. 1994; 91(7): 2757–2761.
20. Ginja, CJ. Influência das raças bovinas ibéricas na estrutura genética das populações de bovinos Crioulos da América Latina. [Tese]. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de

Agronomia; 2009. [acesso 01 jun 2016]. Disponível em: [https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1874/1/Catarina%20Ginja\\_Tese%20Doutoramento%202009.pdf](https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1874/1/Catarina%20Ginja_Tese%20Doutoramento%202009.pdf).

21. Primo, AT. El ganado bovino Ibérico en las Americas: 500 años después. Arch. Zootec. 1992; 41:421-432.

22. Mariante, AS, Cavalcante, N. Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil, Brasília: EMBRAPA; 2000. 228p.

23. Mazza, MCM, Mazza, CAS, Sereno, JRB, Santos, SA, Pellegrin, AO. A etnobiologia e conservação do bovino pantaneiro. Corumbá: EMBRAPA-CPAP; Brasília: EMBRAPA-SPI; 1994. 61p.

24. Egito, AA, Mariante, AS, Albuquerque, MSM. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. Arch. de Zootec. 2002; 51:39-52.

25. Primo AT. Os bovinos ibéricos nas Américas. In: Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 1993; Rio de Janeiro, Brasil. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993.

26. Mariante, AS, Egito, AA. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. Theriogenology. 2002; 57:223-235.

27. Mariante, AS, Egito, AA, Albuquerque, MSM, Paiva, SR, Ramos, AF. Managing genetic diversity and society needs. RBZ.2008; 37:127-136.

28. Brito, CMC. Citogenética do gado Pé-Duro. Teresina: EDUFPI, 1998, 94p.

29. Meirelles, F V, Rosa, AJM, Lôbo, RB, Garcia, JM, Smith, LC, Duarte, FAM. Is the American Zebu really *Bos indicus*? Genet. Mol. Biol. 1999; 22(4): 543-546.

30. Felix, GA, Piovezan, U, Juliano, RS, Silva, MC da, Fioravanti, MCS. Potencial de uso de raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro. Enc. Biosfera. 2013; 9(16):1715-1741.

## **CAPÍTULO 2 - TRICHOLOGY FOR IDENTIFYING MAMMAL SPECIES AND BREEDS: IT'S USE IN RESEARCH AND AGRICULTURE**

(Artigo publicado na Revista Archivos de Zootecnia, Córdoba, v. 63, p 107-116, 2014)

### **TRICOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS E ESPÉCIES DE MAMÍFEROS: APLICAÇÃO NA PESQUISA E NA AGROPECUÁRIA**

Felix, G.A.<sup>1\*</sup>; Piovezan, U.<sup>1</sup>; Quadros, J.<sup>2</sup>; Juliano, R.S.<sup>1</sup>; Alves, F.V.<sup>3</sup> and Fioravanti, M.C.S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS. Brasil. \*gizootecnista@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná. Campus Litoral. R. Jaguariaíva. Caiobá - Matinhos (PR). Brasil.

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Corte. Campo Grande, MS. Brasil.

<sup>4</sup>Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Campus Samambaia. Goiânia-Goiás. Brasil.

Additional keywords

Cuticle. Medulla. Morphometry. Hair.

Palavras chave adicionais

Cutícula. Medula. Morfometria. Pelos.

#### **SUMMARY**

The microscopic structure of animal hair is species-specific. This allows not only the identification of species but also discrimination among breeds. Trichology is widely used for species identification in taxonomy, ecology, paleontology, archaeology and even forensic sciences and food quality control. However, its use in livestock production is still incipient. Getting to know this methodology and to disseminate this technique in livestock investigation opens perspectives for research concerning animal genetic resources (AnGRs). Many advantages are listed such as the facility of sampling and processing, a great reliability of the results and a low cost. Therefore, trichology is an important tool for local breed studies in Brazil considering that characterization

may help elucidate characteristics such as hardiness, prolificity, resistance, that warrant conservation and breeding efforts of local breeds. This review was carried out to discuss the use, the application and the potential use of microscopic analysis of mammal hair in livestock research and production.

## RESUMO

A estrutura microscópica de pelos é espécie específica. Ela permite não apenas a identificação de espécies, mas também a identificação de raças. A tricologia é amplamente utilizada para identificação de espécies em pesquisas taxonômicas, ecológicas, paleontológicas, arqueológicas, como controle de qualidade de alimentos e forenses, mas são pouco exploradas 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 (RGA). Do ponto de vista zootécnico a utilização de uma metodologia de fácil execução com baixo custo de realização e confiável é uma alternativa de grande importância. A tricologia é uma importante ferramenta para estudos sobre raças locais no Brasil, considerando que a caracterização dos pelos pode elucidar características como rusticidade, prolificidade, resistência à endo e ectoparasitas e adaptação às condições adversas que justificam os programas de conservação de tais recursos genéticos animais. Esta revisão foi redigida com o objetivo de discutir o uso da análise microscópica de pelos de mamíferos, sua aplicação na pesquisa científica e a importância para a produção e pesquisa agropecuária.

## INTRODUCTION

Among the animals, hair is inherent only in mammals (DREYER, 1966; CHERNOVA, 2002). Mammals acquired the hair during phylogeny and this characteristic is not evolutionarily related to any skin appendages of other animals (CHERNOVA, 2002). Trichology (hair study) is widely used for species identification in taxonomy, ecology, paleontology, archaeology and even forensic sciences and food quality control. However, its use in livestock production is still incipient. This review was carried out to discuss the application and the potential use of qualitative and quantitative microscopic characteristics of hairs for species and breeds identification as well as for livestock research and production.

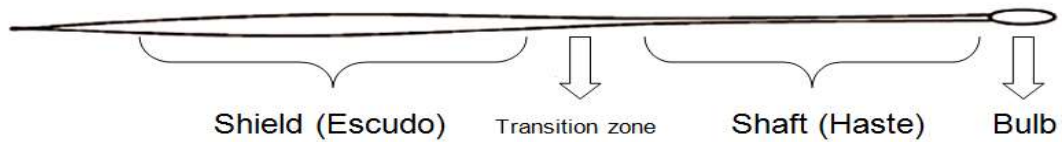
The hair is a filamentous, keratinized structure, which protrudes from the epidermal surface of the skin (GARTNER & HIATT, 2003; INGBERMAN & MONTEIRO FILHO, 2006). Its structure is polymorphous and some of its features have diagnostic value in the identification of studied samples. Its structure can vary significantly in phylogenetically related species, subspecies and breeds, as well as among different developmental stages of the same individual (CHERNOVA, 2002).

Two distinct types of hair constitute the coat of most mammals: an outer coat of thick hair and an undercoat of shorter, thinner and softer hair (DREYER, 1966). However, TEERINK (1991) suggests that the hair should be divided into two broad categories: guard coat (*overhair*) and undercoat (*underhair*). The transition from the guard to the undercoat occurs gradually, forming four main groups, three of these belonging to the guard group (GH0, GH1 and GH2) and one to the undercoat (UH) (TEERINK, 1991).

The development of the two layers varies with the climate of the environment where the animal is found; it also underwent modifications due to the domestication process (DREYER, 1966). The undercoat is shorter, thinner, wavy and numerous, it contributes to thermoregulation and protects against water penetration (VANSTREELS et al., 2010). The guard coat is longer, thicker and less numerous, it stands out and contributes mainly to mechanoreception, camouflage in the environment and general pattern determination of coat coloration (TEERINK, 1991; MARTIN et al., 2009).

The guard coat can be further subdivided into primary and secondary, presenting, along its length, two main parts, the shaft and the shield (Figure 1). The first one is the portion that follows the bulb, it is narrower and straighter. The second one is wider and lays between the shaft and the distal extremity of the hair (DAY, 1966; QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2006a). Not all coats present characteristic features (DAY, 1966; INGBERMAN & MONTEIRO FILHO, 2006); however, the guard coat is more useful for specific identification by means of the microstructure of its cuticle and medulla, which represent morphological patterns characteristic of each species (TEERINK, 1991; CHERNOVA, 2003).

The hair is formed by three concentric layers of keratinized cells: the cuticle (outer layer), the cortex (intermediate layer) and the medulla (inner layer) (TEERINK, 1991; GARTNER & HIATT, 2003; STRAVISI, 2007).



**Figure 1** - Schematic structure of the guard hair.

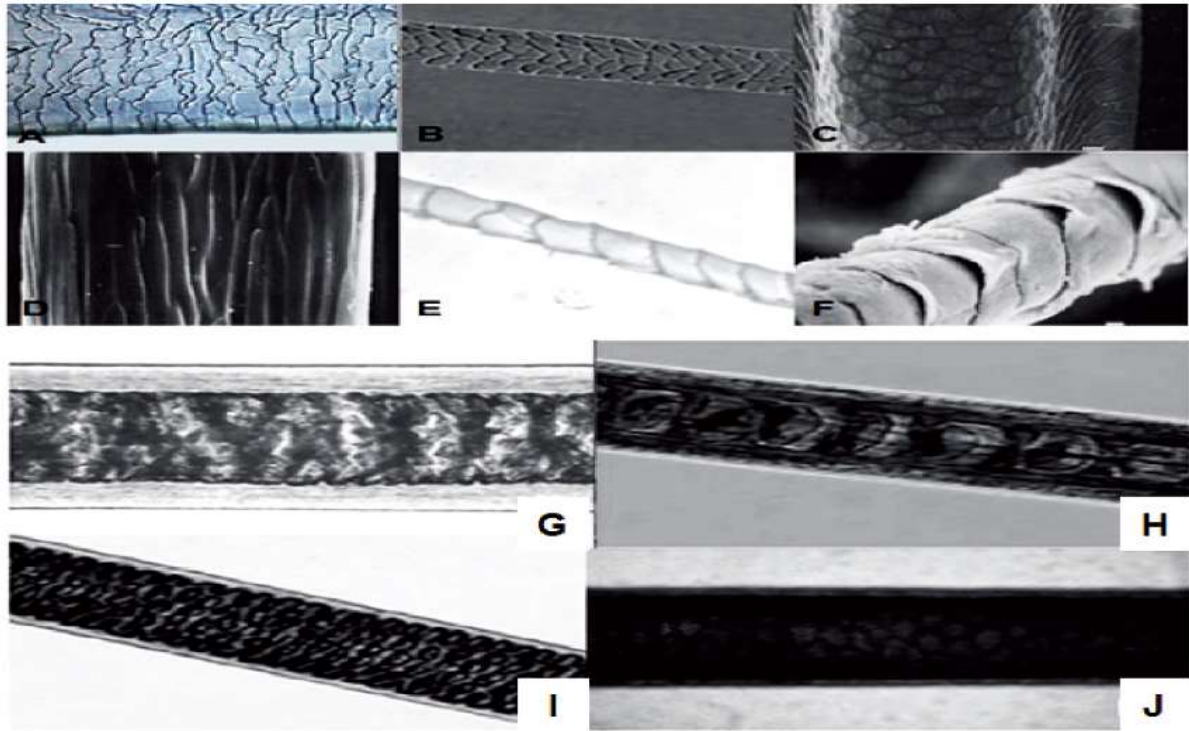
#### The cuticle

The cuticle of the hair originates from a single epithelium layer (Meyer et al., 2002). It represents the outermost layer of the hair being formed by overlapping transparent keratin scales (KEOGH, 1983; TEERINK, 1991). The pattern determined by these scales (Figure 2) along the length of the hair, their shapes, sizes and types of margins have been recognized and used for species identification (KEOGH, 1979; STRAVISI, 2007).

#### The cortex

The cortex is composed of non-nucleated spindle cells, concentrically arranged and filled with  $\alpha$  rigid keratin, seen by means of electronic microscopy (HAUSMAN, 1920), but not by transmission or reflection in light microscopy (KEOGH, 1983). The number of melanin granules in cortical cells determines the color of the hair, and these granules can be seen, in some cases, by light microscopy (KEOGH, 1979).

The amount and type of melanin (eumelanin and pheomelanin) present in the hair as well as the presence or absence of air bubbles in the medulla determines the color one sees macroscopically (QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2006a). The cortex has limited use in the identification keys; however, its size relative to the medulla in longitudinal view of the hair as well as its size and shape in transverse sections can be used in hair identification (KEOGH, 1979; TEERINK, 1991).



**Figure 2-** Cuticular patterns of different species A) Cuticular pattern *Bos gaurus* (400x); B) Cuticular pattern *Puma yagouaroundi* (200x); C) Cuticular pattern *Leopoldamys edwardsi* (400x); D) Cuticular pattern *Lepus tolai* (400x); E) Cuticular pattern *Micoureus paraguayanus* (400x); F) Cuticular pattern *Oreotragus oreotragus* (5,000x). Medullary patterns of different species G) Medullary pattern *Lutra lutra* (400x); H) Medullary pattern *Monodelphis domestica*; I) Medullary pattern *Holochilus brasiliensis* (400x); J) Medullary pattern *Sus scrofa*. (Padrões cuticulares de diferentes espécies A) padrão cuticular *Bos gaurus* (400x); B) padrão cuticular *Puma yagouaroundi* (200x); C) padrão cuticular *Leopoldamys edwardsi* (400x); D) padrão cuticular *Lepus tolai* (400x); E) padrão cuticular *Micoureus paraguayanus* (400x); F) padrão cuticular *Oreotragus oreotragus* (5, 000x). Padrões medulares de espécies diferentes G) padrão medular *Lutra lutra* (400x); H) padrão medular *Monodelphis domestica*; I) medular padrão *Holochilus brasiliensis* (400x); J) padrão medular *Sus scrofa*

Source: De Marinis and Asprea (2006); Kuhn (2009); Quadros and Monteiro-Filho (2010); Chernova (2002); Sahajpal et al. (2009); Quadros and Monteiro-Filho (2010); Abreu et al. (2011)

### The medulla

The medulla (Figure 2) is composed of soft  $\beta$  keratin in the early stages of its development (KEOGH, 1983). However, the cuticle and the cortex may grow faster than the medulla, which results in the air spaces within (KEOGH, 1979). The medulla is formed of narrowly adjacent dead cells, but, unlike the cortex, they can be distinguished (KEOGH, 1979).

Although medulla dead cells may contain pigment, they are often transparent (KEOGH, 1979). The air cavities in medulla are black under the microscope, which may obscure the medulla structure itself. The meaning of these medullary cavities may be related to thermoregulation; however, if the air is expelled, the various arrangements of the medulla can be easily viewed and these arrangements are used for classification and taxonomic criteria (KEOGH, 1979).

### Fundamentals of trichology

Trichology (*thricos* = hair and *logos* = study), a noninvasive method for identifying mammals. Consists in the analysis of the morphology of the hair and it has been used since the early twentieth century. By combining the main features presented by the cuticle, cortex and medulla, the researchers created dichotomous keys to identify mammal species (QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 1998). The combination of these three layers show morphologic patterns that, together, give any species specific morphological traits (QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2006a) used for taxonomic identification in ecology, morphology, textile testing, forensics, among other areas (AMMAN et al., 2002; CHERNOVA, 2003).

Thus, these anatomical structures are of great value in species identification (QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2006a; PECH-CANCHÉ et al., 2009). The comparison of hair from different origins (either using taxidermic animals, fecal samples, gastrointestinal contents, carcasses, etc.) can be performed due to keratinization, which gives them great strength, regardless of the type of process they have been submitted to, whether chemical (taxidermy and digestion) or mechanical, such as mastication and weathering (QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 1998b; QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2006a).

The analyzed hair must be collect in the dorsal region of the body of mammals (KUHN, 2009). However, studies conducted by DAY (1966); DREYER (1966); RIGGOTT & WYATT (1980), focused on the differences of the structure of hair collected from different parts of the body

and demonstrated that they can be compared, without jeopardizing the identification, as well as the hair of animals of different sexes and ages, but the authors reported that there are exceptions to the extremities as ears, head, tail, neck and limbs.

One of the pioneering studies of the microstructure of the hair was performed by HAUSMAN (1920), whose aim was to verify the authenticity of the fibers used in fur coats. After this work, several other studies on the microstructure of the hair have been carried out in taxonomic, ecological, paleontological and forensic researches, producing keys of identification for different species (MAYER, 1952; DREYER, 1966; KEOGH, 1979; MENG & Wyss, 1997; FERNÁNDEZ & ROSSI, 1998; AMMAN et al., 2002; LUNGU et al., 2007; SAHAJPAL et al., 2009; QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2010; SATO et al., 2010; ABREU et al., 2011; ANWAR et al., 2012). Although there are numerous studies, this technique is still not exploited in agriculture.

According to BARKER (1999) the goal of conservation is to maintain the maximum genetic diversity of each species, the conservation of diversity within species. Therefore, studies of phenotypic and genetic characterization are key to conservation programs of animal genetic resources (AnGR), because they allow previous identification of populations isolated in their environment for a long time (MARIANTE et al., 2009).

#### Method of trichological analysis

The following method of trichological analysis was recommended by QUADROS & MONTEIRO-FILHO (2006b).

#### Material collection

One must obtain a sample, directly with fingers, of the region of the intersection of the median line with the line of the girdle on the back of the specimen to be studied. After that, the guard coat containing the bulb and the apex must be separated, with the aid of a magnifying glass, if necessary, and washed in ethanol and dried in commercial paper towel.

#### Preparation of slides for cuticular print observation

After washing and subsequent drying of the hair on paper, a thin layer of colorless nail polish must be spread on a clean glass slide. The hair is placed on a blade after the nail polisher dries at room temperature for 15 to 20 minutes. The slide containing the hair must be placed on a

piece of wood and covered with another coating with transparent tape forming a sandwich. The assembly must be pressed by a vise or a rectangular arm press; after opening the vise, the slide with the hair must be separated from the rest of the assembly.

After complete drying of the nail polisher, around 30 minutes, the hair is removed by the distal end, by gently rubbing with a fingertip, producing cuticle prints (outer layer of the hair), which should be stored and protected from dust for subsequent observation under optical microscope. Drying times referred to are variable according to the humidity and temperature at the moment and location of slide preparation.

#### Preparation of slides for medulla observation

The hair that was removed from the cuticular print slide is placed in commercial, 30-volume hydrogen peroxide cream, of cosmetic use, for 80 minutes. Thick hair is cut in the shield one to three times for that step. After that, it is washed in water and dried on paper towels.

Then, the permanent slides are mounted, with transparent synthetic mounting medium and coverslip or temporary slides, with water or glycerol and coverslips. The reading of the microscope slides should be performed under light microscopy, with an increase of 100x to 400x, depending on the size of the hair, because it is necessary that the entire thickness of the hair fits within the visual field.

#### Morphological patterns of hair microstructure

The first work that developed a naming system for 166 species was HAUSMAN (1920). It provides the diagnosis of eight cuticle patterns and eight medulla patterns for these species. Other studies have been carried out in various regions of the world; however, these patterns are often difficult to interpret due to the lack of a standardized nomenclature and descriptors accompanied by illustrations. Only in 2006 a study was conducted in Brazil (QUADROS & MONTEIRO-FILHO, 2006a), describing the morphology and microstructure of the hair cuticle and medulla of 64 mammal species found in Brazil with classification and taxonomy in Portuguese.

### Cuticular patterns

QUADROS & MONTEIRO-FILHO (2006a) defined 15 cuticular patterns (Figure 3) through a combination of six characters: edges overlapping, scales shape, scales size, scales orientation, scales ornamentation and continuity of scale margins.

### Medullary patterns

QUADROS & MONTEIRO-FILHO (2006a) defined 17 medullary patterns using six different characters (figure 3), as follows: presence of medulla, continuity, number of rows of cells, cells arrangement, cell shape and ornamentation of the margin.

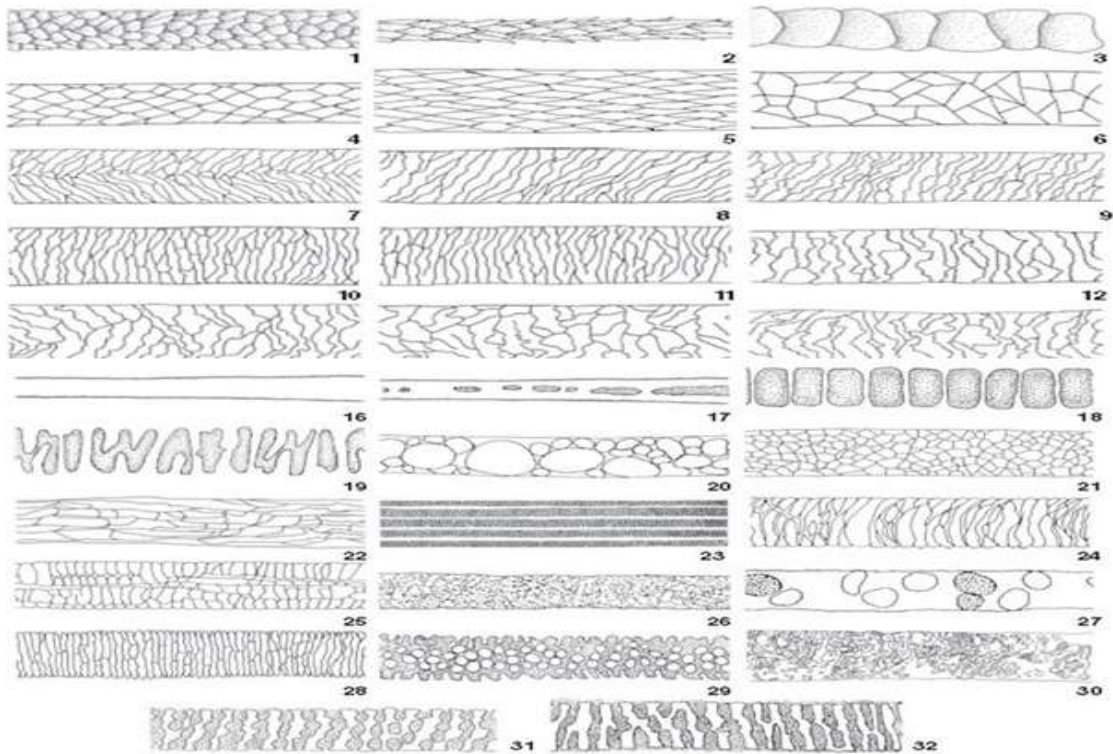
### Morphometric patterns of the hair microstructure

The use of computer techniques in trichology pattern recognition provides a means to reduce the subjectivity of the conventional process, since manual techniques rely on the interpretation of an expert instead of mathematics quantitative measurements (VERMA et al., 2002; MOYO et al., 2006). Another key steps are the use of digital imaging in the identification of specific taxonomic characteristics (STRAVISI, 2007), and measurements of the statistical parameters that describe these characters and the relationships among them (VALENTIN et al., 1994; STRAVISI, 2007). MOYO et al. (2006) conducted the first study of classification of trichology patterns of African mammals through the application of pattern recognition techniques to hair scales, as detailed below.

### Methodology description

The methodology described below was defined by STRAVISI (2007). Each hair is photographed from the slide by a digital camera attached to the microscope. Digital photography allows enlarging the image, then increasing the contrast working directly on the image (BAYER et al., 2001; STRAVISI, 2007).

The reading of microscope slides should be performed under light microscopy, with an increase of 100 to 400x, depending on the hair dimension, because it is necessary that the entire thickness of the hair fits within the visual field. Subsequently, microscopy images are obtained in two distinct zones of the hair on each blade: on the distal third of the shaft and on the thicker part of the hair (STRAVISI, 2007).



**Figure 3-** Cuticular patterns of the shaft of 64 Brazilian mammal species (1) large leafy shape; (2) narrow leafy shape; (3) conoid shape; (4) large rhombus; (5) narrow rhombus; (6) mosaic; (7) double oblique wavy shape; (8) simple oblique wavy shape; (9) simple oblique wave shape with scales with ornamented edges; (10) transverse wavy shape; (11) transverse wavy shape with scales with incomplete edges; (12) transverse wavy shape with scales with ornamented edges; (13) irregular wavy shape; (14) irregular wavy shape with scales with incomplete edges; (15) irregular wavy shape with scales with ornamented edges. Medullary patterns of the shield of 64 Brazilian mammal species (16) absent; (17) discontinuous; (18) uniseriate ladder; (19) diagonal uniseriate; (20) anisocellular; (21) polygonal; (22) glandular; (23) string shape; (24) spindle shape, (25) corn shape; (26) amorphous; (27) matricial; (28) trabecular; (29) reticular; (30) sieved; (31) alveolar; (32) striped. (Padrões cuticulares do eixo de 64 espécies de mamíferos brasileiros (1) forma grande de folhas; (2) forma de folhas estreitas; (3) forma conóide; (4) grande losango; (5) losango estreita; (6) em mosaico; (7) forma ondulada dupla oblíquo; (8) forma ondulada oblíqua simples; (9) forma de onda oblíquo simples com escalas com bordas ornamentadas; (10) transversal forma ondulada; (11) forma ondulada transversal com escalas com bordas incompletos; (12) forma ondulada transversal com escalas com bordas ornamentadas; (13) forma ondulada irregular; (14) forma ondulada irregular com escalas com bordas incompletos; (15) forma ondulada irregular com escalas com bordas ornamentadas. Padrões medular do protetor de 64 espécies de mamíferos brasileiros (16) ausente; (17) descontínuo; (18) escada uniseriate; (19) uniseriate diagonal; (20) anisocellular; (21) poligonal; (22) glandular; (23) forma cadeia; (24) forma de fuso, (25) a forma de milho; (26) amorfo; (27) matricial; (28) trabecular; (29) reticular; (30) crivado; (31) alveolar; (32) listrado

Source: Quadros and Monteiro-Filho (2006a)

For each hair, four photographs should be selected, two of each zone (shield and shaft). Images must be saved in JPG format with a resolution of 2592x1944 pixels. For image analysis, ImageJ software – Open software should be used. ImageJ provides a rectangular area of regions of interest and this tool can be used to manually sample the scale pattern of the image (MOYO et al. 2006).

The images can be converted to grayscale, to eliminate color effect. If necessary, the image can be improved by brightness and contrast. The software used allows the conversion of pixels to micrometers ( $\mu\text{m}$ ) after setting the scale. Measures should be taken for both cuticular and medullar patterns (STRAVISI, 2007).

For medullary patterns, the total thickness of the hair and the thickness of the medulla must be measured by means of straight lines corresponding to the diameters. As for the cuticular patterns, a freehand drawing of the outline of the cuticle scales must be performed for the measurement of area, perimeter, length, roundness of the shape, among other characteristics (STRAVISI, 2007).

These measurements must be made to obtain the quantitative indices for cuticle, medulla and cortex characteristics. For this design, a graphic tablet (tablet) should be used along with the ImageJ software (STRAVISI, 2007).

#### Applying trichological analysis in agriculture

This type of analysis has been used in conservation programs of native breeds of sheep in Italy in order to ensure the genetic origin of these animals. The studies were conducted by RAZZARA (2009) and TORMEN (2011).

The object of the research conducted by RAZZARA (2009) was to evaluate the genetic purity of six animals (four females and two males) supposedly belonging to Padovana breed, as well as the genetic distance of the individuals.

Therefore, genotypic and phenotypic analyzes of animals were performed and trichological analysis was one of them. To exclude possible contamination of the herd during periods of transhumance, the DNA was compared with the breeds Alpagota, Brogna, Lamon, Foza and Apennine, aiming at validation. The results of the trichological analysis showed that the six animals differed from the breeds to which they were compared. This information was confirmed

by the results of genetic variability, which was very low among the six animals, but high between them and the other breeds.

The objective of Tormen's study (2011) was to determine possible differences among local sheep breeds. In the case of unidentified populations of the genus *Ovis*, the use of dichotomous keys based only on analyzes of trichological sections can induce to errors.

For this reason, morphometric patterns of the four native Italian breeds, Alpagota, Brogna, Lamon and Foza, and the not regional breed, Appenninica were used. The results showed that the medians of the examined areas (cuticle and medulla) were statistically different, and the Appenninica breed differed the most from the other breeds ( $p < 0.01$ ). Thus, it was concluded that the method is feasible for the characterization of sheep breeds with the potential benefit for local mammal populations. In Brazil, a team of researchers from the Federal University of Goiás, Embrapa Pantanal and Embrapa Beef Cattle joined with researchers from the University of Padova in Italy in order to perform the morphological characterization of local Brazilian cattle breeds: Caracu, Curraleiro, and Pantaneiro and Nellore, through trichological morphometry. Currently, similar studies are not known in Brazil and it is expected to provide a quick and inexpensive technique for implementing racial identification of these animals helping the conservation efforts of those locally adapted breeds.

## CONCLUSION

Qualitative and quantitative phenotypical and genetical characterization of animal breeds is of great importance to maintain the diversity of species, because it facilitates the selection process of specific characteristics inside herds and breeds. The reviewed technique is easy, reliable and economically applicable, demonstrating the feasibility of developing projects that search for species or racial identification. Studies of this nature are fundamental to animal improvement and open perspectives for research in specific areas of animal production, mainly in herds participating in conservation programs and origin certification processes, as well as other sorts of economic interests such as new materials with functional applicability.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CNPq, CAPES, FUNDECT, Rede Pró Centro Oeste, EMBRAPA Pantanal and UFG for their support.

## REFERENCES

- Abreu, M.S.L.; Christoff, A.U. and Vieira, E.M. 2011. Identificação de marsupiais do Rio Grande do Sul através da microestrutura dos pelos-guarda. *Biota Neotrop*, 11: 1-10.
- Amman, B.R.; Owen, R.D. and Bradley, R.D. 2002. Utility of hair structure for taxonomic discrimination in bats, with an example from the bats of Colorado. *Occass Pap*, 216, 1-16.
- Anwar, M.B.; Nadeem, M.S.; Beg, M.A.; Kayani, A.R. and Muhammad, G. 2012. A photographic key for identification of mammalian hairs of preyspecies in snow leopard (*Panthera uncia*) habitats of Gilgit-Baltistan Province of Pakistan. *Pak J Zool*, 44: 737-743.
- Bayer, M.M.; Droop, S.J.M., and Mann, D. G. 2001. Digital microscopy in phycolgical research, with special reference to microalgae. *Physiol Res*, 49: 263-274.
- Barker, J.S.F. 1999. Conservation of livestock breed diversity. *Agri*, 25: 33-43.
- Chernova, O.F. 2002. Architectonic and diagnostic significance of hair cuticle. *Biol Bull*, 29: 238-247.
- Chernova, O.F. 2003. Architectonic and diagnostic significance of hair cortex and medulla. *Biol Bull*, 30: 53-62.
- Day, M.G. 1966. Identification of hair and feather remains in the gut and faeces of stoats and weasels. *J Zool*, 148: 201-217.
- De Marinis, A.M. and Asprea A. 2006. Hair identification key of wild and domestic ungulates from southern Europe. *Wildlife Biol*, 12: 305-320.
- Dreyer, J.H. 1966. A study of hair morphology in the family Bovidae. *Onderstepoort J Vet*, 33: 379-472.
- Fernández, G.J. and Rossi, S.M. 1998. Medullar type *Archivos de zootecnia vol. 63 (R), p. 115*. Tricology for identifying mammal species and breeds and cuticular scale patterns of hairs of rodents and small marsupials from the monte Scrubland (San Luis Province, Argentina). *Mastozool neotrop*, 5: 109-116.
- Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. 2003. Tratado de histologia em cores. 2.ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 472 pp.
- Hausman, L.A. 1920. Structural characteristics of the hair of mammals. *Am Nat*, 54: 496-523.
- Ingberman, B. and Monteiro Filho, E.L.A. 2006. Identificação microscópica dos pelos das espécies brasileiras de *Alouatta lacépède*, (Primates, Atelidae, Alouattinae). *Arq Mus*, 64: 61-71.

- Keogh, H.J. 1979. An atlas of hair from southern African mammal species with reference to its taxonomic and ecological significance.(PhD Thesis). Pretoria. Republic of South Africa. Faculty of Science University of Pretoria.
- Keogh, H.J. 1983. A photographic reference system of the microstructure of the hair of southern African bovids. *S Afr J Wildl Res*, 13: 89-132.
- Kuhn, R. A. 2009. Comparative analysis of structural and functional hair coat characteristics, including heat loss regulation, in the Lutrinae (Carnivora:Mustelidae). (PhD Thesis). Hamburg. Germany.Fakultät für Mathematik. Informatik und Naturwissenschaften.Universität Hamburg.225 pp.
- Lungu, A.; Recordati, C.; Ferrazzi, V. and Gallazzi D.2007. Image analysis of animal hair: morphological features useful in forensic veterinary medicine. *Lucrari Stiin Med Vet*, 40: 439-446.
- Mariante, A.S.; Albuquerque, M.S.M.; Egito, A.A.,Mcmanus, C.; Lopes, M.A. and Paiva, S. R. 2009.Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. *Livest Sci*, 120: 204–212.
- Martin, O.S.; Gheler-Costa, C. and Verdade, L.M,2009. Microestruturas de pelos de pequenos mamíferos não-voadores: chave para identificação de espécies de agroecossistemas do estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotrop*, 9: 233-241.
- Mayer, W.V. 1952. The hair of California mammalswith keys to the dorsal guard hairs of California mammals.*Am Midl Nat*, 48: 480-512.
- Meng, J. and Wyss A.R. 1997. Multituberculate and other mammal hair recovered from palaeogene excreta. *Nature*, 385: 712-714.
- Meyer, W.; Schnapper, A. and Hülmann, G. 2002.The hair cuticle of mammals and its relationship to functions of the hair coat. *J Zool*, 256: 489-494.
- Moyo, T.; Bangay, S. and Foster G. 2006. The identification of mammalian species through the classification of hair patterns using image pattern recognition. In: IV International Conference on Virtual Reality, Computer Graphics, Visualization and Interaction in Africa. Cape Town. South Africa. Anais eletrônico... [online].pp. 177-181. Available from: <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1108590.1108619> (13/08/2013).
- Pech-Canché, J.M.; Sosa-Escalante, J.E. and Cruz,Y.M.E.K. 2009. Guía para la identificación de pelos de guardia de mamíferos no voladores del Estado de Yucatán, México. *Rev Mex Mastozool*, 13: 7-33.
- Quadros, J. and Monteiro-Filho, E.L.A. 1998. Effects of digestion, putrefaction and taxidermy processes on *Didelphis albiventris* hair morphology.*J Zool*,224: 331-334.

- Quadros, J. and Monteiro-Filho, E.L.A. 2006a. Revisão conceitual, padrões microestruturais e proposta nomenclatória para os pelos-guarda de mamíferos brasileiros. *Rev Bras Zool*, 23:279-296.
- Quadros, J. and Monteiro-Filho, E.L.A. 2006b. Coleta e preparação de pelos de mamíferos para identificação em microscopia óptica. *Rev Bras Zool*, 23: 274-278.
- Quadros, J. and Monteiro-Filho, E.L.A. 2010. Identificação dos mamíferos de uma área de floresta atlântica utilizando a microestrutura de pelos-guarda de predadores e presas. *Arq Mus Nacional*, 68: 47-66.
- Razzara, E. 2009. Caratterizzazione fenotipica e genotípica di razze ovine. (PhD Thesis). Padua, Italia. Faculty of Agraria. University of Padua. 83 pp.
- Riggott, J.M. and Wyatt, E.H. 1980. Scanning electron microscopy of hair from different regions of the body of the rat. *J Anat*, 130:121-126.
- Sato, I.; Nakaki, S.; Murata, K.; Takeshita, H. and Mukai, T. 2010. Forensic hair analysis to identify animal species on a case of pet animal abuse. *Int J Legal Med*, 124: 249-256.
- Sahajpal, V.; Goyal, S.P.; Thakar, M.K. and Jayapal, R. 2009. Microscopic hair characteristics of a few bovid species listed under Schedule-I of Wildlife (Protection) Act 1972 of India. *Forensic Sci Int*, 189: 34-45.
- Stravisi, A. 2007. Uso del pelo nel monitoraggio dei grandi carnivori. (PhD Thesis) Udine, Italia. Faculty of Veterinary. Università degli Studi di Udine. 111 pp.
- Teerink, B. J. Hair of west European mammals: atlas and identification. Cambridge: Cambridge University Press. 1991. 224 p.
- Tormen, N. 2011. The trichological analysis in the study of local sheep breeds. XIX Congress Animal Science and Production Association (ASPA), Cremona, Anais... *Ital J Anim Sci*, 10: 37. [http://aspa2011.entecra.it/ASPA\\_2011\\_book\\_low%20testi.pdf](http://aspa2011.entecra.it/ASPA_2011_book_low%20testi.pdf) (13/08/2012).
- Valentin, D.; Abdi, H.; O'Toole, A.J. and Cottrell, G.W. 1994. Connectionist models of face processing: a survey. *Pattern Recogn*, 27: 1209-1230.
- Vanstreels, R.E.T.; Ramalho, F.P. and Adania, C.H. 2010. Microestrutura de pelos-guarda de felídeos brasileiros: considerações para a identificação de espécies. *Biota Neotrop*, 10: 333-337.
- Verma, M.S.; Pratt, L.; Ganesh, C. and Medina, C. 2002. Hair-MAP: a prototype automated system for forensic hair comparison and analysis. *Forensic Sci Int*, 129: 168-186.

## CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO RACIAL DE BOVINOS POR MEIO DE ANÁLISE TRICOLÓGICA<sup>1</sup>

### Resumo

**Antecedentes:** Uma alternativa que pode se tornar viável para a caracterização racial no contexto produtivo é a tricologia ou análise tricológica. Além de se mostrar eficiente na diferenciação de espécies essa técnica apresenta baixo custo na execução. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de realizar a caracterização morfológica de pelos das raças bovinas brasileiras *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, por meio de morfometria tricológica, a fim de avaliar a possibilidade de uso desta técnica como marcador racial.

**Métodos:** Foram utilizados 40 indivíduos adultos de ambos os sexos pertencentes a quatro raças bovinas (Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Nelore e Pantaneiro), totalizando 160 indivíduos. Análises morfológicas e morfométricas dos pelos guarda foram realizadas para caracterização racial dos bovinos. Na primeira avaliação, em cinco pelos de cada animal, foram observados o padrão cuticular na haste e o padrão medular no escudo. Na segunda avaliação foram medidas seis secções de 50 µm de comprimento do pelo na região haste para se obter o perímetro e a área das escamas cuticulares. No escudo foram considerados seis índices de diâmetro medular (DM), seis índices de córtex-medular (CM) e seis índices de diâmetro do pelo (DP). A caracterização genética dos bovinos para validação do método foi realizada por meio do uso de marcadores moleculares microssatélites. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2002) e o software R versão 3.2.4 (2016).

**Resultados:** A partir dos resultados obtidos pela análise tricológica e análise genética dos bovinos (proporção de indivíduos classificados corretamente dentro de cada raça), foram geradas duas matrizes para verificar se os resultados dos diferentes métodos possuíam associação entre si. O resultado para o teste de Correlação de Pearson demonstrou que houve uma alta correlação positiva e significativa entre as matrizes ( $r = 0,996$  e  $p < 0,001$ ).

**Conclusão:** A análise tricológica é um método útil para identificação racial de bovinos. Seu potencial de utilização para outras espécies de mamíferos de interesse para produção animal deve ser estudado uma vez que trata-se de um método simples, de baixo custo e não invasivo.

### Introdução

A demanda por produtos de origem animal cresce significativamente ao longo dos anos e a previsão é aumentar ainda mais, influenciando a concorrência por recursos e o crescimento da produtividade e da eficiência dos sistemas pecuários. Os recursos genéticos animais (RGA),

---

<sup>1</sup>Formatado de acordo com as normas da Revista Genetics Selection Evolution

representados pelos diferentes rebanhos, são essenciais para a segurança alimentar mundial, assim como para conservação dos diferentes meios de subsistência [1].

No Brasil, os bovinos locais também conhecidos como naturalizados ou crioulos, embora sejam considerados menos produtivos em determinadas condições, apresentam características únicas tanto de rusticidade quanto de adaptação que podem ser necessárias para assegurar o potencial de adaptação das raças às exigências do futuro. Experiências relacionadas à indicação dos produtos pela área geográfica observadas na Europa são listadas como exemplos de políticas para o aumento da competitividade de produtos originados de raças locais, enfatizando a sua diferenciação e a qualificação da produção [2].

Um passo importante para a conservação de um recurso genético animal é a caracterização destas raças que do ponto de vista zootécnico, servirá para elucidar questões importantes relacionadas à sua rusticidade, prolificidade, resistência e adaptação às condições adversas que justificam os programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento animal [3]. Várias são as técnicas disponíveis para a caracterização fenotípica e genética de animais, embora somente um limitado número seja rotineiramente utilizado para os animais de interesse zootécnico.

O uso de marcadores moleculares tem revolucionado a nossa capacidade para caracterizar a variação genética [4]. Entretanto, um fator limitante, principalmente em programas de conservação *in situ* de raças locais são os altos custos de manutenção e avaliação, principalmente as relacionadas com o uso de marcadores genéticos [5].

Uma alternativa viável para a caracterização racial no contexto produtivo é a tricologia ou análise tricológica. Essa técnica é eficiente na diferenciação de espécies e apresenta baixo custo de execução. A identificação de mamíferos por meio das características microscópicas de seus pelos é possível com a utilização de várias técnicas sendo que com duas delas, a análise dos padrões microestruturais das escamas cuticulares e a análise das células medulares de pelos guarda, é

possível a identificação de ordem, família, gênero e espécie, dependendo do detalhamento da análise realizada [6]. Outro método proposto utilizando a análise dos padrões microestruturais dos pelos trata-se da comparação das características da superfície em relevo das microestruturas morfométricas dos mesmos, concentrando-se nas formas cuticular e medulares [7].

Não foram encontrados na literatura estudos que envolvessem as características microestruturais dos pelos para diferenciação de raças, bem como o uso da morfologia em conjunto com a morfometria dessas estruturas para tais fins. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo identificar as raças bovinas Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro (*Bos taurus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*), por meio da morfologia e morfometria tricológica, bem como validar a técnica comparando com resultados da caracterização genética.

## **Metodologia**

O presente trabalho consistiu da avaliação de características microestruturais morfológicas e morfométricas de pelos guarda de 40 animais de quatro raças bovinas, as localmente adaptadas Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e uma zebuína, o Nelore, provenientes de rebanhos de diferentes regiões geográficas, totalizando 160 indivíduos adultos de ambos os sexos. Os animais da raça Nelore foram utilizados para permitir a comparação entre raças localmente adaptadas (*Bos taurus taurus*) e a raça zebuína (*Bos taurus indicus*).

Os pelos dos bovinos Caracu e Nelore foram provenientes do rebanho do Campo Experimental da Embrapa Gado de Corte – Campo Grande/MS. Os pelos dos bovinos Curraleiro Pé-Duro foram colhidos de animais provenientes do Núcleo de Conservação da Fazenda Florzeira localizada no município de Campestre – GO. Para os bovinos Pantaneiro os pelos foram coletados de três núcleos de conservação da raça sendo um localizado na fazenda Nhumirim da Embrapa Pantanal – Corumbá/MS, um no município de Rochedo/MS e outro no município de Poconé/MT.

As amostras de pelos foram retiradas manualmente, utilizando-se luvas de látex, da região entre escápulas dos animais, ou seja, na intersecção da linha mediana longitudinal do corpo com a linha das escápulas, no dorso dos espécimes. Foram retirados centenas de pelos que foram armazenados em envelopes de papel pequenos, rotulados com dados referentes à espécie, o local e a data da colheita bem como, o sexo dos indivíduos. As amostras ficaram armazenadas à temperatura ambiente no banco de amostras da Rede Pró-Centro Oeste: Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro, localizado na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

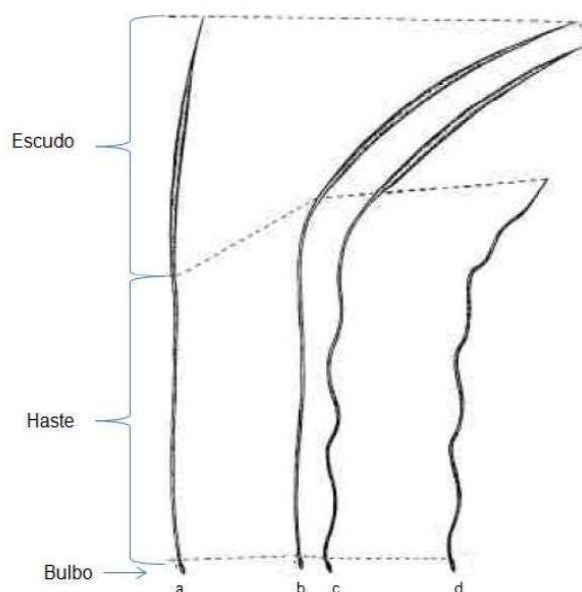
Preparo das lâminas para observação do decalque cuticular e para observação da medula

De cada indivíduo amostrado foram separadas subamostras até serem obtidas lâminas com boa qualidade para análise de cinco pelos guarda de cada animal. Foram utilizados pelos pertencentes ao grupo dos pelos guarda os que apresentavam ao longo de seu comprimento, duas porções principais: a haste e o escudo (Figuras 1 e 2).

Para preparação das lâminas, foram considerados somente pelos que continham bulbo e ápice. Todos os pelos foram dispostos na lâmina na mesma direção, ou seja, com o bulbo voltado para o mesmo lado, para manter um padrão e facilitar leitura. As lâminas foram confeccionadas no laboratório de tricologia da Embrapa Pantanal e no laboratório de Anatomia e fisiologia do Departamento de Biomedicina Comparada e Alimentação – BCA na Universidade de Padova - Itália.

Os procedimentos utilizados na preparação de lâminas para visualização de medula e impressões cuticulares seguem a descrição de Felix et al. [8] e Quadros e Monteiro-Filho [9] com pequenas adaptações. A lavagem dos pelos em álcool comercial e detergente foi feita utilizando um agitador magnético (Figura 3). Após a lavagem, os pelos foram secos em papel absorvente.

Sobre uma lâmina microscópica de vidro, limpa, espalhou-se uma fina camada de esmalte para unhas, incolor. Após a secagem do esmalte em temperatura ambiente por 20 minutos após, os pelos foram colocados gentilmente sobre a camada de esmalte.



**Fig.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 [10]



**Fig.2** Estrutura esquemática de um pelo guarda. Fonte: [3]

Para realizar a impressão da cutícula no esmalte, colocou-se a lâmina contendo os pelos entre dois pedaços de madeira, previamente revestidos com isopor e fita adesiva transparente, formando um sanduíche. O conjunto foi pressionado em uma morsa e assim permaneceu até a confecção da próxima lâmina (Figura 4).



**Fig.3** Lavagem de pelos guarda utilizando agitador magnético



**Fig.4** 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) que são impressos no esmalte

Depois de aberta a morsa, a lâmina com os pelos foi separada do resto do conjunto e os pelos removidos pela extremidade distal, conforme descrito por Quadros & Monteiro-Filho [9]. As lâminas, contendo o decalque da cutícula, devidamente identificadas foram guardadas à temperatura ambiente, para posterior observação em microscópio óptico.

Para observação medular, os pelos retirados da lâmina de decalque cuticular foram colocados em uma mistura de água oxigenada cremosa 30 volumes e pó descolorante, ambos de uso cosmético, por 40 minutos. Em seguida os pelos foram lavados em álcool e posteriormente em água sendo finalmente secos em papel absorvente [8].

Após a lavagem, antes de serem colocados sobre uma lâmina microscópica de vidro, os pelos ficaram imersos em óleo mineral durante 10 minutos, conforme metodologia adaptada de Tormen [7]. Verificou-se que esse procedimento facilitou o preenchimento dos espaços medulares que contém ar, melhorando a refração e a visualização das estruturas. As lâminas permanentes foram montadas com uso de óleo de cedro para microscopia e lamínula.

#### Análise morfológica e morfométrica do pelo

As seções das imagens dos pelos foram estudadas e adquiridas digitalmente por meio do uso de microscopia óptica sem distorções (microscópio Nikon modelo: Eclipse E200, nº de série: 110560 na Embrapa Pantanal e microscópio Leica, modelo DMR DFC480® no Departamento de Biologia da Universidade de Padova - Itália), com ocular de 10.0 x e objetivas de 20.0 e 40.0 x e luz transmitida sem filtragem. Imagens digitais em alta qualidade (resolução 2048 x 1536 pixels) das seções identificadas foram obtidas com o uso de câmera digital com a ajuda de dois softwares de captura Motic Images Plus® 2.0 ML e Leica IM500 Image Manager®. As imagens fotográficas foram analisadas no microscópio em aumento de 200 e 400 x para coincidir com a análise bidimensional, visando abranger toda a espessura do pelo no campo visual (Figura 5).



**Fig.5** Leitura e análise das lâminas microscópicas

O padrão cuticular na haste, composto por seis caracteres das escamas (imbricamento das bordas, forma, dimensão, orientação, ornamentação das bordas e continuidade das bordas) totalizando 15 padrões; e o padrão medular no escudo, com seis caracteres (presença, continuidade, número de fileiras de células, disposição das células, ornamentação da margem e forma das células da medula, totalizando 17 padrões, conforme descrito por Quadros &Monteiro-Filho [11].

Estruturas celulares encontradas no interior da medula, denominadas de vacúolos, foram importantes para diferenciação das raças. Para isso foi realizada a contagem da presença dessas células no interior medular em uma faixa de 300  $\mu\text{m}$  ao longo dos pelos, os quais foram classificados em função do número de vacúolos: acima de 11 vacúolos/300 $\mu\text{m}$  “presença acentuada de vacúolos”; abaixo de 11 vacúolos/300 $\mu\text{m}$  “presença moderada de vacúolos” e quando essa característica não estava presente “ausente”. Essas informações, posteriormente foram transformadas em dados quantitativos por meio de escores para serem avaliados em conjunto com os dados morfométricos visando à discriminação do padrão das diferentes raças.

Para reduzir a subjetividade do processo convencional da análise morfológica das microestruturas dos pelos, para cada área avaliada (haste e escudo) foram realizadas medidas a fim de avaliar comparativamente a variação de características morfométricas dos pelos entre as raças. Para cada pelo considerado foram selecionadas duas fotografias, sendo uma para escudo e outra para haste. As imagens foram gravadas em formato JPG.

Para a análise das imagens, utilizou-se o software livre “ImageJ - Open software” - *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA, (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O programa permite a conversão de pixels para unidades de medida utilizando lâmina padrão, no caso desse experimento utilizou-se a unidade micrômetro ( $\mu\text{m}$ ).

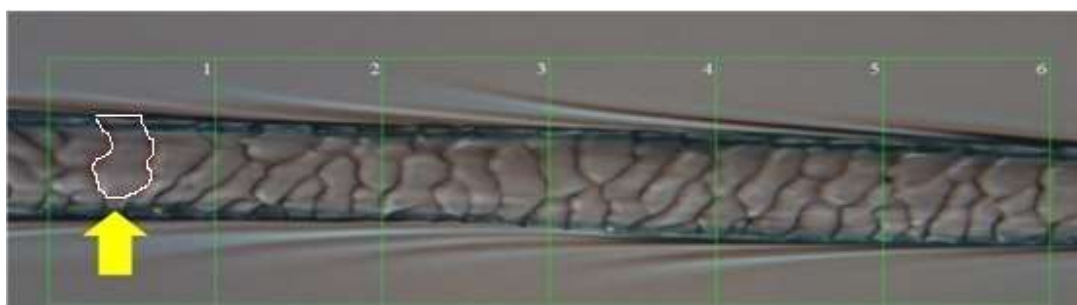
As fotografias foram convertidas em tons de cinza para eliminar o efeito de cor, em particular nas impressões cuticulares onde é relevante que o contorno das escamas individuais seja bem definido, a fim de tornar possível o processamento posterior de imagem [7]. A melhoria da imagem, portanto, só foi realizada se necessária, visando eliminar artefatos e destacar as estruturas a serem mensuradas [7,12].

Para as medidas dos padrões cuticulares dos pelos na haste com uso do software ImageJ, foi considerada a metodologia descrita por Tormen [7] com algumas adaptações (Figura 6). O método consiste em dividir a haste do pelo em seis secções de  $50 \mu\text{m}$  no sentido do comprimento do pelo, para obtenção de medidas das características quantitativas de escamas da cutícula reconhecidas de forma completa ou parcial.

Para cada estrutura reconhecida foram efetuadas medidas de perímetro e área, em  $\mu\text{m}$  e  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente. As distorções devido à análise da estrutura 3D como uma superfície bidimensional foram consideradas uniformes para todas as amostras.

Tormen [7] relata que partindo do pressuposto de que há relações métricas entre a área e o perímetro de uma forma geométrica (embora não regular), é possível utilizar um novo valor

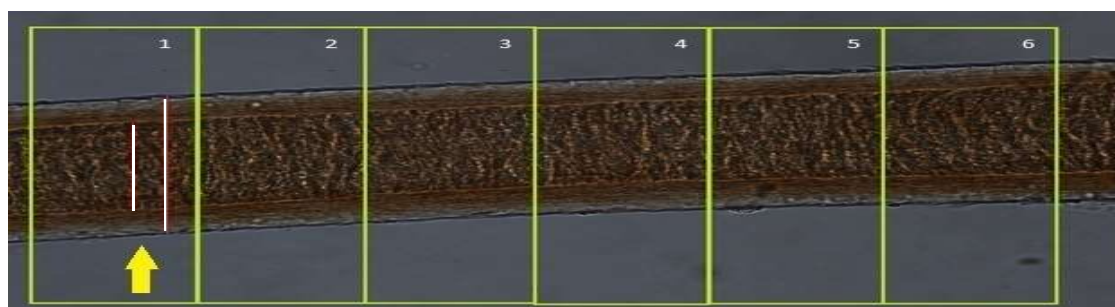
derivativo da área e do perímetro na forma de índice (EC). No presente trabalho utilizou-se a fórmula  $EC = \text{área} / \text{perímetro}^{0.5}$ . Essa transformação foi realizada a fim de se obter uma normalização na distribuição dos dados (fator de correção dos dados).



**Fig.6** Esquema indicando os locais de medidas de escamas cuticulares de pelos guarda. Em branco destaque do perímetro de uma das escamas da cutícula

Para as medidas dos padrões medulares no escudo seguiu-se a metodologia descrita por Tormen [7] adaptada por Felix et al. [8]. Após a calibração do software, foram efetuadas medidas para se obter a área ( $\mu\text{m}^2$ ). Foram medidas seis vezes características de medula e de córtex medular de cada pelo: diâmetro medular (DM) córtex-medular (CM) e diâmetro do pelo (DP).

Tanto para as medições de cutícula quanto de medula, os pelos foram colocados na lâmina com a parte distal voltada para a esquerda do operador e as avaliações sempre ocorreram da esquerda para a direita (Figura 7).



**Fig.7** Esquema indicando os locais onde foram tomadas medidas da medula, considerando as seis seções de 50  $\mu\text{m}$  de comprimento do pelo

## Caracterização genética

Com finalidade de validar o método de análise tricológica de pelos guarda foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Aplicada da Empresa Animal Breeding Consulting S.L. (ABC S.L) da Universidade de Córdoba na Espanha, a caracterização genética de 155 bovinos dos 160 utilizados neste estudo. Essa análise foi realizada a partir de DNA extraído do bulbo dos pelos dos indivíduos das raças Caracu (n=37), Nelore (n=40), Curraleiro Pé-Duro (n=39) e Pantaneiro (n=39).

Foram utilizados 16 marcadores de microssatélites dinucleotídeos escolhidos a partir da lista do projeto BIOBOVIS, sendo estes: BM1314, BM1818, BM1824, BM2113, CRSM60, ETH003, ETH010, ETH185, ETH225, ILSTS006, INRA023, INRA063, SPS115, TGLA122, TGLA126 e TGLA227. A caracterização genética foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) e reações multiplex.

O DNA das amostras de pelos foi extraído utilizando resina Chelex®, de acordo com a metodologia descrita por Walsh et al. [13]. Fragmentos obtidos por PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando um sequenciador automático ABI377XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As análises de separação dos fragmentos e classificação alélica foram feitas por meio do uso dos programas de computador GENESCAN ANALYSIS 3.1.2 e GENOTYPER® 2.5.2, respectivamente.

A finalidade maior desta análise foi verificar se os indivíduos seriam alocados de acordo com a raça ao qual eles pertenciam e no final comparar com os dados tricológicos. É válido ressaltar que para essa comparação utilizou-se os resultados tricológicos somente dos 155 bovinos analisados geneticamente. As condições de corridas eletroforéticas foram propostas levando em consideração este aspecto. Assim, foram realizadas 10 replicações para cada K (1 a 4), sob o

modelo de coancestria (*admixture model*) e correlação das frequências alélicas entre as subpopulações.

Foram determinados 50.000 ciclos de *burn-in* e 500.000 de iterações na cadeia MCMC. A escolha do melhor K obtido com o método de Evanno [14] foi feita utilizando o programa STRUCTURE HARVESTER 0.6.94 [15] gerando um gráfico, a partir das análises realizadas no programa. Os arquivos para escolha do melhor K foram analisados no programa CLUMPP 1.1.2 [16] e posteriormente verificados no programa DISTRUCT 1.1 [17] para a adequação do gráfico populacional, gerado no programa STRUCTURE [14].

#### Análise estatística

O desenho experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para testar o efeito fixo de raça sobre as medidas morfométricas das microestruturas dos pelos realizou-se análise de variância utilizando o procedimento PROC GLM. Os valores médios, coeficientes de variação, desvios padrão foram obtidos utilizando o procedimento LSMEANS, sendo as diferenças estatísticas testadas pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para a análise multivariada foram utilizadas nove variáveis sendo seis extraídas dos dados morfométricos (Área, Perímetro, EC, DP, DM e CM) e três dos dados morfológicos, (ORT\_CUT = orientação da cutícula, LG\_MD = largura da medula e VAC = presença de vacúolo). Essas variáveis foram utilizadas para descrever as microestruturas dos pelos guarda e com isso realizar a caracterização tricológica de cada amostra estudada. Somente os caracteres morfológicos que apresentaram diferenças nos padrões avaliados foram utilizados na análise multivariada. Para isso, primeiramente, as informações morfológicas foram transformadas em dados quantitativos por meio de escores (0, 1, 2, 3...) para serem analisadas em conjunto com os dados morfométricos visando à

discriminação do padrão das diferentes raças. É válido ressaltar que as análises conjuntas de informações morfométricas e morfológicas foram reportadas como “análise tricológica”.

O pacote estatístico *vegan*, foi utilizado para visualização das relações entre as diferentes características microestruturais dos pelos guarda com uso de uma análise de componentes principais (PCA). Análise discriminante linear por meio do procedimento PROC DISCRIM foi utilizada para verificar a capacidade da metodologia tricológica para discriminar as raças bovinas e a proporção de indivíduos classificados dentro de cada grupo racial obtida com a análise tricológica foi comparada à proporção de animais identificados para cada raça através da análise de estrutura genética da população.

Foi avaliada a correlação entre a matriz de resultados da análise discriminante tricológica e a matriz de resultados da análise de estrutura genética das populações. A associação entre as duas matrizes foi estimada por meio do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) adotando a distância euclidiana com dados padronizados, como medida de dissimilaridade. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa computacional Statistical Analysis System [18] e o software R versão 3.2.4 [19].

## **Resultados e discussão**

Por meio da combinação dos seis caracteres descritos por Quadros & Monteiro-Filho [11], foram definidos os padrões das escamas cuticulares dos animais, conforme detalhados no Quadro 1.

De forma geral, quanto ao imbricamento das bordas das escamas, o padrão observado para todas as raças foi sempre o pavimentoso que é composto por escamas cuticulares que não apresentam bordas livres e onde não há sobreposição entre as bordas das escamas adjacentes. Segundo Quadros & Monteiro Filho [11] esse tipo de padrão assemelha-se a ladrilhos no assoalho ou azulejos na parede.

Analisando a forma das escamas o padrão encontrado foi o ondeado para todas as raças. Nesse tipo de padrão, a escama não apresenta ângulos definidos, seu contorno é em formato de ondas e compõe um conjunto de transições suaves entre saliências e reentrâncias de profundidades variáveis [11]. Esse tipo de padrão condiz com o descrito por Sahajpal et al. [20] para *Bos taurus* e *Bos gaurus*.

**Quadro1 Sinopse dos padrões cuticulares encontrados para a caracterização morfológica dos bovinos locais brasileiras (*Bos taurus taurus*) e Nelore (*Bos taurus indicus*)**

<b>CUTÍCULA</b>				
<b>Imbricamento das bordas das escamas</b>	<b>Forma das escamas</b>	<b>Orientação das escamas</b>	<b>Ornamentação das bordas das escamas</b>	
Imbricada	Folidácea			
	Conoidal			
Pavimentosa <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>	Losângica			
	Mosaico			
	Ondeada <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>	Oblíqua dupla		
		Oblíqua simples		Lisa
				Ornamentada
		Transversal <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i>		Lisa
				Ornamentada
		Irregular <i>Caracu</i> <i>Nelore</i>		Lisa
	Ornamentada			

Quando avaliadas as características cuticulares relacionadas à “orientação das escamas”, foi possível formar dois grupamentos para os animais, sendo o primeiro formado pelas raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro e o segundo formado por Caracu e Nelore. Dentro do grupamento Curraleiro e Pantaneiro o padrão detectado foi o transversal (Figura 8). Já para Nelore e Caracu o padrão identificado foi o irregular (Figura 9), semelhante ao descrito por Sahajpal et al. [20] para *Bos taurus* e *Bos gaurus*.



**Fig.8** Padrão da cutícula na haste dos bovinos locais brasileiros Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro (ondegado transversal com bordas das escamas lisa)



**Fig.9** Padrão da cutícula na haste do bovino local brasileiro Caracu e o zebuínio Nelore (ondegado irregular com bordas das escamas lisa)

Quadros & Monteiro Filho [11] citam que as escamas de cutícula que apresentam orientação transversal são as escamas que se encontram dispostas transversalmente ao eixo longitudinal do pelo. Miranda et al. [21], relatam que esse tipo de padrão cuticular (ondegado transversal), não pode ser utilizado para diferenciação entre espécies uma vez que o mesmo é comum a diversas ordens de mamíferos. Já no padrão irregular ora as escamas se apresentam na transversal ora oblíquas, e

até mesmo longitudinalmente, ou seja, no sentido do maior eixo do pelo. O tamanho das escamas também pode variar [11].

Embora Keogh [22] e Teerink [23] descrevam em seus estudos quatro tipos de ornamentações para a diferenciação de espécies e Quadros & Monteiro-Filho [11] também cite que ornamentações características podem ser interessantes para este fim, no presente trabalho não foram observadas ornamentações e todas as raças apresentaram as bordas das escamas lisas.

Após a análise de todas as escamas cuticulares dos bovinos estudados (Tabela 1), verificou-se que foram formados dois grupamentos distintos, sendo um grupo formado pelas raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneira e o outro pelas raças Caracu e Nelore. De Marinis & Asprea [24] relatam que o processo de domesticação ocasionou a indução de mudanças em várias das características cuticulares e que a homogeneidade resultante causou o comprometimento na identificação das espécies.

Por se tratar de raças locais brasileiras, seria esperado que houvesse algum tipo de semelhança entre as características estudadas para esse conjunto de raças, como o encontrado em Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro, porém não era esperada semelhança entre *Bos taurus taurus* (Caracu) e *Bos taurus indicus* (Nelore). Não se pode afirmar, mas é provável que em decorrência dos programas de seleção e melhoramento genético impostos aos bovinos da raça Caracu para melhoramento de características relacionadas à produção de carne e leite as mudanças previstas por De Marinis & Asprea [24] possam ter ocorrido com os bovinos desta raça.

Em comparação a outros estudos com bovinos, De Marinis & Asprea [24], analisando vacas (não foi citado a raça estudada), relatam algumas características similares aos padrões observados nesse trabalho. Os autores citam que com relação à posição das escamas, essas se apresentam de forma transversal, com margem distante e escama ondeada irregular. No entanto, existem algumas divergências quanto à nomenclatura utilizada por De Marinis & Asprea [24] e a descrita por

Quadros & Monteiro-Filho [11] trabalho no qual este estudo é embasado. Para Quadros & Monteiro-Filho [11] a orientação das escamas em relação ao pelo guarda pode ser transversal ou irregular, ou seja, as escamas da cutícula não apresentam os dois padrões como sugerem De Marinis & Asprea [24], a não seja em porções diferentes do pelo (haste e escudo, por exemplo).

Verificou-se que para os bovinos deste estudo a distinção das raças em dois grupamentos por meio da avaliação das escamas só se tornou possível pelo fato dos bovinos Curraleiro Pé-Duro e Pantaneiro apresentarem o padrão transversal e o outro grupo Caracu e Nelore um padrão irregular. Não é possível concluir se esse padrão é uma característica mais comum aos bovinos de origem europeia, uma vez que o estudo de De Marinis & Asprea [24] não especifica a raça ou raças utilizadas para representar a espécie bovina uma vez que esse não era o intuito dos autores, e sim diferenciar ungulados selvagens de domésticos pelas características dos pelos.

O padrão morfológico das cutículas aqui estudadas não condiz com as características descritas por Lungu et al. [25]. Esses autores descrevem que para *Bos taurus taurus* as escamas das cutículas apresentam-se achatadas e com imbricamento profundo, dispostas num ângulo oblíquo em relação ao eixo longitudinal do pelo e com margens apresentando um aspecto crenado. Deedrick & Koch [26] também citam as escamas das cutículas de bovinos como sendo imbricadas e sem saliências na haste do pelo.

No que se refere ao padrão medular observado no escudo dos pelos guarda para as raças bovinas brasileiras (Quadro 2), os mesmos já haviam sido descritos por outros autores em estudos visando propostas de nomenclatura [11, 23, 27, 28] bem como, em estudos na área de biologia sobre os hábitos alimentares de carnívoros por meio de análise fecal [24]; na identificação de mamíferos presas e predadores [29]; em estudos de felídeos brasileiros [30]; em estudos de espécies com interesse forense, no controle de qualidade de alimentos [6] e para estudos ecológicos [31].

**Quadro2 Sinopse dos padrões medulares encontrados para a caracterização morfológica dos bovinos locais brasileiras e bovino Nelore**

MEDULA								
Presença de medula	Continuidade da medula	Fileiras de células	Disposição de células	Forma das células	Ornamentação da margem da medula	Presença de vacúolos		
Ausente								
Presente <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> o <i>Nelore</i>	Descontínua							
	Contínua <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>	Unisseriada		Escalariforme				
		Multisseriada <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>	Justapostas		Litrácea			
					Anisocélica	Íntegra		
					Poligonal			
			Isoladas		Glandular			
					Cordonal	Íntegra		
					Fusiforme	Crenada		
					Miliforme	Crespa		
				Anastomosadas <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>		Amorfa	Íntegra	
						Matricial		
					Reticulada	Ondeada		
					Crivada			
					Alveolar	Tracejada		
					Listrada			
			Trabecular <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>				Íntegra	
						Ondeada		
					Fimbriada <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> <i>Pantaneiro</i> <i>Nelore</i>		Acentuada <i>Pantaneiro</i> (Figura 10a)	
							Moderada <i>Caracu</i> <i>Curraleiro</i> (Figura 10b)	
							Sem presença <i>Nelore</i> (Figura 10c)	

Para Chernova [31], os diferentes padrões em que as células medulares se apresentam, podem ser expressões da história evolutiva das espécies. Além disso, Perrin & Campbell [32] e De Marinis & Asprea [24], citam que os fatores ecológicos bióticos e abióticos também desempenham um papel importante na determinação dos padrões morfológicos dos pelos.

De uma forma geral, o padrão descrito para os bovinos Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore foi o contínuo, multisseriado, anastomosado, trabecular com margem fimbriada. A “presença de vacúolos” foi uma característica determinante para diferenciação das

raças bovinas. O mesmo, já havia sido descrito por De Marinis & Asprea [24], entretanto, nesse estudo foi realizada a contagem dessas estruturas celulares, quando as mesmas estavam presentes no interior da medula (Figuras 10a, 10b, 10c).



**Fig.10a** Padrão da medula no escudo do bovino local brasileiro Pantaneiro (contínua, multisseriada, anastomosada, trabecular com margens fimbriada e presença acentuada de vacúolos)



**Fig.10b** Padrão da medula no escudo dos bovinos locais brasileiros Caracu e Curraleiro Pé-Duro (contínua, multisseriada, anastomosada, trabecular com margens fimbriada e presença moderada de vacúolos)



**Fig.10c** Padrão da medula no escudo do bovino zebuino Nelore (contínua, multisseriada, anastomosada, trabecular com margens fimbriadas e sem presença de vacúolos)

A literatura é conflitante quanto aos padrões morfológicos de pelos guarda de espécies pertencentes a família Bovidae, principalmente pelo fato da maioria da literatura encontrada ser voltada as pesquisas forenses e não com o intuito de diferenciar e caracterizar as raças bovinas. Gaudette [33] relata que para os membros da família Bovidae pode haver indivíduos que não apresentem a estrutura medular ao longo do seu pelo, outros apresentam medula contínua, podendo ainda haver indivíduos que apresentem o padrão descontínuo. Deedrick & Koch [26] também descrevem que os bovinos podem apresentar pelos com ausência de medula ou que quando presentes, essas podem ser contínuas.

É difícil fazer comparações entre os resultados desse estudo com os disponíveis na literatura, uma vez que os objetivos destes últimos citados são voltados principalmente para identificação das populações estudadas e por essa razão, em sua maioria os autores não especificam quais gêneros e quais raças bovinas foram utilizadas na avaliação.

Da mesma forma, a não especificação da porção do pelo utilizada para observação compromete possíveis comparações. As mesmas razões fazem com que comparações sobre a largura do pelo sejam incertas, Deedrick & Koch [26] e Gaudette [33] e citam que essa estrutura dentro da família é relativamente estreita. De forma contrária, De Marinis & Asprea [24] descrevem que a largura do córtex representa a metade ou  $\frac{1}{3}$  da largura da medula. Por meio dessas informações pode-se supor que as medulas analisadas por esses autores variaram de intermediárias à estreita, uma vez que essa estrutura caracteriza a camada mais interna do pelo, estando sobreposta pela cutícula e o córtex.

No presente estudo, dentro das raças avaliadas somente em 10% dos pelos foram verificadas medulas estreitas. Em 90 % dos bovinos analisados o tipo de padrão predominante foi o largo que condiz com o descrito por Sahajpal et al. [20] para *Bos taurus taurus*. No estudo realizado por Felix et al. (no prelo) com bovinos italianos somente para a raça Holstein Friesian Italiana

(Frisona), comumente chamada no Brasil de Holandesa, foi verificado um percentual significativo de medulas relativamente estreitas (42,5 %) em quarenta animais estudados.

De Marinis & Asprea [24] relatam que os ungulados domésticos podem apresentar estruturas medulares unisseriadas e multisseriadas, e dentro desse último grupo estão inseridos os bovinos. Em nenhum dos animais analisados nesse estudo houve a presença do padrão unisseriado, ou seja, ao longo do escudo dos pelos guarda verificou-se uma continuidade medular e as fileiras de células apresentaram-se multisseriadas quando observada à medula em sua largura, havendo duas ou mais fileiras de células presentes.

Quanto à disposição das células presentes no interior da medula, as raças bovinas avaliadas são pertencentes ao grupamento descrito por Quadros & Monteiro-Filho [11] como anastomosadas, onde há fusões entre as células formando arranjos celulares que podem delimitar espaços de córtex com forma e tamanho variados.

Com relação à forma em que a célula pode estar presente ao longo do escudo, todos os bovinos foram classificados como trabecular, ou seja, as células são achatadas como tabiques ou trabéculas e dispõem-se próximas e paralelas entre si, mas transversais ao maior eixo do pelo e ligando essas trabéculas paralelas há anastomoses longitudinais [11].

Em todos os pelos observados foi verificado uma ornamentação da margem da medula ao longo do escudo a qual Quadros & Monteiro-Filho [11] denominaram como fimbrias ou padrão fimbriado, que é quando a mesma apresenta muitas saliências e reentrâncias estreitas, mas com profundidades variáveis e distribuição irregular ao longo das margens, constituindo o que aparenta ser uma franja.

Durante as avaliações dos pelos guarda (apesar de todos os bovinos apresentarem o mesmo padrão trabecular) foi verificado que no interior da célula era possível visualizar algumas estruturas circulares ou ovais em três das raças analisadas, a exceção do Nelore. Essas estruturas foram

denominadas de vacúolos e de acordo com a quantidade foram definidas classes: acentuados, moderados e ausentes.

A contagem destes vacúolos possibilitou uma descrição da forma medular das raças mais completa e com isso melhorou o poder discriminatório do método. Assim, os bovinos da raça Caracu e Curraleiro Pé-Duro tiveram a presença moderada de vacúolos, os bovinos Pantaneiro presença acentuada e o Nelore foi classificado como ausente.

Às características medulares no escudo se mostraram importantes para a identificação de raças bovinas deste estudo e com isso, utilizando-se da associação dos padrões medulares com os padrões cuticulares foi possível diferenciar todas as raças bovinas (Quadro 3).

**Quadro3 Sinopse dos padrões cuticulares e medulares utilizados na identificação e diferenciação das raças bovinas estudadas**

<b>Padrões Cuticulares</b>	<b>Raças</b>			
	<b>Caracu</b>	<b>Curraleiro Pé-Duro</b>	<b>Pantaneiro</b>	<b>Nelore</b>
<i>Imbricamento das bordas</i>	Pavimentosa	Pavimentosa	Pavimentosa	Pavimentosa
<i>Forma das escamas</i>	Ondeadas	Ondeadas	Ondeadas	Ondeadas
<i>Orientação das escamas</i>	Irregular	Transversal	Transversal	Irregular
<i>Ornamentação das bordas das escamas</i>	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
<b>Padrões Medulares</b>				
<i>Presença da medula</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Continuidade da medula</i>	Contínua	Contínua	Contínua	Contínua
<i>Fileiras de células</i>	Multisseriada	Multisseriada	Multisseriada	Multisseriada
<i>Disposição das células</i>	Anastomosadas	Anastomosadas	Anastomosadas	Anastomosadas
<i>Forma das células</i>	Trabecular	Trabecular	Trabecular	Trabecular
<i>Ornamentação da margem da medula</i>	Fimbriada	Fimbriada	Fimbriada	Fimbriada
<i>Presença de vacúolos</i>	Moderada	Moderada	Acentuada	Sem presença

Quadros & Monteiro-Filho [29] relatam que em geral os caracteres cuticulares são os mais importantes para a diferenciação das espécies e os medulares para descrever famílias e ordens zoológicas. Pode-se acrescentar que essas características também são úteis em estudos relacionados à identificação de raças domésticas desde que analisadas em conjunto.

Ainda que tenha sido possível realizar essa diferenciação verificou-se que esse tipo de análise para determinar os padrões microestruturais tanto das cutículas quanto das medulas dos bovinos aparenta não ser o mais adequado devido sua subjetividade e pelo fato de que as formas das estruturas demonstraram semelhanças entre si, além da similaridade com outras espécies de mamíferos já descritos por outros autores [6, 11, 21, 23, 24, 27,28, 29, 30].

Para Tridico et al. [34] a análise de comparação de pelos é essencialmente subjetiva e os resultados e conclusões não são quantificáveis, mas levam em conta o parecer de especialistas. Por essa razão, para diminuir a subjetividade nesse estudo, além das características morfológicas também foram determinadas características morfométricas da microestrutura dos pelos.

Na avaliação das medidas de área e perímetro das escamas cuticulares, o efeito de raça foi significativo ( $p < 0,001$ ) conforme indicado na Tabela 1. Embora a variável EC tenha sido utilizada para obter normalização na distribuição dos dados e o seu uso tenha reduzido o coeficiente de variação das medidas relacionadas à forma das escamas cuticulares, sua utilização não permitiu maior discriminação do que a obtida utilizando as variáveis separadamente.

Os resultados aqui obtidos para área e EC são condizentes com os obtidos por Serrano et al. [35] com base em padrões de diversidade e similaridade obtidos para as mesmas raças bovinas entretanto, utilizando marcadores de DNA (RAPD) e também com o estudo realizado por Egito et al.[36] utilizando marcadores moleculares de microssatélites. Ambos os trabalhos citam que houve a existência de introgressão genética oriunda das raças bovinas zebuínas em bovinos locais incluindo os bovinos Pantaneiros. Carmo et al. [37], do mesmo modo, fazem referência de que na

raça Pantaneira verificou-se essa introgressão de alelos de origem zebuína devido a prováveis miscigenações ocorridas no passado. Desta forma, existe uma menor divergência da raça Pantaneira em relação à raça Nelore.

**Tabela1 Análise de variância e teste de comparação de médias das variáveis cuticulares de pelos guarda de bovinos Pantaneiro, Curraleiro Pé-Duro, Caracu e Nelore**

Variáveis	Raças *	Média ( $\mu\text{m}$ )	Desvio Padrão	CV (%)
Área	Caracu	305,75 <sup>a</sup>	53,63	17,54
	Pantaneira	254,31 <sup>b</sup>	48,83	19,20
	Nelore	233,82 <sup>b</sup>	38,47	16,45
	Curraleiro Pé-Duro	199,00 <sup>c</sup>	30,35	15,25
Perímetro	Caracu	87,96 <sup>a</sup>	9,53	10,83
	Pantaneira	80,68 <sup>b</sup>	10,57	13,10
	Nelore	74,47 <sup>c</sup>	7,55	10,14
	Curraleiro Pé-Duro	69,09 <sup>d</sup>	6,39	9,25
EC	Caracu	1,86 <sup>a</sup>	0,07	3,80
	Pantaneira	1,77 <sup>b</sup>	0,07	3,68
	Nelore	1,77 <sup>b</sup>	0,06	3,44
	Curraleiro Pé-Duro	1,69 <sup>c</sup>	0,05	3,15

\* ( $p < 0.001$ ); Médias com letras diferentes entre raças diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ).  
EC = índice de escama cuticular; CV = Coeficiente de variação

Os resultados igualmente correspondem com os descritos por Issa et al. [38] que realizaram um estudo de análise citogenética e molecular da raça Pantaneira. Os autores relatam que entre os Pantaneiros analisados, houve a presença de cromossomo Y de zebuino (acrocêntrico), o que sugere contaminação racial por bovinos zebuínos, uma vez que a raça Pantaneira é oriunda de bovinos taurinos (submetacêntrico).

Entre as raças brasileiras localmente adaptadas, a que demonstrou maior diferenciação das demais tanto na parte morfológica quanto morfometria da cutícula foi à raça Caracu. Esses resultados corroboram os descritos por Serrano et al. [35] e Egito et al. [39], ao compararem, com marcadores moleculares, a estrutura populacional de raças bovinas brasileiras localmente

adaptadas. Como neste estudo, na avaliação genética a raça Caracu facilmente se destacou das demais, por possuir a menor riqueza alélica, provavelmente devido ao melhoramento genético realizado pela Associação de Criadores da raça com vistas à manutenção da mesma Egito et al. [36]. Os resultados desse estudo também podem ser justificados considerando o histórico de formação destas populações a partir da sua introdução no Brasil pelos colonizadores, uma vez que segundo Primo [40] o ancestral provável das raças Curraleiro Pé-Duro e Pantaneira foi o *Bos taurus ibericus*, enquanto a raça Caracu teve como ancestral *Bos taurus aquitanicus*.

Quando avaliados os dados relacionados às medidas medulares dos pelos dos bovinos, o modelo utilizando raças foi significativo para todas as variáveis resposta ( $p < 0.001$ ), conforme demonstrado na Tabela 2. Utilizando as três variáveis morfométricas diâmetro pelo (DP), diâmetro medular (DM) e córtex medular (CM) isoladamente não foi possível a separação das raças em grupos específicos.

**Tabela 2** Análise de variância e teste de comparação de médias das variáveis medulares de pelos guarda de bovinos Pantaneiro, Curraleiro Pé-Duro, Caracu e Nelore

Variáveis	Raças	Média ( $\mu\text{m}$ )	Desvio Padrão	CV (%)
DP	Pantaneira	101,42b	18,67	18,41
	Curraleiro Pé-Duro	108,43b	29,55	27,25
	Caracu	121,25a	22,95	18,93
	Nelore	107,19b	26,32	24,55
DM	Pantaneira	61,49b	15,53	25,26
	Curraleiro Pé-Duro	62,39b	18,26	29,27
	Caracu	75,19a	19,63	26,11
	Nelore	78,70a	24,91	31,65
CM	Pantaneira	20,14b	4,50	22,34
	Curraleiro Pé-Duro	22,98a	6,29	27,37
	Caracu	22,93a	6,40	27,92
	Nelore	15,42c	4,26	27,62

DP = diâmetro pelo; DM = diâmetro medular; CM = córtex medular. Médias com letras diferentes entre raças diferem estatisticamente pelo teste Tukey ( $p < 0.05$ ); CV = Coeficiente de variação

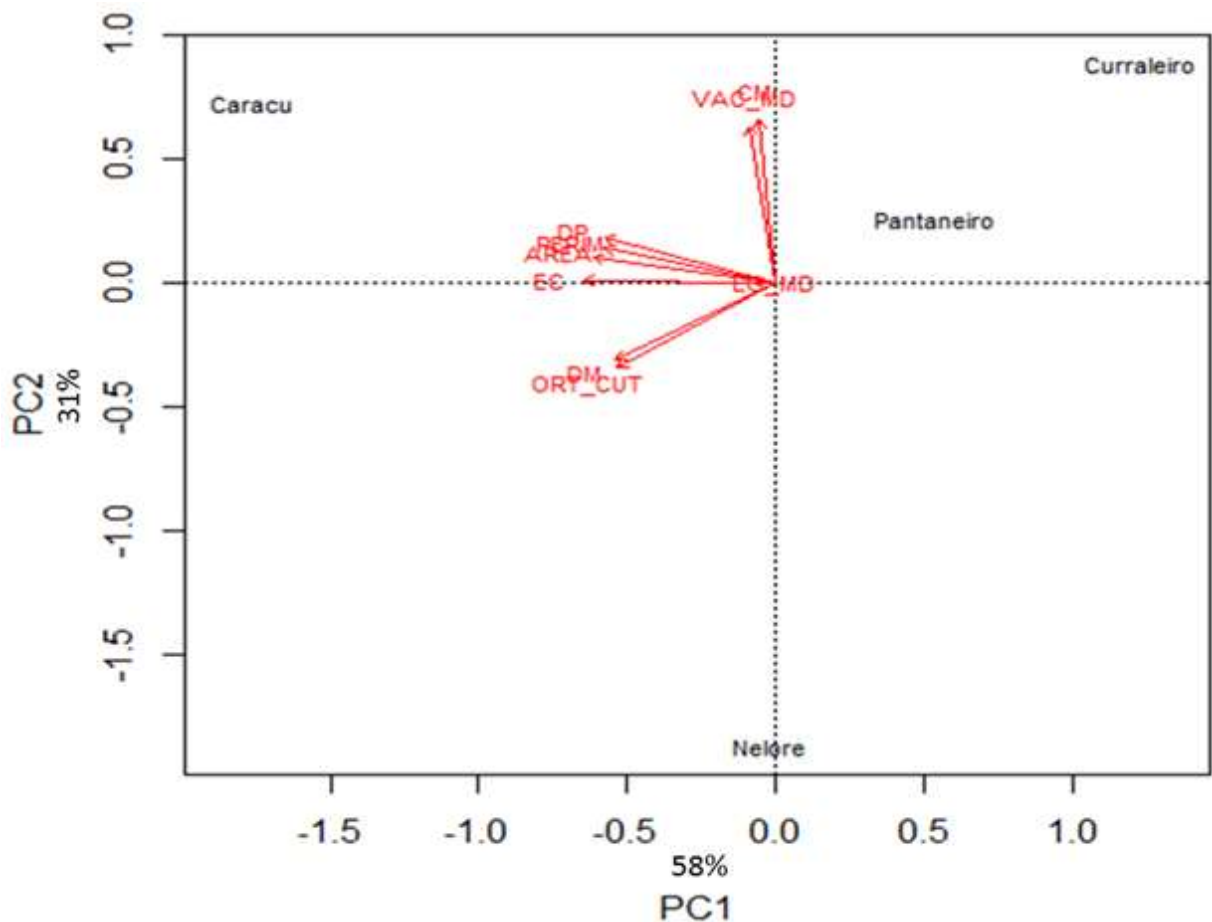
Em particular, os resultados encontrados para córtex medular (CM) corroboram os diagnósticos morfológicos dos padrões medulares uma vez que os bovinos Caracu e Curraleiro Pé-Duro apresentaram o mesmo padrão: contínuo, multisseriado, anastomosado, trabecular com margem fimbriada e presença moderada de vacúolos. É válido ressaltar que, segundo Keogh [41], o tamanho do córtex em relação à medula, é utilizado com êxito na identificação de espécies.

Após estudar separadamente as informações obtidas por meio da análise dos dados morfológicos e morfométricos de microestruturas dos pelos guarda, fez-se uma junção dos dados para análises utilizando métodos multivariados. Essa decisão foi tomada pelo fato que as informações obtidas por análises univariadas muitas vezes podem ser incompletas, principalmente quando há correlação entre as variáveis.

De acordo com Paiva et al. [42], o uso de análise multivariada permite combinar as informações múltiplas provenientes da unidade experimental. Quando o número de características é elevado, muitas delas podem contribuir pouco para a discriminação dos indivíduos avaliados e essa situação aumenta o trabalho de caracterização, mas sem melhora na precisão, tornando mais complexa a análise e interpretação dos dados. Além disso, com o uso da análise multivariada, pode-se eliminar características redundantes e de difícil mensuração, reduzindo o tempo e custos de experimentos.

Foi realizada primeiramente uma análise de componentes principais (PCA) que segundo Baker et al. [43] pode revelar relações não-identificadas previamente e com isso, contribuir para melhor interpretação dos dados e após foi realizada uma análise discriminante. Essa análise foi utilizada para avaliar o poder das variáveis tricológicas para diferenciação das raças. A análise de componentes principais evidenciou que os dois primeiros componentes explicaram juntos 89% da variação dos dados derivados das nove características estudadas.

Com a dispersão gráfica dos dois primeiros componentes (Figura 11) pode-se avaliar a similaridade entre os grupos de animais e as correlações entre variáveis. Animais mais próximos no gráfico são mais similares considerando o conjunto de variáveis analisadas.

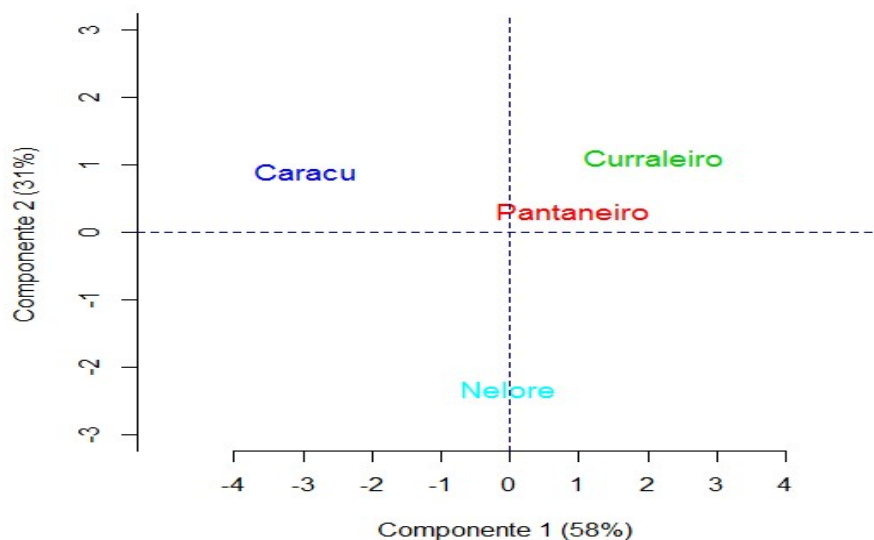


**Fig.11** Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais, obtidos de nove variáveis morfológicas e morfométricas de pelos guarda de bovinos pertencentes as raças Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore. Área; PERIM: perímetro da cutícula; EC = índice de escama cuticular; DP = índice diâmetro pelo; DM índice diâmetro medular; CM = índice córtex medular; ORT\_CUT: orientação da cutícula; LG\_MD: largura da medula; VAC\_MD: presença de vacúolo

Variáveis mais próximas, com ângulo entre as setas se fechando, têm correlação elevada e positiva. Variáveis opostas no gráfico, tendendo a formar um ângulo de 180°, tem correlação elevada e negativa. E variáveis onde o ângulo entre as setas tende a 90° tem correlação aproximadamente nula [44]. Nota-se que as variáveis EC, Área, PERIM e DP são correlacionadas

positivamente entre si. Entretanto, essas variáveis quando comparadas com as variáveis CM e VAC\_MD apresentam uma fraca correlação, assim como as com variáveis DM\_ORT\_CUT. As variáveis DM e ORT\_CUT apresentam forte correlação positiva entre si e forte correlação negativa com as variáveis CM e VAC\_MD. A variável LG\_MD não possui correlação com nenhuma variável em nenhum dos componentes uma vez que seu valor foi zero.

Na dispersão gráfica apresentada na Figura 12 fica evidente que os bovinos Curraleiros Pé-Duro e os Pantaneiros são mais similares e esses resultados da PCA, confirmam o que já havia sido descrito anteriormente que dentre as raças brasileiras localmente adaptadas, a raça Caracu é a que apresenta maior diferenciação das demais. Os trabalhos de melhoramento genético, tanto para carne quanto para leite, aos quais foi submetida à raça Caracu são a justificativa mais provável para a divergência observada. Os animais avaliados da raça Nelore apresentaram maior diferenciação tricológica, pois entre todas as raças esses são os que se encontram mais distantes no gráfico o que é totalmente justificável e esperado uma vez que esses são de origem zebuína (*Bos taurus indicus*).



**Fig.12** Dispersão gráfica dos dois primeiros componentes principais para observar a dissimilaridade entre as raças (Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore)

Nas tabelas 3,4 e 5 estão dispostos os resultados da análise discriminante. Os resultados demonstram que o poder da união dos padrões cuticulares e medulares das microestruturas dos pelos foi maior e se mostrou mais acurado para diferenciar as raças (Tabela 5) do que quando as informações são avaliadas separadamente (Tabelas 3 e 4) assim como quando consideradas somente as formas como essas microestruturas se apresentam (Quadro3).

**Tabela3 Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação das cutículas dos pelos guarda**

<b>Raças</b>		<b>Caracu</b>	<b>Nelore</b>	<b>Curraleiro</b>	<b>Pantaneiro</b>	<b>Total</b>
Caracu	n°	24	8	2	6	40
	%	(60,00)	(20,00)	(5,00)	(15,00)	100
Nelore	n°	4	21	8	7	40
	%	(10,00)	(52,50)	(20,00)	(17,50)	100
Curraleiro	n°	0	8	28	4	40
	%	(0,00)	(20,00)	(70,00)	(10,00)	100
Pantaneiro	n°	8	9	8	15	40
	%	(20,00)	(22,50)	(20,00)	(37,50)	100
Total	n°	36	46	46	32	160
	%	(22,50)	(28,75)	(28,75)	(20,00)	100
Erro global médio		0,400	0,475	0,300	0,625	0,450

**Tabela4 Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação das células medulares dos pelos guarda**

<b>Raças</b>		<b>Caracu</b>	<b>Nelore</b>	<b>Curraleiro</b>	<b>Pantaneiro</b>	<b>Total</b>
Caracu	n°	17	6	11	6	40
	%	(42,50)	(15,00)	(27,50)	(15,00)	100
Nelore	n°	0	29	3	8	40
	%	(0,00)	(72,50)	(7,50)	(20,00)	100
Curraleiro	n°	9	1	17	13	40
	%	(22,50)	(2,50)	(42,50)	(32,50)	100
Pantaneiro	n°	9	7	8	16	40
	%	(22,50)	(17,50)	(20,00)	(40,00)	100
Total	n°	35	43	39	43	160
	%	(21,88)	(26,88)	(24,38)	26,88	100
Erro global médio		0,575	0,275	0,575	0,600	0,506

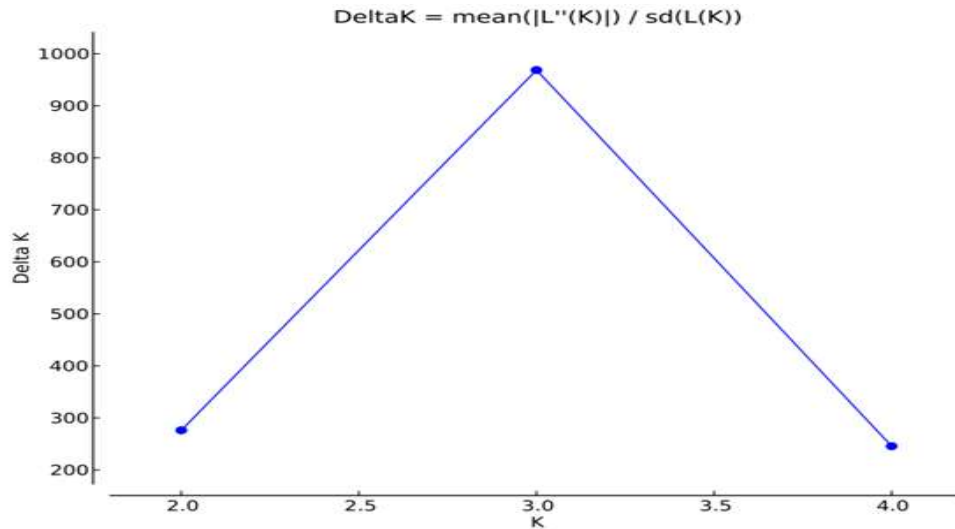
**Tabela5 Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação obtidas a partir das características microestruturas dos pelos guarda (análise tricológica)**

Raças		Caracu	Nelore	Curraleiro	Pantaneiro	Total
Caracu	n <sup>o</sup>	38	2	0	0	40
	%	(95,00)	(5,00)	(0,00)	(0,00)	100
Nelore	n <sup>o</sup>	4	36	0	0	40
	%	(10,00)	(90,00)	(0,00)	(0,00)	100
Curraleiro	n <sup>o</sup>	0	0	37	3	40
	%	(0,00)	(0,00)	(92,50)	(7,50)	100
Pantaneiro	n <sup>o</sup>	0	0	3	37	40
	%	(0,00)	(0,00)	(7,69)	(92,31)	100
Total	n <sup>o</sup>	42	38	40	40	160
	%	(26,42)	(23,90)	(25,16)	(24,52)	100
Erro global médio		0,050	0,100	0,075	0,076	0,075

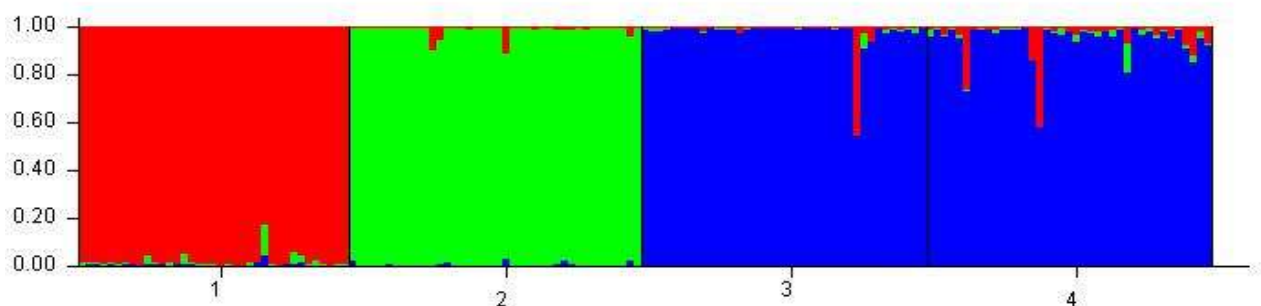
Os resultados encontrados corroboram informações de Quadros & Monteiro-Filho [11] que afirmam que é por meio da combinação dos padrões cuticulares, medulares e do córtex dos pelos guarda dos mamíferos que é possível identificar uma espécie, uma vez que essa combinação confere a uma determinada espécie características diagnósticas específicas. Diante disso, é possível acrescentar que para identificação de raças deve-se associar a combinação dos padrões e as medidas dessas microestruturas.

Para a caracterização genética, baseado no gráfico da Figura 13 é possível observar que o número real de  $k$  dado em função da magnitude de  $\Delta K$  foi três. Este valor infere o número de populações existentes no conjunto dos animais avaliados pela análise Bayesiana implementada pelo programa STRUCTURE [14]. Por esta análise foi possível observar que as raças Curraleira e Pantaneira possuem um grande número de alelos compartilhados que as colocam na mesma população, evidenciando sua origem comum. A raça Caracu, embora também seja uma raça localmente adaptada, por seu histórico de seleção e melhoramento genético já se distingue das demais, assim como a raça zebuína Nelore (figura 14). Apesar disto, a origem comum da raça Caracu com as demais localmente adaptadas pode ser observada pela presença de alelos comuns em alguns animais do grupamento Curraleiro Pé-Duro/Pantaneiro. Esse resultado corrobora o

encontrado pela análise de componentes principais descrita nas Figuras 11 e 12 o que permite afirmar que a análise tricológica é um método eficiente do ponto de vista de classificação dos indivíduos dentro dos grupos raciais.



**Fig.13** Magnitude de  $\Delta K$  em função de K dada pela média de cinco corridas independentes com x interações cada e período de *burn-in* de x. O valor que sobressai representa o valor real de K, ou seja, o numero de populações inferidas



**Fig.14** Agrupamento individual dos x indivíduos das quatro raças bovinas analisadas inferido pelo método estatístico Bayesiano utilizando-se o programa STRUCTURE. Cada um dos x animais é representado por uma linha vertical dividida em segmentos classificados de acordo com a cor e tamanho corresponde à proporção relativa do genoma do animal que corresponde a um agrupamento particular. As diferentes raças estão separadas pelas linhas pretas. (1 = Caracu; 2 = Nelore; 3 = Curraleiro Pé-Duro e 4 = Pantaneiro)

É válido ressaltar que nesse estudo acreditava-se que o número de 16 marcadores microssatélites seriam o suficiente para diferenciação das raças estudadas. No entanto, como as raças locais brasileiras Curraleiro Pé-Duro e a Pantaneira são muito próximas entre si, não foi possível haver essa distinção. Possivelmente se o número de marcadores utilizados tivesse sido maior, estas raças teriam sido distintas.

Entretanto, como o objetivo da caracterização genética por meio de marcadores de DNA no presente estudo foi de validar a metodologia de análise tricológica para distinção racial, na Tabela 6 são apresentadas as probabilidades de identificação de indivíduos dos quatro grupos genéticos amostrados.

**Tabela6 Proporção de indivíduos de cada um dos quatro grupos genéticos analisados em relação às quatro populações inferidas pelo programa STRUCTURE**

Grupos Genéticos	Raças Avaliadas			
	Caracu	Nelore	Curraleiro	Pantaneiro
Caracu	0,972	0,013	0,006	0,009
Nelore	0,011	0,977	0,004	0,008
Curraleiro Pé-Duro	0,022	0,007	0,892	0,079
Pantaneiro	0,015	0,007	0,024	0,954

Na raça Curraleiro Pé-Duro verifica-se que a miscigenação com Pantaneiro é mais evidente em alguns indivíduos do que o contrário dessa afirmativa. Estes resultados corroboram os resultados obtidos para a análise tricológica desses bovinos (Tabela 5), onde foi possível visualizar que dentro do grupamento Pantaneiro houve animais caracterizados como Curraleiro Pé-Duro e vice-versa.

Observa-se ainda tanto na análise tricológica quanto na genética (Tabelas 5 e 6, respectivamente) que nos animais Curraleiro Pé-Duro encontram-se alguns indivíduos que também apresentam compartilhamento alélico em função da origem comum mais evidenciada com a raça Caracu. De acordo com Britto [45] e Carmo et al. [37] as duas raças eram bastante semelhantes no passado, sendo diferenciadas pelo melhoramento genético ao qual a raça Caracu foi submetida. Para as raças Caracu e Nelore os resultados genéticos também condizem com os apresentados pela análise tricológica.

Diante disso, mais uma vez podemos verificar o quão robusto é o método tricológico para diferenciação de raças bovinas uma vez que, a análise foi capaz de captar até mesmo diferenças de indivíduos no rebanho que foram também apresentadas pela análise genética, uma vez que os mesmos animais que pelo método genético foram descritos como sendo de outro grupamento, também foram caracterizados pela tricologia, demonstrando a riqueza do método proposto para identificação de raças.

A precisão e robustez da análise tricológica foi ainda confirmada pela comparação dos resultados da análise de estrutura genética da população com resultados da análise discriminante por meio de análise de Correlação de Pearson. Entretanto, para essa comparação foi necessário retirar da análise tricológica os animais que não foram caracterizados geneticamente para não haver resultados errôneos. Com isso, na Tabela 7 estão dispostos os dados tricológicos referentes à proporção de indivíduos classificados corretamente dentro de cada raça Caracu (n=37), Nelore (n=40), Curraleiro Pé-Duro (n=39) e Pantaneiro (n=39) que foram utilizados para gerar a matriz que serviu como parâmetro comparativo com os dados genéticos, para averiguar se os dados possuíam associação entre si.

O resultado para o teste de correlação de Pearson demonstrou que houve uma alta correlação positiva e significativa entre as matrizes ( $r = 0,996$  e  $p < 0,001$ ). Os resultados aqui obtidos indicaram

que ambas as técnicas são similares no ponto de vista de classificação dos indivíduos dentro dos grupos raciais e diante disto, a análise tricológica pode ser considerada útil como marcador racial de bovinos.

**Tabela7 Análise discriminante, número de observações e porcentagem de classificação obtidas a partir das características microestruturas dos pelos guarda de 155 bovinos das raças Caracu, Curraleiro Pé-Duro, Pantaneiro e Nelore (análise tricológica)**

<b>Raças</b>		<b>Caracu</b>	<b>Nelore</b>	<b>Curraleiro</b>	<b>Pantaneiro</b>	<b>Total</b>
Caracu	n°	35	2	0	0.	37
		0,946	0,054	0,000	0,000	100 %
Nelore	n°	4	36	0	0	40
		0,100	0,900	0,000	0,000	100 %
Curraleiro	n°	0	0	37	2	39
		0,000	0,000	0,948	0,051	100 %
Pantaneiro	n°	0	0	2	37	39
		0,000	0,000	0,051	0,948	100 %
Total	n°	39	38	39	39	155
		0,252	0,245	0,252	0,252	100 %
Erro global médio		0,050	0,100	0,075	0,076	0,075

### **Conclusão**

A análise tricológica é um método útil para identificação racial de bovinos. Seu potencial de utilização para outras espécies de mamíferos de interesse para produção animal deve ser estudado uma vez que se trata de um método simples, de baixo custo e pouco invasivo.

## Referências

1. Boettcher PJ, Hoffmann I, Baumung R, Drucker AG, McManus C, Berg P, Stella A, Nilsen LB, Moran D, Naves M, Thompson MC. Genetic resources and genomics for adaptation of livestock to climate change. *Front Genet.* 2015:51-53.
2. Felix GA, Piovezan U, Juliano RS, Silva MC, Fioravanti MCS. Potencial de uso de raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro Pé - Duro e Pantaneiro. *E. Biosf.* 2013; 9(16): 1715-1741.
3. Felix GA, Piovezan U, Quadros J, Juliano RS, Alves FV, Fioravanti, MCS. Tricology for identifying mammal species and breeds: Its use in research and agriculture. *Arch Zootec.* 2014; 63: 107-116.
4. Barcaccia G, Felicetti M, Galla G, Capomaccio S, Cappelli K, Albertini E, Buttazzoni L, Pieramati C, Silvestrelli M, Supplizi AV. Molecular analysis of genetic diversity, population structure and in breeding level of the Italian Lipizzan horse. *Livest Sci.* 2013; 151:124–133.
5. Felix, GA, Fioranti, MCS, Silva, MCda, Moura, MI, Cassandro, M, Tormen, N, Abreu, UGP de, Piovezan, U. Identificação raças bovinas criadas no Brasil por meio de morfometria cuticular de pelos guarda. In: *Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zootecnia; 2016 mai 11-13; Santa Maria, Brasil. Santa Maria: Associação Brasileira de Zootecnistas; 2016. p.1-3.*
6. Silveira F, Navarro MA, Monteiro PKA, Quadros J, Monteiro-Filho ELA. Proposta de utilização da microestrutura de pelos guarda para fins de estudos forenses e no controle de qualidade de alimentos. *RBC.* 2013; 2(1): 32-41.
7. Tormen, N. Conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche animali autoctone. Padova. Tesis [Graduation in Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Animali]. Università degli Studi di Padova, Faculty of Agraria; 2013.
8. Felix GA, Piovezan U, Quadros J, Alves FV, Juliano RS, Fioravanti MCS. Adaptação da metodologia: análise de microestruturas de pelos para identificação de mamíferos - tricologia. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 96). 2014 [Acesso em 11 de Nov. 2014]:6. Disponível em: [www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT96.pdf](http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT96.pdf)
9. Quadros J, Monteiro-Filho ELA. Coleta e preparação de pelos de mamíferos para identificação em microscopia óptica. *Rev. Bras. Zool.* 2006; 23(1): 274-278.
10. Quadros J. Identificação microscópica de pelos de mamíferos brasileiros e sua aplicação no estudo da dieta de carnívoros. Curitiba. Tese [Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia] – Universidade Federal do Paraná; 2002.
11. Quadros J, Monteiro-Filho ELA. Revisão conceitual, padrões microestruturais e proposta nomenclatória para os pelos guarda de mamíferos brasileiros. *Rev. Bras. Zool.* 2006; 23(1):279-296.
12. Bayer MM, Droop SJM, Mann DG. Digital microscopy in phycological research, with special reference to microalgae. *Physiol. res.* 2001; 49:263-274.

13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991; 10(4):506-13.
14. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005; 14. 2611-2620.
15. Pritchard JK, Pritchard MS, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155:945–959.
16. Jakobsson, M, Rosenberg, N A, Clumpp: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007; 23:1801-1806.
17. Rosenberg, NA. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes*. 2004; 4:137–138.
18. SAS Institute, 2002. SAS user's guide for windows environment 9.1.3 ed. Cary: SAS Institute Inc. SAS, 2002.
19. R CORE TEAM. R version 3.2.4: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing. Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <http://www.R-project.org>.
20. Sahajpal V, Goyal SP, Thakar MK, Jayapal R. Microscopic hair characteristics of a few bovid species listed under Schedule-I of Wildlife (Protection) Act 1972 of India. *Forensic sci. int.* 2009;189: 34–45.
21. Miranda GHB, Rodrigues FHG, Paglia, AP. Guia de identificação de pelos de mamíferos brasileiros. Brasília: Ciências Forenses, 2014.
22. Keogh HJ. Aphotographic reference system based on the cuticular scale patterns and groove of the hair of 44 species of southern African Cricetidae and Muridae. *S. Afr. J. Wildl. Res.* 1985; 15(4):109-159.
23. Teerink BJ. Hair of west European mammals: atlas and identification. Cambridge: Cambridge University Press. 1991.
24. De Marinis AM, Asprea A. Hair identification key of wild and domestic ungulates from southern Europe. *Wildlife Biol.* 2006; 12(3): 305-320.
25. Lungu A, Recordati, C, Ferrazzi, V, Gallazzi, D. Image analysis of animal hair: morphological features useful in forensic veterinary medicine. *Lucrari Stiintifice*. 2007; 40:439-446.
26. Deedrick DW, Koch SL. Microscopy of hair Part II: A practical guide and manual for animal hairs. FSC. 2004. [Acesso em 18 de jan]. 2016; 6(3):1-20. Disponível em: [https://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/research/2004\\_03\\_research02.htm](https://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/research/2004_03_research02.htm).

27. Hausman LA. Structural characteristics of the hair of mammals. *Am. Midl. Nat.* 1920 [Acesso em 28 jun 2012]; 54(635):496-523. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2456345> Acesso: 28 jun.2012.
28. Hausman LA. Further studies of the relationships of the structural characters of mammalian hair. *Am. Nat.* 1924. [Acesso em 08 de maio 2009]; 58(659):544-557. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2456577>.
29. Quadros J, Monteiro-Filho ELA. Identificação dos mamíferos de uma área de floresta atlântica utilizando a microestrutura de pelos guarda de predadores e presas. *Arq. Mus. Nac.* 2010; 68(1-2):47-66.
30. Vanstreels RET, Ramalho FP; Adania CH. Microestrutura de pelos guarda de felídeos brasileiros: considerações para a identificação de espécies. *Biota Neotrop.* 2010; 10(1): 333-337.
31. Chernova OF. Architectonics of the medulla of guard hair and its importance for identification of taxa. *Dokl Biol Sci.* 2001; 376:81-85. Translated from *Doklady Akademii Nauk.* 2001; 376(4): 569-573.
32. Perrin MR, Campbell BS. Key to the mammals of the Andries Vosloo Kudu Reserve (eastern Cape), based on their hair morphology, for use in predator scat analysis. *South African Tydskr Natuurnav.* 1980; 10(1):1-14.
33. Gaudette BD. Identification of human and animal. *E. Forensic Sci.* 2000:1034-1041.
34. Tridico SR, Houck MM, Kirkbride KP, Smith ME, Yates BC. Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls. *Forensic.Sci. Int.* 2014; 238:101–107.
35. Serrano GM, Egito AA, McManus C, Mariante AS. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. *Pesq. Agrop. Bras.* 2004; 39(6):543-549.
36. Egito AA, Paiva SR, Albuquerque MSM, Mariante AS, Almeida LD, Castro SR, Grattapaglia, D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics.* 2007; 8: 83.
37. Carmo AS, Kolling GJ, Egito AA, Mariante AS, Albuquerque MSM, Garcia JF, Silva MVGB. Divergência genômica entre as raças bovinas brasileiras localmente adaptadas. In: *Anais do 25<sup>a</sup> Congresso Brasileiro de Zootecnia: Dimensões Tecnológicas e Sociais da Zootecnia; 2015jul 20-23; Fortaleza, Brasil. Fortaleza: Associação Brasileira de Zootecnia; 2015.*
38. Issa EC, Jorge W, Sereno JRB. Cytogenetic and molecular analysis of the Pantaneiro cattle breed. *Pesq. Agrop. Bras.* 2006; 41(11):1609-1615.
39. Egito AA, Lara MAC, Albuquerque MSM, Martinez AM, Landi V, Juliano RS, Delgado JV, Fioravanti, MCS. Estrutura populacional e diversidade genética de raças bovinas brasileiras localmente adaptadas. *AICA.* 2014; 4: 16-18.

40. Primo AT. Os bovinos ibéricos nas Américas. In: Anais da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 1993; Rio de Janeiro, Brasil. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993.
41. Keogh HJ. An atlas of hair from southern African mammal species with reference to its taxonomic and ecological significance. Thesis [Doutorado em Zoology]. University of Pretoria, Faculty of Science; 1979.
42. Paiva AL da C, Teixeira RB, Yamaki M, Menezes GR de O, Leite CDS, Torres R de A. Análise de componentes principais em características de produção de aves de postura. Rev. Bras. Zoot. 2010; 39(2):285-288.
43. Baker JF, Stewart TS, Long CR, Cartwright TC. Multiple regression and principal components analysis of puberty and growth in cattle. J Anim Sci. 1988; 66(9):2147-58.
44. R-Fácil. Análise Multivariada. Apostila destinada a usuários do R, com demonstrações de uso de funções em exemplos da área de Ciências Agrárias. Goiânia: Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás; 2014. 28p. Disponível em: <file:///H:/Para%20trabalhar%20com%20professor%20Emmanuel/R-f%C3%A1cil-%20An%C3%A1lise%20Multivariada.pdf>. [acesso 09 jun 2016].
45. Britto, CMC de. Citogenética do gado pé-duro. Teresina: EDUFPI; 1998.94p.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande disponibilidade de marcadores moleculares para a caracterização racial da maioria das espécies de animais domésticos e o desenvolvimento de novas técnicas de análise da variação molecular estão ampliando a capacidade de caracterizar a diversidade genética das raças. No entanto, muitas vezes, em determinadas áreas da produção animal os custos para esse tipo de análise são proibitivos para uso regular. Portanto, faz sentido em termos de eficiência e economia utilizar técnicas alternativas que possam servir como marcador racial com baixo custo de execução.

Até o momento a análise dos padrões microestruturais encontrados nos arranjos das escamas cuticulares e das células medulares dos pelos guarda vem sendo comumente utilizada no reconhecimento e identificação dos mamíferos até o nível de espécie e dependendo do detalhamento a técnica nos permite identificar até em nível de subespécie. Entretanto, verificou-se que em relação à identificação de raças a tricológia só será totalmente viável com a utilização dos padrões morfológicos em associação com as medidas desses padrões microestruturais encontrados nas escamas cuticulares e células medulares dos pelos guarda uma vez que existe uma gama de raças a serem estudadas e com isso surge a necessidade de um maior aprofundamento nas análises.

No âmbito científico, a capacidade de diferenciação entre raças observada nesse estudo possui elevada importância uma vez o método pode ser empregado em programas de Conservação de Recursos Genéticos Animais bem como auxiliar na distinção de produtos oriundos de sistemas certificados de produção. Além disso, se em futuros estudos se confirmarem os resultados aqui obtidos para as raças bovinas, a metodologia poderá contribuir na identificação de mamíferos criando-se um banco de registros tricológicos utilizando diversas raças de animais domésticos. Esse banco poderia contribuir não somente para caracterização de raças, mas em estudos forenses, como já acontece com diversas espécies de mamíferos silvestres. Poderia também contribuir para indústria têxtil, em sistemas de controle e autocontrole de matérias-primas, controle na qualidade de alimentos, entre outros.

Apesar da técnica ser bastante simples e de fácil execução, alguns cuidados são necessários para seu uso a fim de diferenciar raças sem que haja prejuízo no diagnóstico. Para colheita do material para estudo, as amostras de pelos devem ser retiradas manualmente, utilizando-se luvas de látex, da região entre escápulas dos animais. É necessário que para cada animal seja utilizada uma luva, para não haver contaminação. Recomenda-se que os pelos guarda que

contiverem bulbo e ápice sejam separados e lavados em uma mistura de álcool comercial e detergente e além disso, para obter melhores resultados, a lavagem dos pelos deve ser feita utilizando um agitador magnético.

Para não danificar as impressões cuticulares (decalque) recomenda-se o uso de luvas de vinil, sem talco, para a remoção dos pelos das lâminas, pois analisando as imagens em microscópio óptico, notou-se a presença de células epiteliais do dedo do manipulador o que danificou a impressão. Em regiões que apresentam condições de clima e temperatura similares as condições de Corumbá – MS (onde o experimento foi conduzido), que apresenta clima tropical com umidade relativa do ar em torno de 75% e altas temperaturas no verão, o Entellan (produto que segundo alguns autores é indicado para confecção das lâminas permanentes), não se mostrou eficiente, aumentando muito o tempo de secagem. Nessas condições, o produto mais recomendado é o Óleo de Cedro para microscopia.

Especial atenção deve ser dada às características morfológicas dos pelos dos bovinos tanto cuticulares quanto medulares, pois as diferenças nos padrões são bastante sutis e de difícil observação para o pesquisador iniciante e não treinado. Para finalizar, embora os dados moleculares tenham corroborado os dados da análise tricológica no estudo com bovinos, recomenda-se a validação dos dados por meio de marcadores moleculares quando forem considerar novas espécies de mamíferos domésticos para as quais os métodos ainda não foram validados.

Como produto desse trabalho além dessa tese e de um Comunicado Técnico série Embrapa “Adaptação da Metodologia: análise de microestruturas de pelos para identificação de Mamíferos – Tricologia” (em anexo) foi desenvolvido um software “Fauna Online”. Trata-se do primeiro programa para a identificação tricológica de animais da fauna brasileira, disponível para consulta online. Em sua primeira versão, serão disponibilizados bancos de dados referentes à morfologia de pelos para consulta pelo público e identificação de animais com base em imagens (lâminas) tricológicas. O programa foi registrado junto ao INPI sob protocolo N° BR5120150011847 de 19 de outubro de 2015 e a versão inicial estará disponível ao público na página da Universidade Federal de Goiás, Embrapa Pantanal e Universidade Federal do Paraná (principais parceiros nessa pesquisa).

Devido ao fato desse estudo ter sido desenvolvido em uma Rede de Pesquisa houve a possibilidade de integração com pesquisadores especialistas na área de conservação de recursos genéticos animais que contribuiriam com a qualidade da pesquisa no âmbito tanto técnico quanto

científico. Os resultados obtidos nas pesquisas da Rede contribuíram na discussão das teses, dissertações e artigos de todos os acadêmicos que estão diretamente ligados a esta Rede e com isso viabilizou e viabilizará a geração de produtos com maior qualidade e fator de impacto.

A realização do Doutorado Sanduíche, desenvolvido na *Università degli Studi di Padova* na Itália, também proporcionou ganhos para a rede, pois além da interação com pesquisadores estrangeiros de elevado gabarito na área de conservação de recurso genético animais estão em fase de elaboração dois novos artigos relacionados com o projeto de "Caracterização de raças bovinas locais por meio de morfometria tricológica," sendo um com raças bovinas italianas e outro que compara o uso da análise tricológica entre espécies (raças bovinas com raças ovinas autóctones italianas).

Durante a execução desse projeto foram visualizadas diferenciações dos padrões de haste e escudos entre os bovinos *Bos taurus taurus* do bovinos Nelore (*Bos taurus indicus*). A partir dessas observações sugerimos a hipótese de que pelos com hastes mais longas estariam relacionadas ao isolamento térmico dos animais e escudos mais longos serviriam como refletores/absorventes da radiação, com esta questão em mente foi submetida uma nova proposta de pesquisa que foi aprovada pelo edital de nº 79/2013MCTI/CNPq/FNDCT que poderá ser um possível pós-doutorado.

**ANEXOS - ADAPTAÇÃO DA METODOLOGIA: ANÁLISE DE MICROESTRUTURAS  
DE PELOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MAMÍFEROS – TRICOLOGIA**

Felix, G. A.; Piovezan, U.; Quadros, J.; Alves, F.V.; Juliano, R.S; Fioravanti, M.C.S.

Disponível em: <[www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT96.pdf](http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT96.pdf)>