



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E SAÚDE**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, CEP 64049-550

Telefones: 3215-5856, E-mail: [mestradosaude@ufpi.edu.br](mailto:mestradosaude@ufpi.edu.br)

**HISTOMORFOMETRIA DO PÂNCREAS DE EMBRIÕES HÍBRIDOS**  
**GALINÁCEOS (*Gallus gallus*)**

**Mestranda:** Andrezza Braga Soares da Silva

**Orientador:** Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior  
(DMOR / UFPI)

**Teresina**

**2017**

ANDREZZA BRAGA SOARES DA SILVA

**HISTOMORFOMETRIA DO PÂNCREAS DE EMBRIÕES HÍBRIDOS  
GALINÁCEOS (*Gallus gallus*)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre.

**Co-orientador(a):** Prof<sup>ª</sup>. Maíra Soares Ferraz (DMOR/UFPI)

**Teresina**

**2017**

**HISTOMORFOMETRIA DO PÂNCREAS DE EMBRIÕES HÍBRIDOS  
GALINÁCEOS (*Gallus gallus*)**

ANDREZZA BRAGA SOARES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da UFPI, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências e Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior (Presidente – Orientador)  
(DMOR/CCS/UFPI)

---

Prof. Dr. Benedito Borges da Silva (1º Examinador)

---

Profª. Drª Kelly Palombit (2º Examinador - Membro Externo)  
(DMOR / CCS / UFPI)

---

Profª Drª Márcia dos Santos Rizzo (Suplente)  
(DMOR / CCS / UFPI)

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento sempre será a Ele, por tudo que me proporciona e toda a grandeza do Seu Amor.

Agradeço aos meus pais, Francisco Soares e Luzia do Socorro, que me fortalecem com muito amor e carinho, estando ao meu lado a cada passo da minha vida.

À minhas irmãs, Larissa e Milena, por nossa união, conselhos e total apoio nas minhas decisões.

Aos seres que tenho tamanha afeição: Flor, Liu e Kaledy(f), não há amor mais puro que o amor que recebo dos animais, dedico à eles todas as minhas conquistas acadêmicas.

Agradeço com especial carinho aos meus avós maternos (Mãe Luzia e Pai Gonzaga) e minha avó paterna (Vó Maria), por ter a oportunidade de recompensar o imenso afeto que têm por mim.

Aos meus tios(as), padrinhos e madrinhas, em especial, tia Gardênia, padrinho Gonzaguinha, tia Mana (*In memorian*), tio Almiro, madrinha gardênia e tio Neto, por acreditarem que sou capaz e atuarem como 'pais' e 'mães' para mim.

Aos meus primos(as) que os considero como meus irmãos(as) de coração por estarmos sempre juntos: Tay, Érika, Carol, Ju, Leo, Raissa, Mateus e Davi.

À todos os membros da família Barbosa, que sempre me acolheram como parte da família, a quem tenho muita consideração. Ao Franklin, por ser meu fiel companheiro, amigo e namorado, por estar ao meu lado por tanto tempo não deixando faltar amor e cumplicidade.

Aos meus grandes amigos que conquistei na vida em momentos e lugares diferentes, mas que tenho o prazer de agradecer por apenas existirem: amigos da VETERINÁRIA, meninas do ANGLO, equipe da MASMORRA, amigos do grupo GOLD VIP, amigos do MESTRADO e demais amigos especiais.

Reservo um espaço exclusivo nos meus agradecimentos, para aquele que foi o guia, que conduziu todas as minhas vitórias acadêmicas já conquistadas, o nome que mais se repete nas páginas do meu currículo, ao meu orientador Airton Mendes Conde Júnior ou apenas 'Conde' como sempre o chamei, pela nossa trajetória e parceria, e por inúmeras conquistas já atingidas, a você Conde, um MUITO OBRIGADA, nossa parceria é vitalícia e não possui prazo para acabar.

Agradeço às professoras que me co-orientaram e sempre me deram apoio na profissão e na vida, prof Eunice, prof. Márcia Rizzo, prof. Maíra, prof Carla, prof Kelly, prof Selma e demais professores do DMOR.

Aos membros técnicos e servidores do DMOR (Guerra, Dona Geni, Dani, Flávia, Cícero, Daiane, Fábio, Dona Francisca, Liane, Layane, entre outros), agradeço a assistência que recebo de vocês a todo instante no departamento.

Agradeço a Universidade Federal do Piauí que participa diretamente na minha formação e viabilizou a execução dos trabalhos acadêmicos.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Saúde por sua importância na rede de programas nacionais integrando profissionais renomados e valorosas contribuições científicas.

Aos membros da banca examinadora, Prof Airton, Profª Kelly, Prof. Benedito e profª. Márcia, por contribuir significativamente com a qualidade da dissertação e com a minha formação no mestrado.

A todos os animais, que doaram suas vidas e experiências contribuindo para um bem maior: o desenvolvimento da ciência da vida.

Á todos àqueles que tiveram participação direta ou indiretamente neste trabalho e me auxiliaram através de palavras ou atos, compartilhando grandes momentos nessa jornada.

## RESUMO

SILVA, Andrezza Braga Soares da. **HISTOMORFOMETRIA DO PÂNCREAS DE EMBRIÕES HÍBRIDOS GALINÁCEOS (*Gallus gallus*)**. 43 P. Dissertação (Mestrado Ciências e Saúde) Universidade Federal do Piauí. Orientador: Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior. Teresina, 2017.

A multipotencialidade das células-tronco tem permitido aos cientistas vantagens experimentais, entre elas, a definição de processos gênicos para formação dos órgãos. O pâncreas compreende um importante órgão metabólico de carácter endócrino e exócrino que possui origem embrionária de brotos rudimentares que se fusionam para formar o órgão. O desenvolvimento do tecido é denominado histogênese, no pâncreas a histogênese é um processo modulado por uma cadeia de fatores externos. Com isso, o presente trabalho objetiva descrever a histogênese pancreática de embriões híbridos de galinhas (*Gallus gallus*) destacando os eventos que ocorrem no desenvolvimento de constituintes teciduais do pâncreas adulto e analisar parâmetros histométricos que contribuam conhecimentos relativos à estas. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Piauí, previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) com o protocolo nº 040/15. Foram utilizados 120 ovos fertilizados de galinhas domésticas híbridas (*Gallus gallus*) coletados no período de Dezembro de 2015 à agosto de 2016 e mantidos em chocadeira com temperatura e humidade controlados. Foram realizadas coletas diárias de embriões no período de 4 à 21 dias de incubação através de dissecação anatômica pós eutanásia. Os tecidos previamente fixados em formaldeído tamponado à 10% foram submetidos ao processamento histológico e corados em Hematoxilina e Eosina. Por fim, as lâminas confeccionadas foram analisadas em software de imagens para obtenção de dados morfométricos e na sequencia serem submetidos à análise estatística. O pâncreas de embriões híbridos galináceos tem origem por volta do 4º dia de incubação com a formação dos brotos pancreáticos dorsal e ventral, os quais são constituídos de células epiteliais e mesenquimais. Estas células sofrem um processo de transdiferenciação em células exócrinas e endócrinas. Em torno de 12 dias embrionários ocorre a fusão dos brotos e formação do órgão imaturo, o qual dará continuidade ao desenvolvimento do sistema ductal, vascularização e compartimentação das partes endócrina e exócrina. Até o 21º dia de incubação, ainda é possível identificar formas indiferenciadas do tecido, sugerindo que há histogênese pós natal. Durante a histogênese pancreática em galináceos híbridos há alterações significativas na morfometria das porções endócrina e exócrina, juntamente com seus constituintes teciduais, completando a maturação do órgão no período pos-natal. Descrever a histogênese do pâncreas com a utilização de dados histométricos em embriões híbridos galináceos contribui com os esclarecimentos acerca do desenvolvimento embrionário e reafirma a premissa de que galináceos servem como modelo experimental para mamíferos.

**Palavras-chave:** pâncreas; galináceos; histogênese; embrião

## ABSTRACT

SILVA, Andrezza Braga Soares da. **Histomorphometry of pancreas of hybrid chicken embryo (*Gallus gallus*)** 43 P. Dissertation (Master Science and Health). Federal University of Piauí. Prof. Dr. Airton Mendes Conde Júnior. Teresina, 2017.

The multipotentiality of stem cells has allowed scientists to have experimental advantages, including the definition of gene processes for organ formation. The pancreas comprises an important metabolic organ of endocrine and exocrine character that has embryonic origin of rudimentary buds that fuse to form the organ. The development of tissue is called histogenesis, in the pancreas histogenesis is a process modulated by a chain of external factors. The present work aims to describe the pancreatic histogenesis of chick embryos (*Gallus gallus*) highlighting the events that occur in the development of tissue constituents of the adult pancreas and to analyze histometric parameters that contribute knowledge related to them. The research was carried out in the Laboratory of Histotechnology of the Department of Morphology of the Federal University of Piauí, previously approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA / UFPI) with protocol no. 040/15. We used 120 fertilized eggs of domestic hybrid chickens (*Gallus gallus*) collected from December 2015 to August 2016 and kept in a brooder with controlled temperature and humidity. Daily collections of embryos were performed from 4 to 21 days of incubation through anatomical dissection after euthanasia. Tissues previously fixed in 10% buffered formaldehyde were submitted to histological processing and stained with Hematoxylin and Eosin. Finally, the prepared slides were analyzed in image software to obtain morphometric data and in the sequence were submitted to statistical analysis. The pancreas of hybrid chicken embryos originate around the 4th day of incubation with the formation of the dorsal and ventral pancreatic shoots, which are composed of epithelial and mesenchymal cells. These cells undergo a process of transdifferentiation in exocrine and endocrine cells. Around 12 embryonic days the fusion of the shoots and formation of the immature organ takes place, which will continue the development of the ductal system, vascularization and compartmentalization of the endocrine and exocrine parts. Until the 21st day of incubation, it is still possible to identify undifferentiated tissue forms, suggesting postnatal histogenesis. During pancreatic histogenesis in hybrid chickens, there are significant changes in the morphometry of the endocrine and exocrine portions, together with their tissue constituents, completing the maturation of the organ in the postnatal period. Describing the histogenesis of the pancreas using histometric data on hybrid chicken embryos contributes to the clarification of embryonic development and reaffirms the premise that chickens serve as an experimental model for mammals.

**Key-words:** pancreas; chicken; histogenesis; embryo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prancha fotográfica da triagem e desinfecção dos ovos fertilizados (A) e da incubação dos mesmos em chocadeira com temperatura e umidade controlados (B).

Figura 2. Prancha fotomicrográfica de extração do embrião galináceo híbrido do interior do ovo e eutanásia do mesmo. Instrumentos (tesoura e agulha) utilizados para abertura do ovo (A), realização de ‘pique’ na casca com agulha hipodérmica (B), abertura da casca com tesoura em formato de ‘janela’ (C e D), visualização do embrião dentro do ovo (E), anestésicos e seringa para eutanásia do embrião (F), injeção de associação anestésica via intracelômica no embrião (G) e estereomicroscópio utilizado para microdissecação anatômica do pâncreas embrionário (H).

Figura 3. Ilustração da localização endodérmica (em vermelho) dos brotos pancreáticos de galináceos nos estágios 24 (4 dias), 29 (6 dias) e 34 (8 dias) HH obtidos através de mesoscopia. Barra: 0,5 cm.

Figura 4. Prancha fotomicrográfica da topografia do broto pancreático dorsal de embriões de galinhas (*Gallus gallus*) dos dias 4 ao 12 de incubação e desenho esquemático do posicionamento dos órgãos em corte transversal. Rim direito (rd), Rim Esquerdo (re), Fígado (Fi), Cloaca (cl) Gônada direita (Gd); Gônada esquerda (Ge); Aorta (A); Intestino (In); Broto dorsal (Bd); Broto ventral (Bv). Barra: 600µm; 20x (4, 5, 6); 16x (7, 8); 12,5x (9); 10x (10); 7,5x (11, 12). Hematoxilina-eosina.

Figura 5. Prancha fotomicrográfica do broto pancreático dorsal nos dias 4 ao 12 de incubação em embriões híbridos de galinhas (*Gallus gallus*) e gráficos representativos da mensuração estatística do crescimento da área do broto no decorrer dos dias e dos desvios padrões da média. Barra: 50µm; 400x (4-12). Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo).

Figura 6. Prancha fotomicrográfica do parênquima do broto pancreático dorsal de galináceos híbridos (*Gallus gallus*) no estágio 27HH (5 dias de incubação) (A) com destaque em maior aumento os constituintes celulares do broto no período inicial (B): células tronco mesenquimais (C, E) e células epiteliais microvesiculares, com destaque para as vesículas (cabeça de seta) (D, F) observadas em corte histológico e desenho gráfico, respectivamente. E gráficos representativos da mensuração estatística do número de células epiteliais em um diâmetro de 50µm dos dias 4 ao 12 de incubação e dos desvios padrões da média. Barra: 25µm; 200x (A); 400x (B); 1000x (C, D); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo).

Figura 7. Prancha fotomicrográfica dos ductos pancreáticos de embriões híbridos galináceos (*Gallus gallus*) do 6º ao 21º dia de incubação (6-21) destacando a parede do ducto. E gráficos representativos da mensuração estatística da espessura da parede dos ductos pancreáticos dos dias 6 ao 21 de incubação e dos desvios padrões da média. Barra: 25µm; 200x (20); 400x (11, 12, 17, 18, 19, 21); 1000x (6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo).

Figura 8. Prancha fotomicrográfica dos ácinos pancreáticos de embriões híbridos galináceos (*Gallus gallus*) do 8º ao 21º dia de incubação (8-21). E gráficos representativos da



mensuração estatística da área dos ácinos e do diâmetro do lúmen acinar dos dias 6 ao 21 de incubação com seus respectivos gráficos dos desvios padrões da média. Barra: 25µm; 1000x (8-21); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo);  $F_{cal} < F_{tab}$  (não significativo).

Figura 9. Prancha fotomicrográfica das ilhotas pancreáticas de galináceos híbridos (*Gallus gallus*) do 14º ao 21º dia de incubação (14-21). E gráficos representativos da mensuração estatística da área das ilhotas pancreáticas dos dias 14 ao 21 de incubação com seus respectivos gráficos dos desvios padrões da média. Barra: 50µm; 400x (17, 18, 20); 1000x (14, 15, 16, 19, 21); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo). Cabeça de seta branca: célula A. Cabeça de seta preta: célula B.

Figura 10. Prancha fotográfica do embrião híbrido galináceo (*Gallus gallus*) com 21 dias de incubação, destacando a cavidade toraco-abdominal (A), o conjunto duodeno-pâncreas ex situ em aspecto anatômico (B) e em corte histológico (C), e uma secção histológica do parênquima pancreático (D) evidencializando o aglomerado de grânulos zimógenos (cabeça de seta preta) no parênquima (D1), ilhota pancreática com histogênese incompleta (D2), pontos de desarranjo celular (D3) e figuras de mitose típicas (cabeça de seta branca) (D4). Du: duodeno; Pa: pâncreas. Barra: 1cm (A, B); 600 µm (C); 50 µm (D, D1, D2, D3, D4). Hematoxilina-eosina.

## **LISTA DE APENDICES**

**Apêndice 1 – Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí.**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DMOR – Departamento de Morfologia  
UFPI – Universidade Federal do Piauí  
PROF – Professor  
DR - Doutor  
CCS – Centro de Ciências da Saúde  
CM – Centímetros  
RD – Rim direito  
RE – Rim esquerdo  
FI – Fígado  
CL – Cloaca  
GD – Gônada direita  
GE – Gônada esquerda  
A – Aorta  
IN – Intestino  
BD – Broto dorsal  
BV – Broto ventral  
µm – micrômetro  
FCAL – F calculado  
FTAB – F tabelado  
HH – Hamburger e Hamilton  
DU – Duodeno  
PA – Pâncreas  
PDX-1 – Pancreático e Duodenal Homeobox 1  
PTF-1 – Complexo do fator de transcrição 1 do pâncreas  
NEUROG3 – Neurogenina 3  
CS – Estágio Carnegie  
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
MM – Milímetro  
G – Grama  
µM<sup>2</sup> - Micrômetro quadrado

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>13</b>
<b>2. Revisão de Literatura</b>	<b>15</b>
<b>2.1.O pâncreas</b>	<b>15</b>
<b>2.2.Desenvolvimento do Pâncreas</b>	<b>16</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>3.1.Objetivos gerais</b>	<b>18</b>
<b>3.2.Objetivos Específicos</b>	<b>18</b>
<b>4. Metodologia</b>	<b>19</b>
<b>4.1.Aspectos éticos e legais</b>	<b>19</b>
<b>4.2. Obtenção e Acondicionamento das amostras</b>	<b>19</b>
<b>4.3. Eutanásia e Macroscopia</b>	<b>19</b>
<b>4.4.Processamento histológico e Coloração por Hematoxilina eosina</b>	<b>21</b>
<b>4.5.Análise morfométrica</b>	<b>21</b>
<b>4.6.Análise estatística</b>	<b>22</b>
<b>5. Resultados e Discussão</b>	<b>23</b>
<b>5.1.Histogênese e Histometria dos brotos pancreáticos</b>	<b>23</b>
<b>5.2.Histogênese e Histometria da porção exócrina</b>	<b>29</b>
<b>5.3.Histogênese e Histometria da porção endócrina</b>	<b>33</b>
<b>5.4.Vasculogênese do pâncreas</b>	<b>36</b>
<b>5.5.Histogênese pancreática pós-natal</b>	<b>36</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>38</b>
<b>7. Referências</b>	<b>39</b>
<b>8. Apêndice</b>	<b>45</b>

## 1.Introdução

A rotina médica tem contado com a complementariedade na prática de conhecimentos morfofisiológicos para esclarecer os mecanismos desencadeadores das doenças (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; SERUP, 2012). Esta necessidade fez com que as instituições acadêmicas investissem em pesquisas com células embrionárias, com resultados favoráveis encontrados na clínica e terapia de doenças degenerativas, o que proporcionou ao paciente melhor qualidade de vida em curto prazo. Explorar células com alto poder de diferenciação permitiu que o cientista se deparasse com uma infinidade de perguntas e, também vantagens experimentais, graças à multipotencialidade dessas células (PRANKE, 2004; LOJUDICE, SOGAYAR, 2008).

As células embrionárias nos animais correspondem à células-tronco extraídas ainda em fase embrionária com alta capacidade de transdiferenciação ou de transformar-se em qualquer célula. Diferem das células-tronco adultas que por serem retiradas do próprio paciente apresentam baixo risco de rejeição, porém a capacidade de transmutação é inferior à de células embrionárias (VERFAILLIE, 2002).

A propagação e a diferenciação celular foram testemunhadas pela primeira vez no século XVIII. Porém, somente dois séculos depois embriologistas alemães iniciaram experimentos com células tronco embrionárias e após sucessivas tentativas de isolamento dessas células estaminais obtiveram sucesso na reconstituição de tecidos injuriados (NOBRE; PEDRO, 2014). Este foi, sem dúvida, um passo importante para complementar a terapia de enfermidades causadoras de injúria tecidual, entre elas, a diabetes mellitus, a fibrose cística e neoplasias pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

A utilização de embriões humanos em pesquisas ainda enfrenta barreiras éticas que inviabilizam os procedimentos e contribuem para a persistência de dúvidas no que diz respeito os mecanismos desencadeadores das doenças (STEEGERS-THEUNISSEN; STEEGRS, 2015; ZHAO et al., 2015). Como uma forma de substituir a utilização desta espécie, lançou-se mão de estudos em embriões de galinhas, por reunirem vantagens: serem de fácil obtenção e monitoramento, curto período de desenvolvimento, sua maior sensibilidade à ação de agentes químicos, além de mimetizarem o desenvolvimento embrionário de mamíferos (SERUP, 2012), visto que, tanto o processo de gastrulação como a subsequente formação de órgãos são orquestrados por genes e movimentos celulares similares àqueles nos embriões mamíferos (FORTES ET AL., 2009; ALMEIDA ET AL., 2015; SOUSA, 2015).

Portanto, os embriões galináceos fornecem um importante sistema experimental em que se pode tratar de questões fundamentais referentes ao desenvolvimento de vertebrados (CANO, 2012). Torna-se importante a descrição das transformações celulares que o pâncreas passa durante sua formação embrionária em modelos animais graças a sua semelhança com os mesmos eventos vivenciados em

humanos e, assim, poder buscar nos primórdios da sua formação respostas para a ocorrência de processos degenerativos.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. O pâncreas

O pâncreas é um órgão abdominal posicionado na região retro peritoneal superior esquerda pertencente aos sistemas endócrino e digestivo (HANSEN, 2015). É uma glândula anfícrina de superfície irregular e característica alongada que se divide anatomicamente em cabeça, corpo e cauda. A cabeça é a parte mais extensa, circundada pela curvatura duodenal a direita dos vasos mesentéricos superiores. O corpo é uma continuidade da cabeça e têm fim na extremidade oposta formando a cauda que é relativamente móvel (LONGNECKER, 2014).

A glândula relaciona-se diretamente com o duodeno conectando-se por um sistema de ductos que carregam enzimas e substâncias digestivas para a mucosa duodenal. Além de enzimas, o pâncreas participa da atividade endócrina mediante a produção de hormônios. A sua porção exócrina abrange a maior parte do parênquima pancreático e atua na produção de enzimas digestivas (bicarbonato e mucinas) secretadas no lúmen intestinal (AHNFELT-RONNE et al., 2010). Em contrapartida, a porção endócrina desempenha a função sintetizadora hormonal que regula a absorção alimentar e o metabolismo celular do organismo (PAN; WRIGHT, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Histologicamente, uma cápsula de tecido conjuntivo reveste o pâncreas e envia septos para o seu interior, separando-o em lóbulos. O órgão apresenta uma rede interna de ductos e vasos essencial para a secreção de substâncias pelas porções endócrina e exócrina (EURELL; FRAPPIER, 2006). O pâncreas endócrino compreende arranjos celulares dispostos pelo parênquima pancreático formando ilhas ou ilhotas pancreáticas (SMEETS, 2015). Com o advento da microtecnologia, cientistas têm alcançado a proeza de diferenciar cinco tipos celulares diferentes compondo essas ilhas celulares: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), pp, delta ( $\delta$ ) e mais recentemente descritas, épsilon ( $\epsilon$ ). Cada uma dessas células atua na síntese e secreção de hormônios importantes no metabolismo (PAN; WRIGHT, 2011).

As células alfa ( $\alpha$ ) do pâncreas são responsáveis pela síntese e secreção do hormônio glucagon no sangue, este por sua vez, liga-se a receptores de glucagon presentes no fígado favorecendo a catálise do glicogênio em glicose. De forma antagônica, as células beta ( $\beta$ ) detêm da produção de um hormônio que executa o trajeto inverso do glucagon, auxiliando na absorção de glicose pelas células hepáticas, musculares e adiposas reduzindo a sua concentração sérica no sangue (RIEDEL et al., 2012).

As células PP produzem o hormônio Polipeptídio Pancreático, o qual desempenha atividade sobre a porção exócrina do pâncreas, inibindo suas secreções enzimáticas e estimulando a liberação de enzimas pelas células principais do estômago, efeito adverso da colecistoquinina (hormônio gastrointestinal) (WANG et al., 2013). Já as células delta ( $\delta$ ), produzem somatostatina que similar à

anterior, têm papel regulatório, no entanto, da porção endócrina, modulando a secreção de insulina e glucagon no pâncreas (GANS et al., 2012). E não menos importante, as células épsilon ( $\epsilon$ ), descritas recentemente estão em menor número que as anteriores mas têm a importância de produzir, juntamente com as células estomacais, o hormônio grelina, indicador da ‘fome’ e ‘saciedade’ (EGIDO et al., 2002; PAN; WRIGHT, 2011).

O pâncreas exócrino, por conseguinte, apresenta na sua constituição células denominadas ‘acinares’ graças à disposição no parênquima e, uma rede de ductos que viabilizam a excreção das enzimas para o duodeno (MURTAUGH; KEEFE, 2015). As células acinares, múltiplas e de aparência piramidal, possuem citoplasma intensamente basofílico pela grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso em torno do seu núcleo circular. Na porção apical de cada compartimento acinar, encontram-se diversos grânulos eosinófilos precursores de enzimas pancreáticas, por isso nomeados grânulos zimogênios. O sistema ductal, composto de ductos intercalares, interlobulares e extralobulares é composto de epitélio que varia de cúbico simples à cilíndrico simples a medida que partem dos ácinos e se anastomosam em ducto pancreático comum (BEUCHER et al., 2012).

## **2.2. Desenvolvimento do pâncreas**

A organogênese pancreática compreende uma combinação de eventos de sinalização altamente complexos e coordenados (PAN; WRIGHT, 2011). Inicia-se com a diferenciação de dois brotos: ventral e dorsal, estes oriundos de células endodérmicas que se proliferaram do terço final do intestino anterior pela sinalização simultânea da parede lateral do mesoderma, da notocorda e das células endoteliais da aorta dorsal (BOTTON; MAJITHIA; MELTON, 2001; ALCANTARA et al., 2013; FAURE et al., 2013). O broto ventral evagina-se da base do divertículo hepático, enquanto que o broto dorsal se desenvolve da parede dorsal do duodeno em formação. A organogênese pancreática se completa após o procedimento de rotação intestinal, na qual os brotos pancreáticos se fusionam e as porções endócrinas e exócrinas do pâncreas se distinguem (RUTH; MARK, 2005; BLAKE, 2011).

Concomitante à união dos brotos pancreáticos, ocorre o processo de citogênese, no qual as células se maturam pela diferenciação celular. Mesmo após a formação anatômica final do órgão, a citogênese pancreática perdura até o momento que a maioria das células do parênquima deixam de ser progenitoras e demonstrem aspecto histológico diferenciado (TIWARI; MISHRA; KAUL, 2015). Pesquisadores geneticistas ao realizarem estudos em pâncreas embrionário de camundongos, relataram que a diferenciação é desencadeada através de células progenitoras dependentes da sinalização dos genes Pdx-1, Ptf-1a e Neurog3, os quais ao serem submetidos à mutação inviabilizaram a formação celular pancreática (MURTAUGH; KOPINKE, 2008).



Estas células-tronco consideradas ‘ponto de partida’ na diferenciação celular do pâncreas, foram inicialmente descritas em estudos envolvendo terapias de reposição celular, nas quais observou-se a capacidade regenerativa destas em originar novas ilhotas pancreáticas. No entanto, pesquisas com imunomarcação e isolamento de células mesenquimais *in vitro* reforçaram a teoria de que as células progenitoras desenvolvem-se a partir de ‘cordões sólidos’ formando ductos imaturos. Estes por sua vez, lançam grupos celulares estaminais para o parênquima que darão origem a futuros ácinos e ilhotas (BONNER-WEIR; SHARMA, 2002; DOR et al., 2004).

Foram postulados diferentes tipos de células progenitoras pancreáticas, entre elas, as periductais e as perinsulares que possuem nestina, um filamento intermediário que marca as progenitoras neuronais ou que possuem os fatores de transcrição Pdx-1 e Neurog3, moléculas chave durante o desenvolvimento embrionário pancreático (EYNARD; VALENTICH; ROVASIO, 2011). As células periductais também foram apontadas como progenitoras em pesquisas com embriões humanos, no qual o órgão apresentou período citogênico do 9 ao 19 Estágio Carnegie (EC), análogo ao de outros modelos experimentais já estudados, como por exemplo, a galinha (*Gallus gallus*) que tem o seu desenvolvimento pancreático entre o 24 e o 38 Estágio Hamburger e Hamilton (HH), isto se aproxima de 4 à 12 dias de incubação (HAMBURGUER; HAMILTON, 1951; O’RAHILLY; MÜLLER, 1987). Mamíferos, aves, répteis e anfíbios possuem o pâncreas com desenvolvimento embrionário similar (SLACK, 1995).

Durante o desenvolvimento do pâncreas, os brotos dorsal e ventral contribuem separadamente para a formação de estruturas do órgão (KUME, 2005). Pela imunomarcação com antígenos que expressam resposta exócrina (amilase) e endócrina (insulina) constatou-se que enquanto a porção exócrina provém da contribuição de ambos os brotos pancreáticos, a porção endócrina veio exclusivamente da contribuição do broto dorsal em galinhas da raça White Legorn (MATSUURA ET AL., 2009). Além disso, há diferenças na participação que os brotos exercem também para a anatomia macroscópica do órgão adulto, havendo contribuição do broto dorsal em todas as estruturas (cabeça, tronco e cauda) e restringindo o broto ventral a complementar fisicamente apenas a cabeça do pâncreas em mamíferos (CASILLAS ET AL., 2016).

Após o período de brotos, ocorre a diferenciação das células epiteliais em pancreáticas adultas e compartimentação do parênquima em porções endócrina e exócrina finalizando o seu desenvolvimento (BONNER-WEIR, 2000), fato que ainda há controvérsias, por não se esclarecer completamente até quando o processo de histogênese pancreática perdura.

### **3.Objetivos**

#### **3.1.Objetivos Gerais**

Descrever a histogênese pancreática de embriões híbridos de galinhas (*Gallus gallus*) destacando os eventos que ocorrem no desenvolvimento de constituintes teciduais do pâncreas adulto e analisar parâmetros histométricos que contribuam com conhecimentos relativos à estas.

#### **3.2.Objetivos específicos**

- 1 - Descrever a organogênese do pâncreas de galinhas (*Gallus gallus*)
- 2- Esclarecer o deslocamento dos brotos pancreáticos durante a sua formação inicial em embriões de galinhas (*Gallus gallus*).
- 3- Descrever a localização topográfica do broto pancreático dorsal em relação as demais estruturas embrionárias em embriões de galinhas (*Gallus gallus*).
- 4- Caracterizar o desenvolvimento morfométrico do broto pancreático dorsal durante os dias 4 e 12 de incubação em embriões de galinhas (*Gallus gallus*).
- 5- Identificar os constituintes celulares do broto pancreático dorsal e suas transformações durante o desenvolvimento do broto em embriões de galinhas (*Gallus gallus*).
- 6- Mensurar a parede dos ductos pancreáticos durante a histogênese em embriões híbridos de galinhas (*Gallus gallus*).
- 7- Esclarecer a diferenciação tecidual exócrina, endócrina e da vascularização durante a histogênese do pâncreas em embriões híbridos de galinhas (*Gallus gallus*).
- 8- Compreender as alterações no pâncreas embrionário de 21 dias que sugerem desenvolvimento pós-natal.

## 4. Metodologia

### 4.1. Aspectos éticos e legais

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Histotécnica do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Piauí, seguindo os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) com o protocolo nº 040/15 (Apêndice I), que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata para fins de Pesquisa Científica.

### 4.2. Obtenção e acondicionamento das Amostras

Foram utilizados 120 ovos fertilizados de galinhas domésticas híbridas (*Gallus gallus*) obtidos de propriedade particular da zona rural de Teresina-Pi. A alimentação dos reprodutores foi à base de ração comercial (Farelo de Milho 6,3g; Farelo de Soja 3,55g; Calcário Calcítico 0,09g; Sal Mineral 0,05g; Vitaminas e Minerais 0,01g) e água *ad libitum*. Os ovos foram coletados no período de Dezembro de 2015 à agosto de 2016 e encaminhados ao Laboratório de Histotécnica e Embriologia (DMOR/CCS/UFPI) para serem inicialmente submetidos à uma triagem que compreende em selecionar os ovos que não apresentem imperfeições na casca, na sequência foram desinfetados com solução de Hipoclorito de Sódio 0,1% (Indaclor, Brasil), identificados e mantidos em chocadeira (Ecoterm IP 70D, Brasil) à temperatura média de 37°C e 60% de umidade relativa.

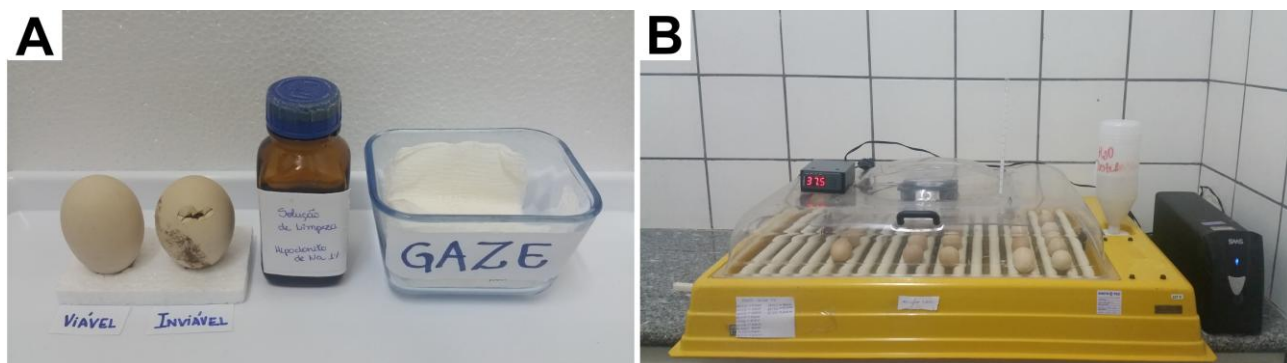


Figura 1. Prancha fotográfica da triagem e desinfecção dos ovos fertilizados (A) e da incubação dos mesmos em chocadeira com temperatura e umidade controlados (B).

### 4.3. Eutanásia e Macroscopia

Foram realizadas coletas diárias de embriões no período de 4 à 20 dias de incubação. Para isto, o procedimento de coleta iniciou-se com uma incisão circular lateral na casca do ovo com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para então ser rebatida de modo a formar uma 'janela' que facilite a visualização do embrião. Na sequência, foi instituído o protocolo anestésico à base de uma associação de Cloridrato de Xilazina (Syntec®, Brasil) na dose 40 mg/kg e Cloridrato de Cetamina (Syntec®, Brasil) na dose 100

mg/kg injetados por gotejamento na superfície para os embriões de 4 à 12 dias e, intracelômica (IC) para os fetos de 13 à 20 dias. Com exceção do galináceo (neonato) de 21 dias que foi eutanasiado após o nascimento com a mesma solução anestésica via intracelômica.

Após o óbito dos embriões, foi realizado o procedimento de extração da casca do ovo, onde foram utilizados pinça anatômica e tesoura cirúrgica para total despreendimento do mesmo. Inicialmente, foram seccionados os anexos e membranas embrionárias, seguidos pela separação dos embriões das demais estruturas presentes nos ovos. Com os embriões individualizados (4 à 20 dias), foram encaminhados a placa de petri para um Estereomicroscópio Binocular (Tecnival, China), no qual foram submetidos à técnica de dissecação a fim de extrair o pâncreas.

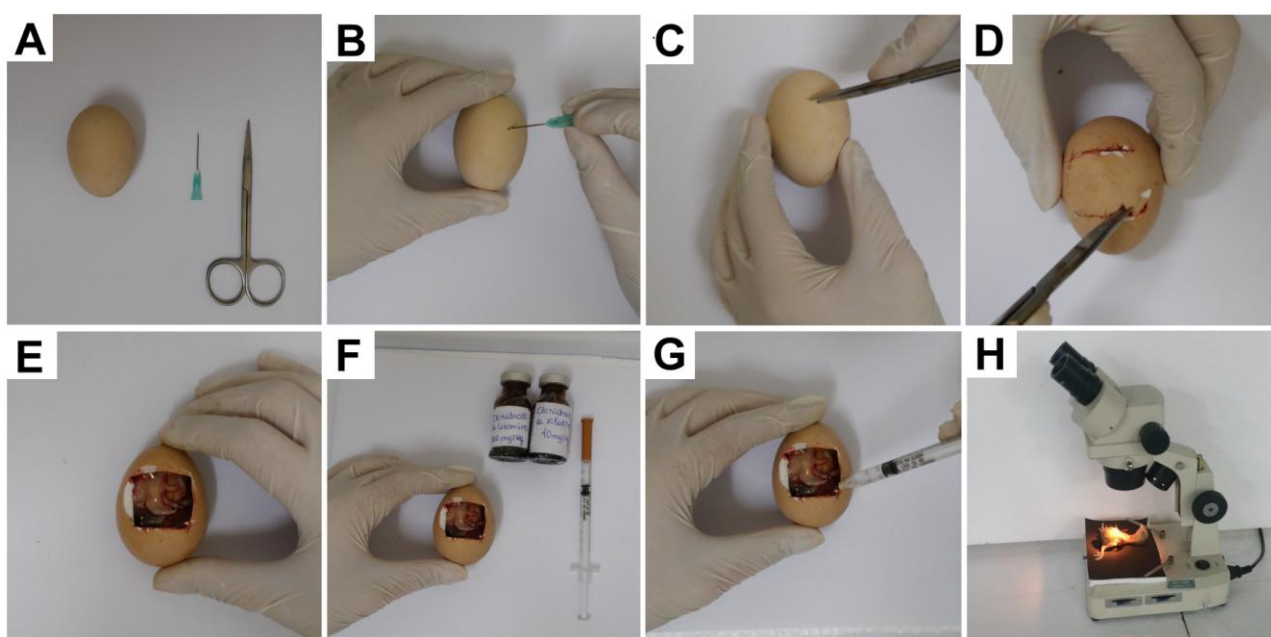


Figura 2. Prancha fotomicrográfica de extração do embrião galináceo híbrido do interior do ovo e eutanásia do mesmo. Instrumentos (tesoura e agulha) utilizados para abertura do ovo (A), realização de 'pique' na casca com agulha hipodérmica (B), abertura da casca com tesoura em formato de 'janela' (C e D), visualização do embrião dentro do ovo (E), anestésicos e seringa para eutanásia do embrião (F), injeção de associação anestésica via intracelômica no embrião (G) e estereomicroscópio utilizado para microdissecação anatômica do pâncreas embrionário (H).

Com o auxílio da tesoura oftálmica, embriões de 12 a 20 dias e neonatos (21 dias) submeteram-se a incisão mediana ventral na cavidade celômica no sentido caudo-cranial, para total exposição dos órgãos, sendo rebatidos pele e estruturas anexas. Na sequência, o pâncreas foi identificado e individualizado da curvatura interna duodenal, sendo condicionado em um Tubo Falcon contendo solução aquosa de formaldeído a 10% tamponado com Fosfato de Sódio Monobásico e Dibásico e, correção de pH com Hidróxido de Sódio (pH 7,2) para fixação.

No caso de embriões e fetos de 4 à 12 dias, onde o pâncreas encontra-se ainda na forma de brotos, foram utilizados embriões completos para fixação tecidual. Por fim, foram realizadas fotografias

digitais (Nikon Coolpix P500) das estruturas e órgãos embrionários coletados e suas dimensões mensuradas utilizando Paquímetro Digital 150mm (Kingtools, Japão).

#### **4.4. Processamento Histológico e Coloração por Hematoxilina e Eosina**

Os tecidos previamente fixados em formaldeído tamponado à 10% por 48 horas, foram submetidos ao processamento histológico e corados em Hematoxilina e Eosina. Este procedimento iniciou com uma desidratação tecidual com subsequentes imersões de 30 minutos em concentrações crescentes de Álcool etílico (Synth, Brasil) 70%, 80%, 90% e 100% (duas vezes). Após esta etapa, as amostras foram diafanizadas ou clarificadas em dois banhos consecutivos contendo solução de Xilol PA (Anidrol, Brasil) por 30 minutos cada. Na sequência, o material biológico foi submetido à duas imersões de 30 minutos cada em Parafina Histológica (Easy Path, Brasil) líquida mantida em Estufa à 60°C. Após a imersão em parafina, os órgãos foram emblocados em disposição longitudinal.

Os blocos confeccionados, foram sujeitos à cortes sequenciais de 5µm de espessura em Micrótomo RM2235 (Leica Biosystem, Brasil) despejados em lâminas foscas de vidro para início da coloração. As lâminas, primeiramente, permaneceram cerca de 10 min em estufa à 60°C para desparafinização, procedimento que se completou com dois banhos consecutivos de 5 minutos cada em solução contendo Xilol PA (Anidrol, Brasil). Foi realizada uma reidratação tecidual através de uma sequência de banhos de 3 minutos das lâminas em soluções decrescentes de Álcool Etílico (Synth, Brasil) 100% (três vezes), 90%, 80% e 70%, finalizando a hidratação com um banho de 10 minutos em água corrente.

Assim, o tecido foi imerso em Hematoxilina por 45 segundos seguido de uma lavagem em água corrente por 5 minutos, até remoção do excesso da coloração. Na sequência, os cortes foram corados por eosina durante 30 segundos. Em seguida, os mesmos foram submetidos à banhos de 5 minutos em Alcool Etílico (Synth, Brasil) 100% e 70%, seguido de dois banhos em Xilol PA (Anidrol, Brasil) por 5 minutos cada. Por fim, as lâminas foram montadas em lâmina-lamínula com o auxílio de Enterlan (Merck, Alemanha).

#### **4.5. Análise Morfométrica**

Após o processamento histológico dos tecidos foram realizadas análises histomorfométricas dos constituintes celulares seguindo os parâmetros:

<i>4 a 12 dias (24 – 38 estágio HH)</i>	<i>13 aos 21 dias (39 – 46 estágio HH)</i>
<i>Área do broto dorsal (4-12 dias)</i>	<i>Espessura da parede dos ductos pancreáticos (13-21 dias)</i>
<i>Quantidade de células epiteliais em um raio de 50 <math>\mu\text{m}^2</math> de diâmetro (4-12dias)</i>	<i>Área das ilhotas pancreáticas (14-21 dias)</i>
<i>Espessura da parede dos ductos Pancreáticos (6-12dias)</i>	<i>Área dos ácinos (13-21dias)</i>
<i>Área dos ácinos (8-12dias)</i>	<i>Diâmetro do lúmen acinar (13-21dias)</i>
<i>Diâmetro do lúmen acinar (8-12dias)</i>	

As imagens fotomicrográficas foram obtidas utilizando uma câmera de vídeo digital (Leica) acoplada a um microscópio de luz (Leica Microsystems DM 2000) que envia as imagens para um computador (Pentium Dual Core Duo) para um software de imagens (Leica Image Manager). As fotomicrografias assim capturadas foram visualizadas, e gravadas para posterior utilização com o programa de análise de imagem ‘Image – Pro Plus’ (MediaCybernetics), com o qual foram mensurados (em  $\mu\text{m}$  e  $\mu\text{m}^2$ ) os parâmetros dos constituintes celulares do tecido pancreático nos diferentes dias de incubação.

#### **4.6. Análise Estatística**

Os dados foram organizados em planilha eletrônica para análise de variância (Anova), segundo o programa estatístico SigmaStat®. Na sequência, os parâmetros que apresentaram diferenças significativas pelo teste de Fisher ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ) foram submetidos ao teste de Tukey. Os dados foram expressos em médias e a significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$ . Foram confeccionados gráficos das médias obtidas *versus* dias de incubação e gráficos dos desvios padrões da média.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Histogênese e histometria dos brotos pancreáticos

O pâncreas de galináceos inicia seu desenvolvimento com a formação de dois brotos pancreáticos (dorsal e ventral) após 96 horas de incubação (estágio 24 HH), originando-se do endoderma da região posterior do intestino primitivo anterior (KIM; HEBROK; MELTON, 1997). Este evento está bem esclarecido em camundongos e seres humanos, nos quais os brotos originam-se de forma consecutiva. Primeiro o broto dorsal que recebe sinais indutivos da aorta dorsal, notocorda e mesenquima adjacente, e na sequência, o broto ventral que é modelado por sinais provenientes da placa lateral do mesoderma, mesoderma cardíaco e septo transversal (PAN, WRIGHT, 2011).

Os brotos pancreáticos por volta do 4º dia de incubação se dispõem no terço médio do corpo do embrião galináceo híbrido e deslocam-se no sentido craniocaudal a medida que ocorre o crescimento longitudinal e espessamento dos somitos (Figura 1), tais evidências foram constatadas através de microdissecações. Estes dados são confirmados por técnicas de mapeamento desenvolvidas por pesquisadores os quais afirmam que durante os estágios 10HH ao 12HH há segregação de precursores pré-pancreáticos a nível do 2º somito indo em direção ao 15º somito, e a partir de então os brotos se desenvolvem seguindo a orientação craniocaudal (LE DOUARIN, 1964; MATSUSHITA, 1996; MATSUURA et al., 2009)

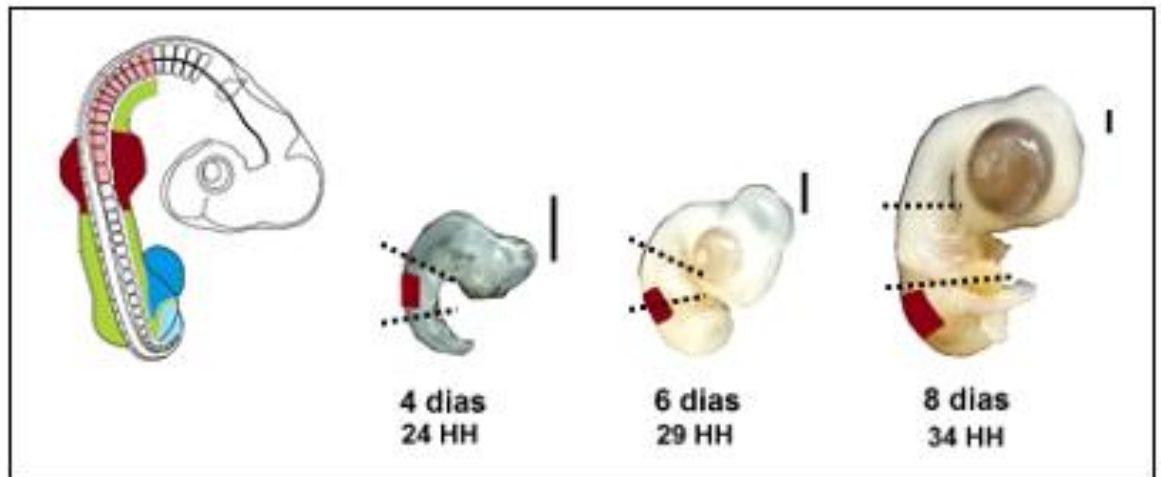


Figura 3. Ilustração da localização endodérmica (em vermelho) dos brotos pancreáticos de galináceos nos estágios 24 (4 dias), 29 (6 dias) e 34 (8 dias) HH obtidos através de mesoscopia. Barra: 0,5 cm.

O período de brotos pancreáticos na galinha tem início por volta do estágio 24HH e finalizando no estágio 38HH (aproximadamente 12 dias de incubação) ocorrendo fusão dos mesmos e origem de um único órgão pancreático, o qual sofrerá diferenciações celulares para maturação do parênquima. Há relatos que o pâncreas, durante sua formação, vivencia dois processos gênicos: a organogênese e a histogênese. O primeiro inicia no período de brotos e corresponde à formação anatômica do órgão, e o segundo refere-se à maturação tecidual onde células até então indiferenciadas irão se especializar para composição das partes endócrina e exócrina pancreática ou processo de compartimentação (BENCOSME, 1955; SHIH, WANG, SANDER, 2013).

O broto pancreático dorsal em galináceos híbridos é maior e mais cranial que o ventral, está voltado para o mesentério dorsal do embrião, enquanto que o broto ventral é menor e está disposto próximo do divertículo hepático adjacente ao mesentério ventral. Topograficamente em um corte transversal, é possível distinguir o broto dorsal das demais estruturas embrionárias, o mesmo encontra-se lateral ao endoderma, entre o rim embrionário esquerdo, o divertículo da moela e a aorta dorsal (Figura 4).

Durante os estágios embrionários iniciais, o endoderma lateral ao intestino anterior emerge duas estruturas: o broto dorsal pancreático e o divertículo hepático, deste último diferencia-se o broto ventral pancreático. Com isso, os brotos apresentam origem em estágios de desenvolvimento diferentes havendo maior contribuição do broto dorsal na formação do pâncreas adulto (SHIH; WANG; SANDER, 2013). Isto explica a diferença de tamanho entre os brotos e a localização do broto dorsal mais próxima da topografia final do pâncreas nos animais estudados.

Há relatos da origem pancreática por três e não apenas dois rudimentos em galinhas White Legorn, sendo um dorsal e dois ventrais (BELLAIRS; OSMOND, 2005), no entanto não foram encontradas evidências do terceiro broto nos embriões analisados, necessitando para isto do emprego de técnicas moleculares. Com isso, estes dados ainda enfrentam controvérsias no que se refere a contribuição que esses rudimentos exercem na formação do órgão adulto.



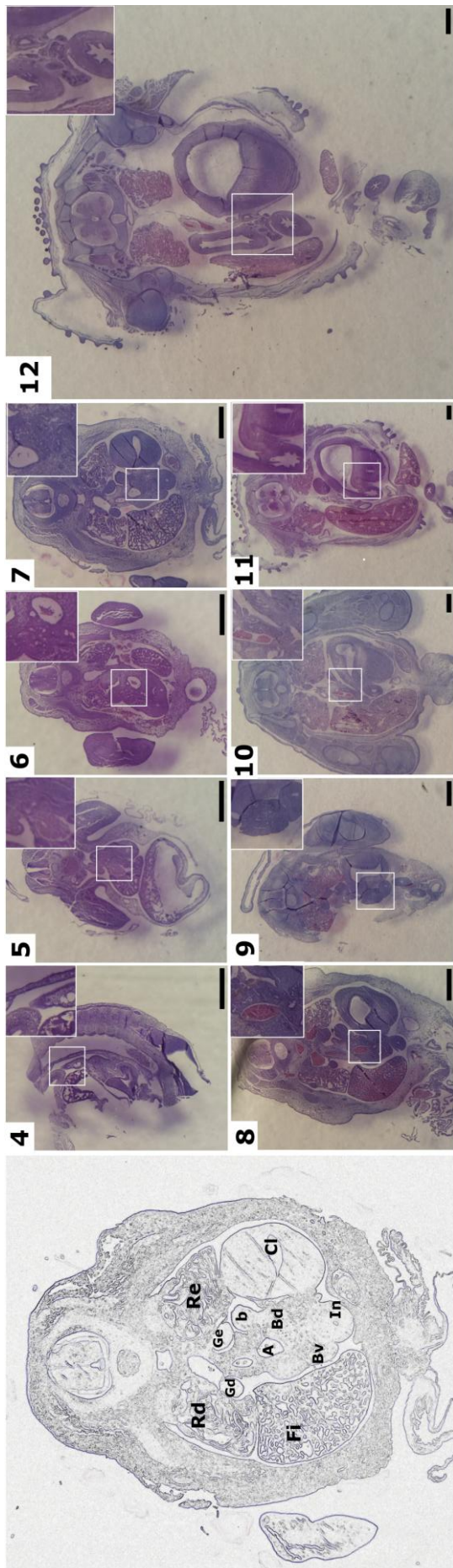


Figura 4. Prancha fotomicrográfica da topografia do broto pancreático dorsal de embriões de galinhas (*Gallus gallus*) dos dias 4 ao 12 de incubação e desenho esquemático do posicionamento dos órgãos em corte transversal. Rim direito (rd), Rim Esquerdo (re), Fígado (Fi), Cloaca (cl) Gônada direita (Gd); Gônada esquerda (Ge); Aorta (A); Intestino (In); Broto dorsal (Bd); Broto ventral (Bv). Barra: 600µm; 20x (4, 5, 6); 16x (7, 8); 12,5x (9); 10x (10); 7,5x (11, 12). Hematoxilina-eosina.

Do estágio 24HH (4 dias) ao estágio 38HH (12 dias), o broto dorsal apresenta aumento significativo de 81 vezes a área inicial (em corte transversal), partindo de 4 dias aumenta gradativamente e expressa crescimento exaltado apenas nos estágios finais de broto (Figura 5. Gráfico), onde o embrião está passando por um processo de rotação do tubo intestinal para união dos brotos e todas as estruturas adjacentes estão hipertrofiando proporcionalmente (HEBROK et al., 2000). O tamanho do broto dorsal chega a triplicar nos dias 11 e 12 de incubação, período correspondente à união dos dois brotos (ventral e dorsal) formando um único órgão pancreático.

O aumento no tamanho dos brotos pancreáticos durante o desenvolvimento é um processo vivenciado por modelos embrionários mamíferos e em aves, sinalizado por fatores de transcrição, entre eles, fator homeobox pancreático e duodenal 1 (PDX-1), região determinante sexual caixa 9 (SOX-9) e proteína de ligação 4 (GATA4) principalmente (JENNINGS et al., 2015). Estes induzem a maturação de células do mesênquima que por sua vez proliferam-se por divisões celulares, ao mesmo tempo que se diferenciam em células adultas (JENNINGS et al., 2013).

Este comportamento dos constituintes celulares dos brotos é gradativo e momentâneo na galinha, inicia no 4º dia de incubação onde as células passam por um aumento principalmente em quantidade e volume, até chegar uma fase em que o broto interrompe parcialmente o seu crescimento (por volta do 12º dia de incubação) e inicia a maturação celular, período que coincide com a fusão dos rudimentos dorsal e ventral e período de citogênese pancreática bem descrito por Przybylski (1967). Em modelos murinos e humanos o aumento dos brotos e a citogênese são eventos semelhantes ao de galináceos e passam pelas mesmas transformações celulares (POUR, 1984; GUPTA; SATYANARAYAN; ASHISH, 2014).

No início da histogênese pancreática na galinha as células se desenvolvem de um sistema de cordões celulares epiteliais organizados no mesmo padrão de ácinos adultos unidos por junções e envoltos por um ‘tapete’ de células tronco mesenquimais (Figura 6). As células epiteliais apresentam microvesículas no seu citoplasma, as quais deslocam-se no sentido do ápice celular e diminuem de número à medida que dão lugar ao lúmen acinar. Além de número, as células epiteliais microvesiculares aumentam de tamanho adquirindo um aspecto pseudoestratificado.

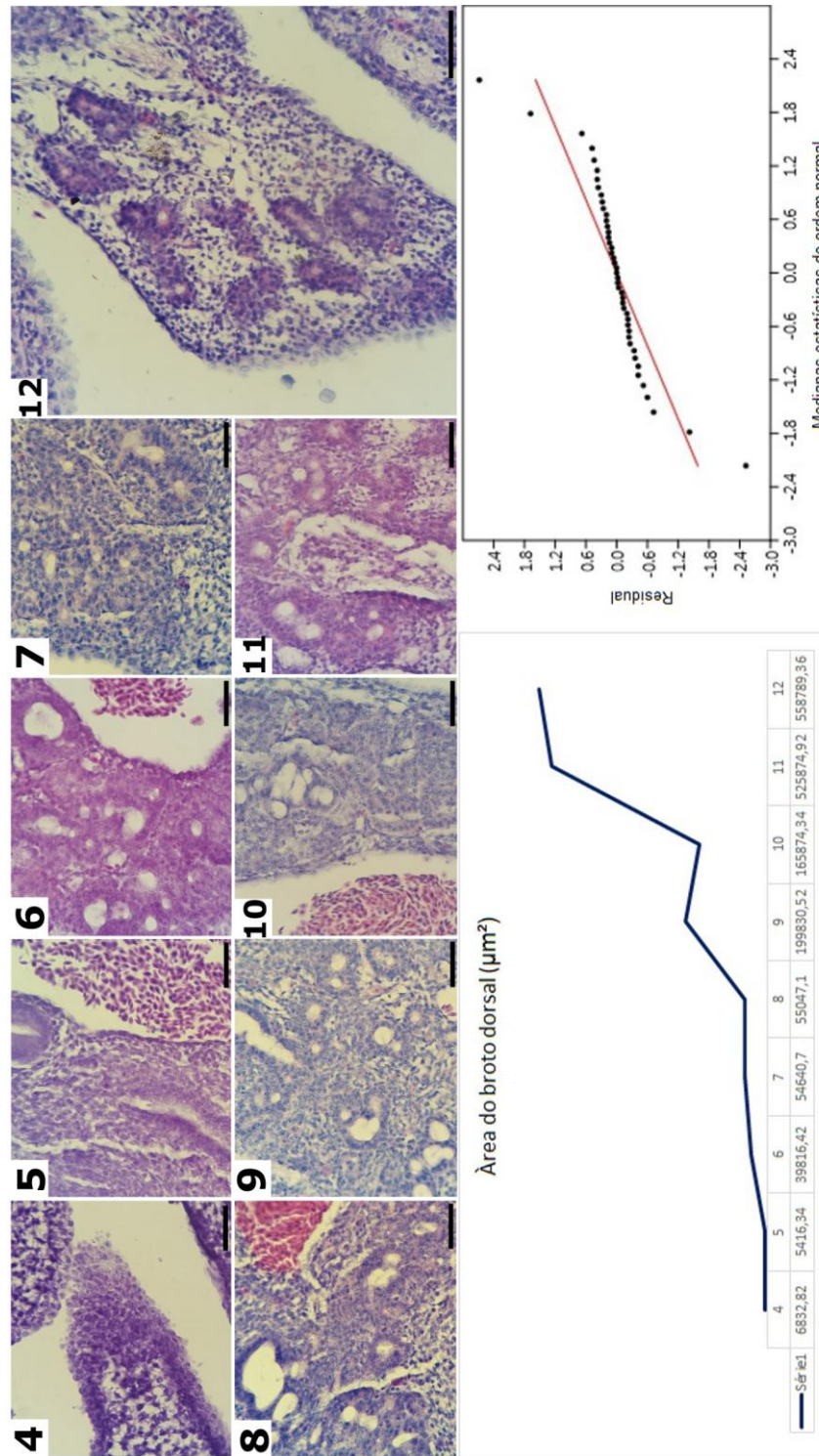


Figura 5. Prancha fotomicrográfica do broto pancreático dorsal nos dias 4 ao 12 de incubação em embriões híbridos de galinhas (*Gallus gallus*) e gráficos representativos da mensuração estatística do crescimento da área do broto no decorrer dos dias e dos desvios padrões da média. Barra: 50 $\mu\text{m}$ ; 400x (4-12). Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo).

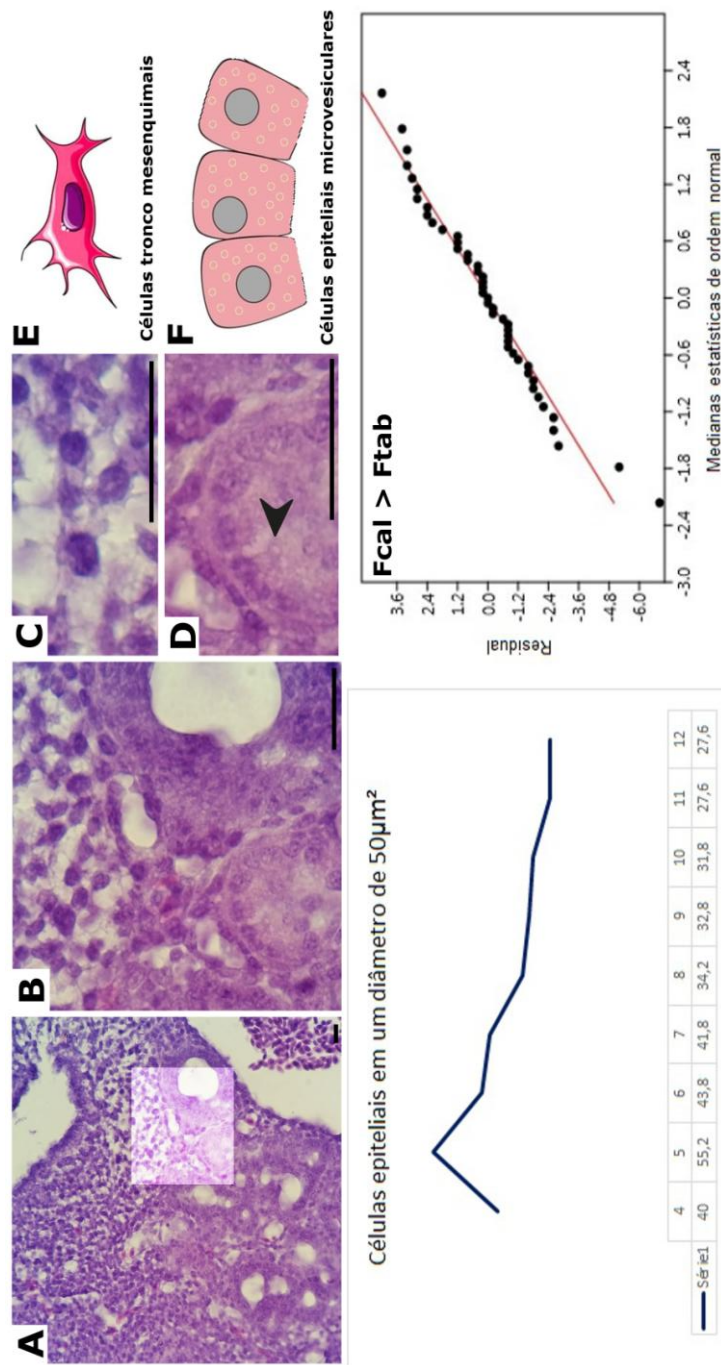


Figura 6. Prancha fotomicrográfica do parênquima do broto pancreático dorsal de galináceos híbridos (*Gallus gallus*) no estágio 27HH (5 dias de incubação) (A) com destaque em maior aumento os constituintes celulares do broto no período inicial (B): células tronco mesenquimais (C, E) e células epiteliais microvesiculares, com destaque para as vesículas (cabeça de seta) (D, F) observadas em corte histológico e desenho gráfico, respectivamente. E gráficos representativos da mensuração estatística do número de células epiteliais em um diâmetro de 50µm dos dias 4 ao 12 de incubação e dos desvios padrões da média. Barra: 25µm; 200x (A); 400x (B); 1000x (C, D); Hematoxilina-eosina; Fcal > Ftab (significativo).

Estudos de citodiferenciação pancreática em ratos apontam a importância que estas microvesículas desempenham no processo de ‘luminização’, através do qual os cordões de células epiteliais passam a apresentar um lúmen central devido a convergência das vesículas no sentido apical das células, similar ao arranjo de ácinos adultos (PICTET et al., 1972). Os eventos da diferenciação das células epiteliais em células pancreáticas em galinhas são similares a estudada em humanos (MANUPATI et al., 2012) e outros mamíferos (GUPTA et al., 2016), e seguem a seguinte sequência: estratificação transitória, mudança de polaridade da célula, constrição da célula apical assíncrona, organização dos botões em ‘rosetas’ bem como formação e fusão das vesículas formando o lúmen.

Dados estatísticos apontam resultados significativos para as diferenças na quantidade de células epiteliais encontradas durante o período de broto na galinha (4 a 12 dias). Foi observado um aumento na contagem das células no período inicial seguido de uma redução significativa nos dias seguintes (Figura 6. Gráfico). O aumento é um resultado esperado nos dias iniciais devido à proliferação de células do endoderma em botões epiteliais que logo em seguida diferenciam-se em células exócrinas provocando a redução dessas células microvesiculares.

A diferenciação das células exócrinas é repentina e pode ser observada nos primeiros dias do período de brotos em mamíferos, fato que provoca a intensa redução de células epiteliais do parênquima ficando restritas apenas a região mais próxima do endoderma lateral, servindo de base para a proliferação e diferenciação em outras células pancreáticas (CLEAVER; MACDONALD, 2010; VILLASENOR et al., 2010).

## **5.2. Histogênese e histometria da porção exócrina do pâncreas**

A porção exócrina do pâncreas compreende o arranjo de células acinares e uma rede de ductos pancreáticos. O desenvolvimento dessa porção na galinha inicia-se no estágio 29HH (6 dias), com a diferenciação das células epiteliais endodérmicas em ductos pancreáticos, um processo denominado tubulogênese pancreática. Os ductos pancreáticos estão revertidos por uma camada de células cubóides envolta por camadas de células epiteliais indiferenciadas.

Pesquisas utilizando marcadores moleculares de células exócrinas em galináceos sustentam a evidência de desenvolvimento exócrino a partir de 6 dias de incubação (ZEIGEL, 1961), que em modelos murinos se compara a 9 dias do período gestacional (POUR, 1984). O desenvolvimento precoce de ductos pancreáticos durante a histogênese eleva a importância que este componente possui na origem das demais

células pancreáticas. Por anos, têm-se relatado a estreita relação de células periductais com as progenitoras, sendo estas o ‘ponto de partida’ para a diferenciação de células exócrinas e endócrinas (PAN; WRIGHT, 2011).

As mensurações da parede dos ductos pancreáticos do 6º ao 21º dia revelaram um aumento significativo de espessura no período de brotos, as quais decresceram após a fusão e tornaram a aumentar próximo ao nascimento (Figura 7. Gráfico). Estas células apresentaram aspecto indiferenciado com núcleo basofílico e citoplasma acidófilo semelhantes às células tronco mesenquimais porém dispostas em camadas em torno dos ductos.

A participação das células periductais como progenitoras do pâncreas têm ganhado força nas últimas décadas, com o advento do cultivo celular *in vitro* foi constatado a diferenciação de células periductais em pancreáticas endócrinas e exócrinas, apontando que durante o período de brotos estas células estão em constante proliferação, reduzindo o número de células periductais à medida que o órgão amadurece e apresentando discreto aumento no final da organogênese (BONNER-WEIR et al., 2004; ROVIRA et al., 2010). As células progenitoras apresentam fatores de transcrição que sinalizam uma cascata de eventos para a diferenciação celular. Durante a organogênese pancreática, as progenitoras necessitam inicialmente se multiplicar, através de sucessivas divisões mitóticas, em seguida adquirem característica exócrina ou endócrina até que o processo de compartimentação do parênquima esteja finalizado, fato que nem sempre coincide com o nascimento (BOUWENS; PIPELEERS, 1998; YASHPAL; LI; WANG, 2004).

Os ácinos pancreáticos de galinhas iniciaram seu desenvolvimento por volta do 8º dia de incubação (estágio 34HH) os quais foram identificados como aglomerados de células tubulares ou esféricas indiferenciadas sem vesículas no citoplasma com núcleo central e dispostas em ‘rosetas’. Estes primórdios de ácinos são escassos e localizados nas extremidades terminais do sistema de ductos, além disso, possuem estratificações de células que regridem com o passar dos dias e um lúmen central irregular (Figura 8).

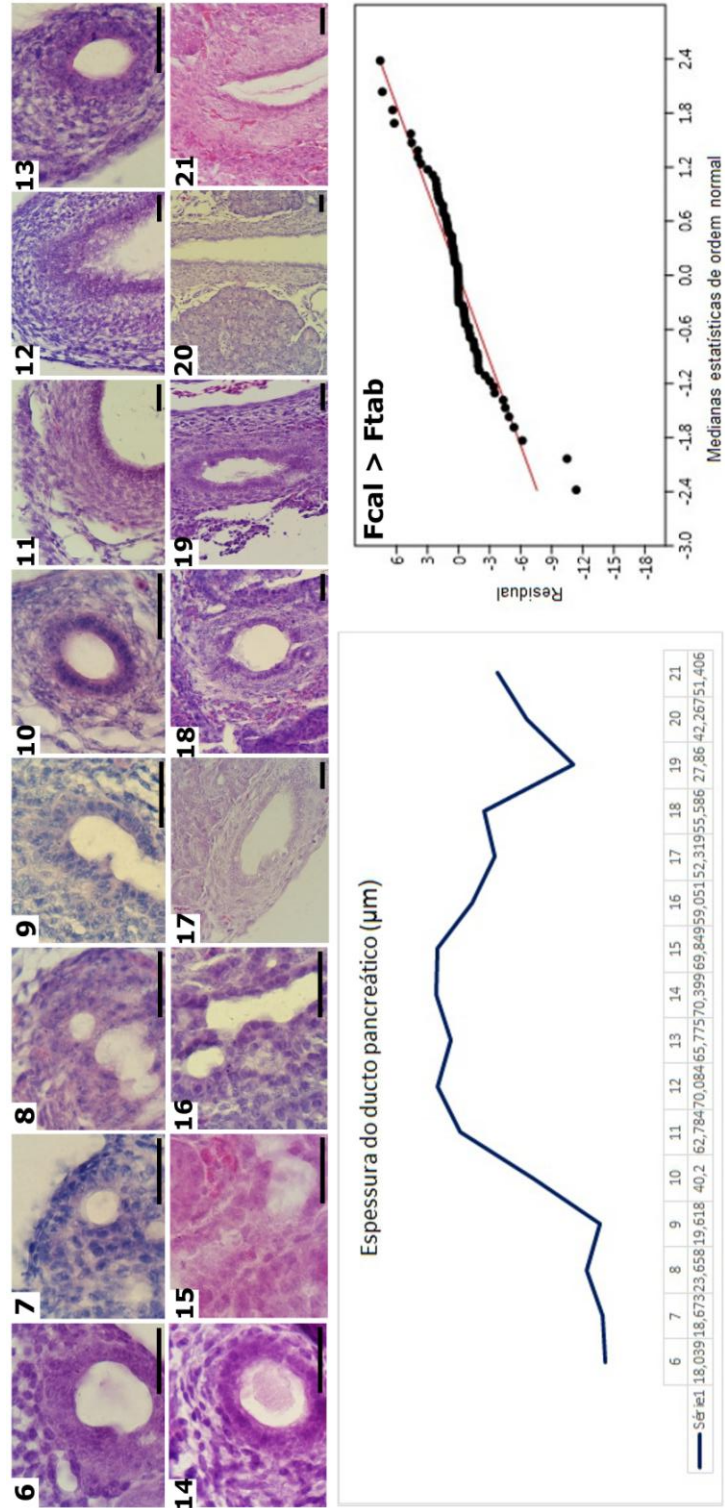


Figura 7. Prancha fotomicrográfica dos ductos pancreáticos de embriões híbridos galináceos (*Gallus gallus*) do 6º ao 21º dia de incubação (6-21) destacando a parede do ducto. E gráficos representativos da mensuração estatística da espessura da parede dos ductos pancreáticos dos dias 6 ao 21 de incubação e dos desvios padrões da média. Barra: 25µm; 200x (20); 400x (11, 12, 17, 18, 19, 21); 1000x (6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo).

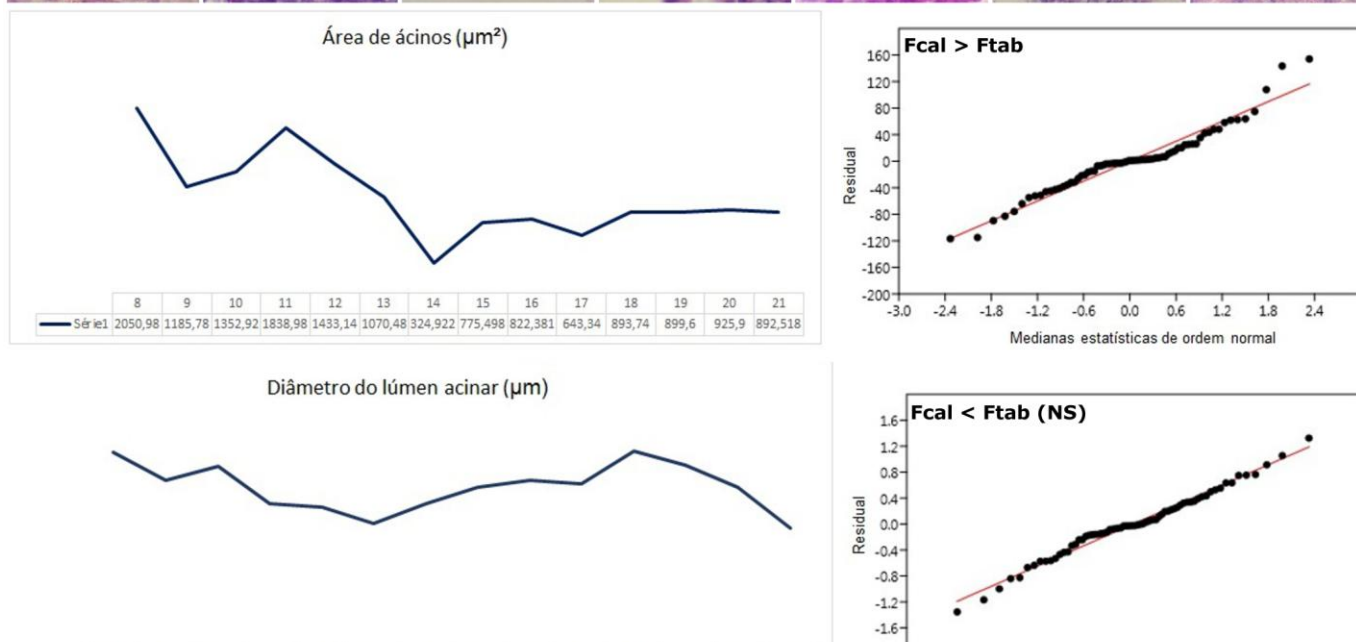
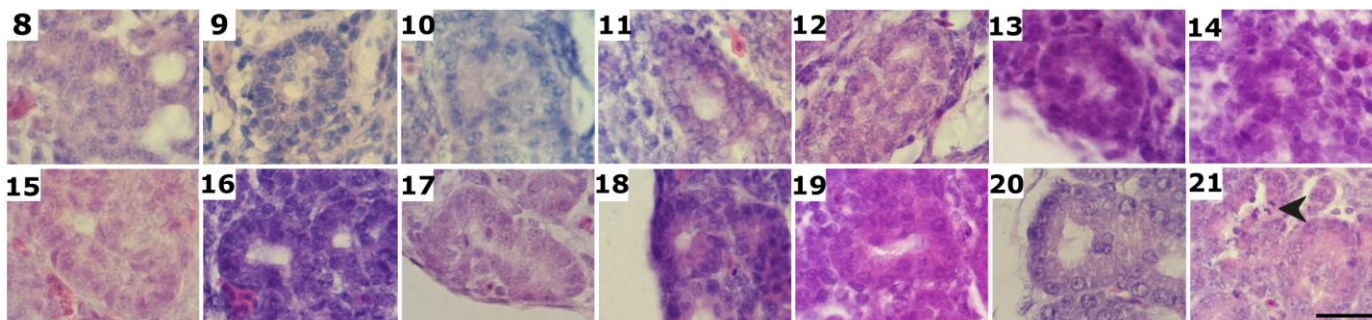


Figura 8. Prancha fotomicrográfica dos ácinos pancreáticos de embriões híbridos galináceos (*Gallus gallus*) do 8º ao 21º dia de incubação (8-21). E gráficos representativos da mensuração estatística da área dos ácinos e do diâmetro do lúmen acinar dos dias 6 ao 21 de incubação com seus respectivos gráficos dos desvios padrões da média. Barra: 25 $\mu\text{m}$ ; 1000x (8-21); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo);  $F_{cal} < F_{tab}$  (não significativo).

As células acinares imaturas não demonstraram marcação de grânulos (zimógenos) acidófilos no seu citoplasma sugerindo a reduzida atividade enzimática neste período inicial. No entanto, a partir do 14º dia de incubação já foi possível a visualização de aglomerados de grânulos zimógenos no parênquima pancreático, estabelecendo a localização apical nas células acinares por volta do 18º dia de incubação (estágio 44HH).

As mensurações da área dos ácinos durante o seu desenvolvimento indicaram que há uma redução significativa do diâmetro dessas ‘rosetas’ à medida que se diferenciam, chegando a possuírem próximo ao nascimento uma única camada de células colunares. As diferenças reportadas para o diâmetro do lúmen dos ácinos no decorrer dos dias não foram significativas, permanecendo pouco alteradas do início ao fim da organogênese (Figura 8.Gráfico).



Pesquisas em galinhas White Legorn utilizando microscopia eletrônica relataram a presença dos primeiros ácinos por volta de 5 dias de incubação (PRZYBYLSKI, 1967) discordando dos resultados encontrados em galináceos híbridos analisados por microscopia de luz, que demonstraram primeiras evidências de ácinos por volta de 8 dias de incubação. Em modelos murinos este período corresponde a 14 dias de gestação (SLACK, 1995) e 12 semanas em humanos (RENU; SATYANARAYAN; ASHISH, 2014). Outros mamíferos já estudados apresentam desenvolvimento exócrino por volta de 14,5 dias em suínos (CARLSSON et al., 2010), 75 dias em ovinos (ALDORETTA; CARVER; HAY JR, 1998), dia 10 em coelhos (MANAKOVA; TITLBACH, 2007) e 40 dias em búfalos (GUPTA et al., 2016).

A diferenciação acinar é sinergicamente orquestrada por fatores de transcrição primários e secundários, que inicialmente induzem a maturação de células epiteliais microvesiculares em células acinares e secundariamente ativam genes acinares que codificam enzimas digestivas e proteínas para exocitose de grânulos zimógenos (MASUI et al., 2007). Esta informação esclarece a incorporação tardia de grânulos no citoplasma acinar e sugere a ocorrência de atividade enzimática próximo ao nascimento.

A quantidade de células constituindo os ácinos varia de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, no início são aglomerados celulares revertidos internamente de células epiteliais e externamente por camadas de células mesenquimais. A medida que os ácinos se diferenciam, as células vão se restringindo a um estrato de células acinares com um lúmen central, característica que permanece até o estágio diferenciado (GITTES et al., 1996; SHIH; WANG; SANDER, 2013).

### **5.3. Histogênese e histometria da porção endócrina do pâncreas**

A porção endócrina do pâncreas de galinhas compreende as ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, as quais têm sido notificadas a partir do estágio 40HH (14 dias) utilizando microscopia de luz. Foram identificados dois tipos de ilhotas nos galináceos analisados: as ilhotas escuras e as ilhotas claras; as primeiras são menores e compostas de células A principalmente, além de células B e delta, enquanto que as ilhotas claras são maiores e apresentam predominância de células B.

Através de microscopia eletrônica em pâncreas de galináceos foram relatados a identificação de células A e B a partir de 8 e 12 dias de incubação respectivamente, apontando uma atividade inicial dessas células na produção de hormônios (PRZYBYLSKI, 1967). Utilizando marcadores que expressam resposta hormonal para insulina (células B) e glucagon (células A), foi possível evidenciar a importância que estas possuem no desenvolvimento de ilhotas pancreáticas embrionárias (MANAKOVA;

TITLBACH, 2007). As células delta, que produzem o hormônio somatostatina, foram identificadas em marcações pouco expressivas a partir de 6 dias, e somente identificadas em colorações histológicas clássicas próximas ao nascimento (WILD, 1979).

O desenvolvimento das ilhotas de galinhas analisado por microscopia de luz destaca o desarranjo de células indiferenciadas dispersas entre os ácinos no período inicial exibindo um aspecto irregular. Ao mesmo tempo que ocorre a proliferação celular nessas ilhotas, as células se arranjam em um contorno esférico e diferenciam-se em células A (com citoplasma claro e núcleo evidente) e células B (com citoplasma basófilo) (Figura 9). Estes eventos concordam com os resultados nas mensurações da área das ilhotas pancreáticas, as quais demonstraram um aspecto crescente entre os dias 14 e 21 de incubação, com diferenças estatisticamente significativas (Figura 9. Gráfico).

A histogênese das células endócrinas ocorre simultaneamente com a citogênese, através da proliferação e maturação das células epiteliais que se separam da extremidade de ductos, estes eventos são sinalizados pelos mesmos precursores pancreáticos. As células A são as primeiras a se diferenciar, seguidas de células B e delta (PICTET et al., 1972). A necessidade de estímulo hormonal para o desenvolvimento do embrião faz com que o mesmo apresente resposta hormonal de glucagon e insulina precocemente (YE et al., 2015). A diferenciação das ilhotas não se completa com o nascimento, em indivíduos adultos as células A e B estão em constante processo de regeneração, fato que tem impulsionado pesquisas para a utilização destas células em terapias de reposição em pacientes injuriados (BOUWENS; HOUBRACKEN; MFOPOU, 2013).

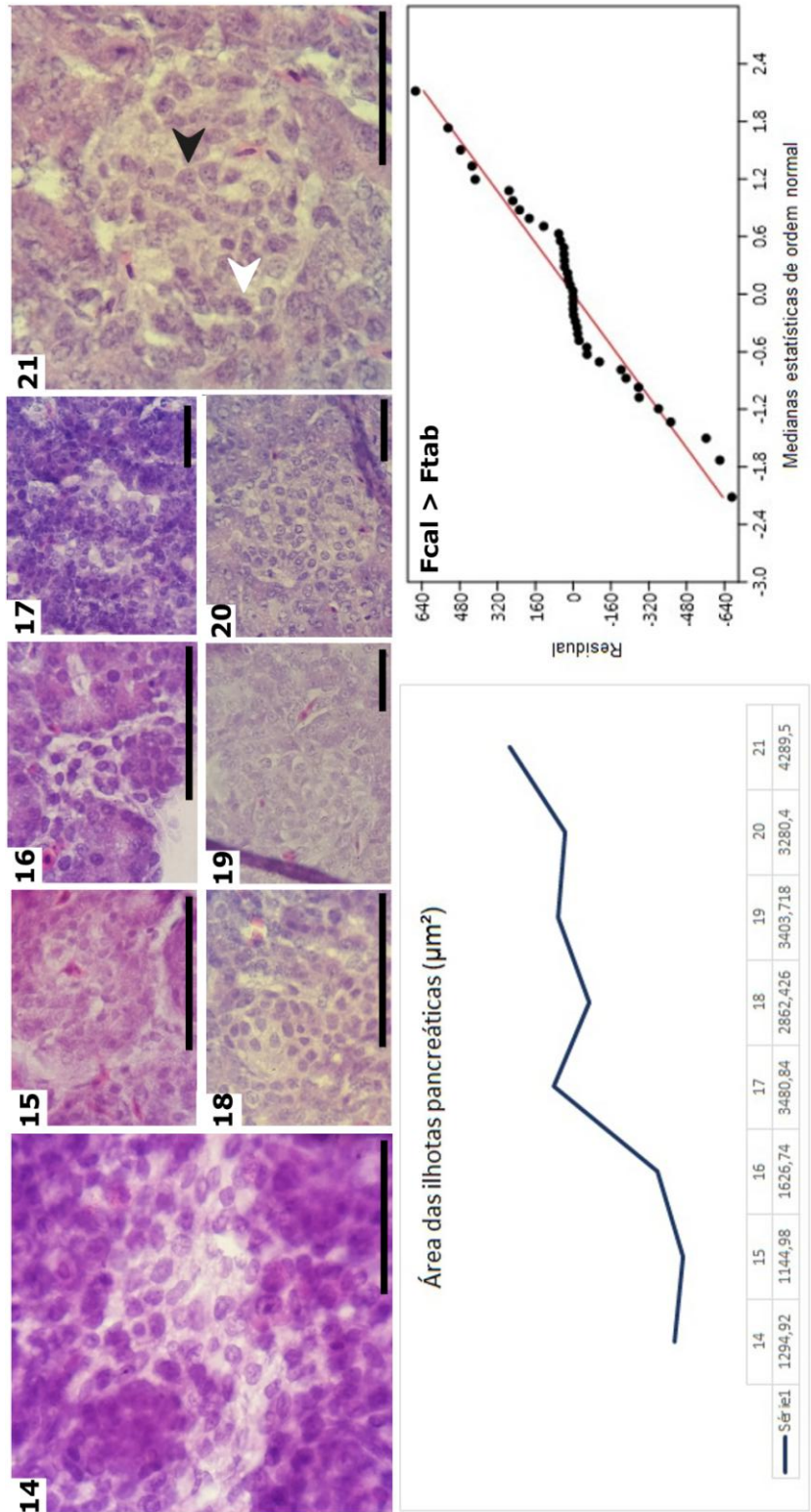


Figura 9. Prancha fotomicrográfica das ilhotas pancreáticas de galináceos híbridos (*Gallus gallus*) do 14º ao 21º dia de incubação (14-21). E gráficos representativos da mensuração estatística da área das ilhotas pancreáticas dos dias 14 ao 21 de incubação com seus respectivos gráficos dos desvios padrões da média. Barra: 50µm; 400x (17, 18, 20); 1000x (14, 15, 16, 19, 21); Hematoxilina-eosina;  $F_{cal} > F_{tab}$  (significativo). Cabeça de seta branca: célula A. Cabeça de seta preta: célula B.

#### **5.4. Vasculogênese do pâncreas**

A vasculogênese no tecido pancreático é evidenciada pela presença de microcapilares em proximidade com a aorta dorsal. Com o passar dos dias, ainda no período de brotos (4 a 12 dias), é possível observar um aumento nas microvascularizações. Após a fusão dos brotos, observa-se que há uma redução na quantidade de vasos sanguíneos e desenvolvimento de seus constituintes endoteliais acompanhado de aumento na quantidade de células sanguíneas. Ao final da organogênese, os vasos estão bem definidos e com características que os diferenciam em artérias e veias.

O desenvolvimento de vasos sanguíneos no embrião mamífero é um processo importante para a diferenciação celular, visto que, este sistema carrega nutrientes e oxigênio necessários para a sobrevivência dos tecidos (LAMMERT; CLEAVER; MELTON, 2001). Assim como células embrionárias, as células endoteliais são sinalizadas por mediadores químicos que induzem a dispersão dessas células pelo parênquima pancreático através do mesoderma. As células endoteliais proliferam, migram e organizam-se em redes de onde evoluem os vasos sanguíneos (COLEN et al., 1999; AZIZOGLU et al., 2016),

#### **5.5. Histogênese pancreática pós-natal**

A organogênese pancreática se completa com 21 dias de incubação no embrião galináceo, no entanto, a histogênese perdura após o nascimento. Ainda existem zonas no parênquima indiferenciadas ou que ainda sofrem processo de maturação nas porções endócrina e exócrina, as quais podem ser associadas aos aglomerados de grânulos zimógenos encontrados difundidos pelo parênquima e em volta de ductos e vasos, além de ilhotas com presença de células endócrinas imaturas, regiões com desarranjo celular e figuras de mitose típicas difundidas principalmente pelas extremidades do pâncreas (Figura 10)

A organogênese e a histogênese são processos evolutivos do embrião que determinam a diferenciação anatômica e funcional dos órgãos (SLACK, 1995). No pâncreas, estes eventos ocorrem simultaneamente em algumas ocasiões, mas uma vez que o órgão está formado, a maturação funcional é gradativa e pode se estender para o período pós-natal. Estudos em camundongos evidenciaram neoformação de células endócrinas (células B) após o nascimento e estágio adulto por regeneração celular (JARRAL; TAHIR; LONE, 2013).

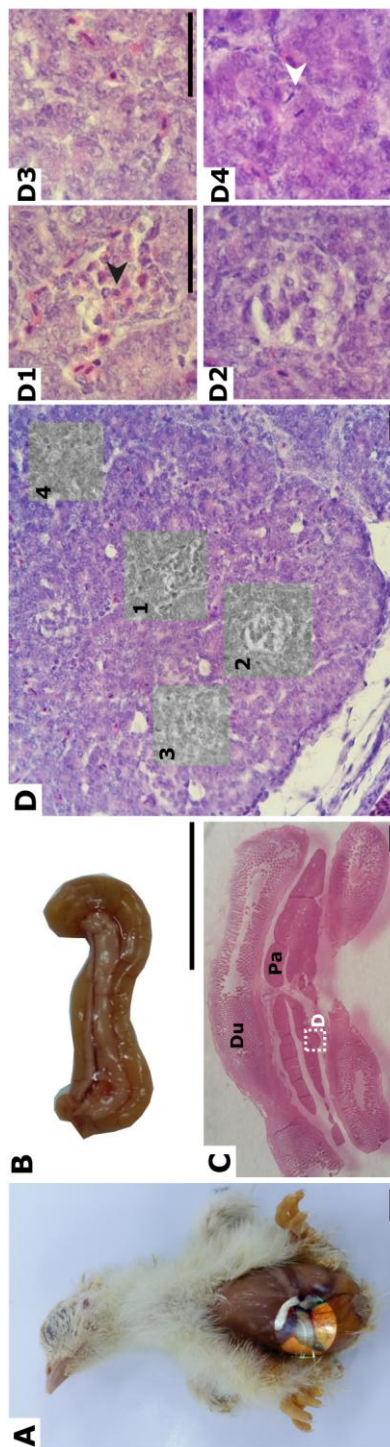


Figura 10. Prancha fotográfica do embrião híbrido galináceo (*Gallus gallus*) com 21 dias de incubação, destacando a cavidade toraco-abdominal (A), o conjunto duodeno-pâncreas ex situ em aspecto anatômico (B) e em corte histológico (C), e uma secção histológica do parênquima pancreático (D) evidencializando o aglomerado de grânulos zimógenos (cabeça de seta preta) no parênquima (D1), ilhota pancreática com histogênese incompleta (D2), pontos de desarranjo celular (D3) e figuras de mitose típicas (cabeça de seta branca) (D4). Du: duodeno; Pa: pâncreas. Barra: 1cm (A, B); 600  $\mu$ m (C); 50  $\mu$ m (D, D1, D2, D3, D4). Hematoxilina-eosina.

No entanto, esclarecimentos acerca de histogênese pós-natal são ainda obscuros, pesquisadores utilizando imunocitoquímica relataram a marcação de biomoléculas que expressam células epiteliais em ilhotas pancreáticas de ratos com duas semanas de vida (BRAND; FULLER, 1988; BOWENS et al., 1994), em contrapartida, há cientistas que atribuem a existência de células indiferenciadas (epiteliais) ao processo convencional de apoptose e regeneração tecidual (DRUCKER, 2002). Na tentativa de compreender esses levantamentos, faz-se necessária a realização de uma investigação científica que possibilite uma conexão entre o desenvolvimento embrionário e pós-natal.

## **6. Conclusão**

Durante a histogênese pancreática em galináceos híbridos há alterações significativas na morfometria das porções endócrina e exócrina, juntamente com seus constituintes teciduais, completando a maturação do órgão no período pos-natal. Descrever a histogênese do pâncreas com a utilização de dados histométricos em embriões híbridos galináceos contribui com os esclarecimentos acerca do desenvolvimento embrionário e reafirma a premissa de que galináceos servem como modelo experimental para mamíferos.

## 7.Referências

- AHNFELT-RØNNE, J.; RAVASSARD, P.; PARDANAUD-GLAVIEUX, C.; SCHARFMANN, R.; SERUP, P. Mesenchymal bone morphogenetic protein signaling is required for normal pancreas development. **Diabetes**, v. 59, n. 8, p. 1948-1956, 2010.
- ALCÂNTARA, D.; RODRIGUES, M.N.; FRANCIOLLI, A.L.; FONSECA, A.T.; SILVA, F.M.; CARVALHO, R.C.; FRANTINI, P.; SARMENTO, C.A.; FERREIRA, A.J.; MIGLINO, M.A. Embryonic development of endoderm in chicken (*Gallus gallus domesticus*). **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 8, p. 803-803, 2013.
- ALDORETTA, P.W., CARVER, T.D., HAY JR. W.W. Maturation of glucose-stimulated insulin secretion in fetal sheep. **Biology of the Neonate**, v. 73, n. 6, p. 375–386, 1998.
- ALMEIDA, H.M.; SOUSA, R.P.; BEZERRA, D.O.; OLIVINDO, R.F.G.; DINIZ, A.N.; OLIVEIRA, S.C.; FEITOSA, M.L.T.; FORTES, E.A.M.; FERRAZ, M.S.; CARVALHO, Y.K.P.; MENEZES, D.J.A.; CARVALHO, M.A.M. Greater rhea (*Rhea americana*) external morphology at diferente stages of embryonic and fetal development. **Animal Reproduction Science**. v.162, p. 43-51, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diabetes Advocacy. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 86-87, 2015. Suplemento.
- AZIZOGLU, D.B., CHONG, D.C., VILLASENOR, A., MAGENHEIM, J., BARRY, D.M., LEE, S., MARTY-SANTOS, L., FU, S., DOR, Y., CLEAVER, O. Vascular development in the vertebrate pancreas. **Development Biology**. v.420, n.1, p.67-7, 2016.
- BELLAIRS, R., OSMOND, M. **Atlas of chick development**. 3 ed. Academic Press: Londres, 692p, 2005.
- BENCOSME, S. A. The histogenesis and cytology of the pancreatic islets in the rabbit. **American Journal of Anatomy**. v.96, n.1, p.103-151. 1955.
- BEUCHER, A.; MARTIN, M.; SPENLE, C.; POULET, M.; COLLIN, C.; GRADWOHL, G. Competence of failed endocrine progenitors to give rise to acinar but not ductal cells is restricted to early pancreas development. **Developmental biology**, v. 361, n. 2, p. 277-285, 2012.
- BLAKE, J.P.; MACKLIN, K.S.; BERRY, W.D.; VOITTE, R.A.; HESS, T.A. **Chicken Embryo Development**. Alabama Cooperative Extension System: Alabama, 2011.
- BONNER-WEIR, S. Perspective: postnatal pancreatic beta cell growth. **Endocrinology**. v.141, n.6, p.1926-1929, 2000.

BONNER-WEIR, S., TOSCHI, E., INADA, A., REITZ, P., FONSECA, S.Y., AYE, T., SHARMA, A. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. **Pediatric Diabetes**. v.5, p.16-22, 2004.

BONNER-WEIR, S.; SHARMA, A. Pancreatic stem cells. **The Journal of pathology**, v. 197, n. 4, p. 519-526, 2002.

BOUWENS, L., PIPELEERS, D.G. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. **Diabetologia**. v.41, n.6, p.629- 633, 1998.

BOUWENS, L., WANG, R.N., DE BLAY, E., PIPELEERS, D.G., KLOPPEL, G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islets neogenesis in the neonatal rat pancreas. **Diabetes**. v.43, n.11, p.1279-1783, 1994.

BOUWENS, L.; HOUBACKEN, I., MFOPOU, J.K. The use of stem cells for pancreatic regeneration in diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v.9, p.598-606, 2013.

BRAND, S.J., FULLER, P.J. Differential gastrin gene expression in rat gastrointestinal tract and pancreas during neonatal development. **J. Biol. Chem**. v.263, n.11, p.5341-5347, 1988.

CANO, F.G. **Interactive Avian Anatomy: Functional and Clinical Aspects**. 1ed. Universidade de Murcia: Murcia, 2012. 16p.

CARLSSON, G.L., HELLER, R.S., SERUP, P., HYTTEL, P. Immunohistochemistry of pancreatic development in cattle and pig. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 39, n. 2, p. 107–119, 2010.

CASILLAS, J., GRANVILLE, C., QUIROZ, A., RUIZ-CORDERO, R. Embryology of the pancreas and normal variants. *In: Multidisciplinary teaching atlas of the pancreas*. Springer Berlin Heidelberg, 2016. p.3-47.

CLEAVER, O., MACDONALD, R.J. **Developmental molecular biology of the pancreas**. *In: Pancreatic Cancer*, Springer: NewYork, 2010. pp. 71–117.

COLEN, K.L., CRISERA, C.A., ROSE, M.I., CONNELLY, P.R., LONGAKER, M.T., GITTES, G.K. Vascular development in the mouse embryonic pancreas and lung. **Journal of Pediatric Surgery**. v.34, n.5, p.781-785, 1999.

DOR, Y.; BROWN, J.; MARTINEZ, O.I.; MELTON, D.A. Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v. 429, n. 6987, p. 41-46, 2004.

DRUCKER, D.J. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. **Gastroenterology**. v.122, p.531-544, 2002.



EGIDO, E. M.; RODRIGUEZ-GALLARDO, J.; SILVESTRE, R.A.; MARCO, J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. **European Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 241-244, 2002.

EURELL, A.E.; FRAPPIER, B. L.. **Textbook of Veterinary Histology**. 6 ed. Blackwell Publishing: Ames. 2006. 351p.

EYNARD, A. R.; VALENTICH, M. A.; ROVASIO, R. A. **Histologia e Embriologia Humanas:- Bases Celulares e Moleculares**. 4 ed. Artmed Editora: Rio de Janeiro, 2011, 696p.

FAURE, S.; GEORGES, M.; MCKEY, J.; SAGNOL, S.; SANTA BARBARA, P. Expression pattern of the homeotic gene *Bapx1* during early chick gastrointestinal tract development. **Gene Expression Patterns**, v. 13, n. 8, p. 287-292, 2013.

FORTES, E. A.; SOUSA, A. F., ALMEIDA, E. C. S.; CONDE JÚNIOR, A. M.; MOURA, W. L. Morfologia das células do sangue periférico em emas (*Rhea americana*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 215-221, 2009.

GANS, S. L.; VAN WESTREENEN, H.L.; KIEWIET, J.J.; RAUWS, E.A.; GOUMA, D.J.; BOERMEEESTER, M.A. Systematic review and meta-analysis of somatostatin analogues for the treatment of pancreatic fistula. **British Journal of Surgery**, v. 99, n. 6, p. 754-760, 2012.

GARCIA, SML; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia**, 2 eds. Porto Alegre: Artmed, 2012.416p.

GITTES, G.K., GALANTE, P.E., HANAHAN, D., RUTTER, W.J., DEBAS, H.T. Lineage specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. **Development**. v.122. p.439-447, 1996.

GRAPIN-BOTTON, A.; MAJITHIA, A. R.; MELTON, D. A. Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. **Genes & development**, v. 15, n. 4, p. 444-454, 2001.

GUPTA, D., UPPAL, V., BANSAL, N., GUPTA, A. Light and Eletron Microscope Studies on prenatal differentiation of exocrine pancreas in buffalo. **Veterinary Medicine International**. v.15, p.1-6, 2016.

GUPTA, R., SATYANARYAN, S., ASHISH, N.K. The histogenesis of developing human fetal pancreas – an electron microscopic study. **International Journal of Biomedical Research**. v.5. n.1. 2014.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HANSEN, J T. **Netter Anatomia Clínica**. 3ed. Elsevier, 2015. p.568.

HEBROK, M., KIM, S.K., ST-JACQUES, B., MCMAHON, A., MELTON, D.A. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. **Development**. v.127, n.22, 4905-4913.

JARRAL, S.A., TAHIR, M., LONE, K.P. Postnatal histogenesis of islets of Langerhans in rat. **Pakistan Journal Zoology**. v.45, n.2, p.323-329, 2013.

JENNINGS RE, BERRY AA, KIRKWOOD-WILSON R, ET AL. Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. **Diabetes**. v.62, p.3514–3522, 2013.

JENNINGS, R.E., BERRY, A.A., STRUTT, J.P., GERRARD, D.T., HANLEY, N.A. Human pancreas development. **Development**. v.142, p.3126-3137, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto & Atlas**. 12 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 2013. 556p.

KIM, S.K., HEBROK, M., MELTON, D.A. Pancreas development in the chick embryo. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. v. 62, p. 377–383, 1997.

KUME, S. The molecular basis and prospects in pancreatic development. **Development Growth Differentiation**. v.47, n.6, p.367-374, 2005.

LAMMERT, E., CLEAVER, O., MELTON, D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. **Science**. v.294, n. 5542, p. 564–567, 2001.

LE DOUARIN, N. Etude expérimentale de l'organogenèse du tube digestif et du foie chez l'embryon de poulet. **Bull.biol. Fr. Belg**. v.98. p.544-583, 1964.

LOJUDICE, F. H.; SOGAYAR, M. C. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.1, p.19-21, 2008.

LONGNECKER, D. Anatomy and Histology of the pancreas. **Pancreopedia: Exocrine pancreas knowledge base**. v.1. 2014.

MANUPATI, S., SUGAVASI, R., INDIRA, D.B., SIRISHA, B., SUBHADHRA, D.B., SUNEETHA, Y. Morphometry and histogenesis of human foetal pancreas. **International Journal of Health Sciences and Research**, v.2, n.9, p.18–24, 2012.

MASUI, T., LONG, Q., BERES, T.M., MAGNUSON, M.A., MACDONALD, R.J. Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. **Genes Dev**. v.21, p.2629–2643, 2007.

MATSUSHITA, S. Fate mapping study of the endoderm of the 1.5-day-old chick embryo. **Roux Arch. Dev. Biol.**, 205. P.225-231. 1996.

MATSUURA, K., KATSUMOTO, K., FUKUDA, K., KUME, K., KUME, S. Conserved origin of the ventral pancreas in chicken. **Mechanisms of Development**. n.126, p.817-827, 2009.

MURTAUGH, L.C.; KEEFE, M.D. Regeneration and Repair of the Exocrine Pancreas. **Annual review of physiology**, v.77, p.229-249, 2015.

- MURTAUGH, L. C.; KOPINKE, D. **Pancreatic stem cells**. Harvard Stem Cell Institute: Cambridge, 2008.
- NOBRE, J.C.A.; PEDRO, R.M.L.R. Vida humana, mídia e mercado: uma perspectiva sociotécnica das pesquisas com células tronco embrionárias. **Estudos e Pesquisas em Psicologia**, v. 14, n. 1, p. 320-336, 2014.
- O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. **Developmental stages in human embryos**. *Cells Tissues Organs*. v.192, n.2, p.73-84, 2010.
- PAN, F.C.; WRIGHT, C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 3, p. 530-565, 2011.
- PICTET, R. L., CLARKE, W. R., WILLIAMS, R. H., RUTTER, W. J. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. **Dev. Biol.** v.29, p.436-467, 1972.
- POUR, P.M. Histogenesis of exocrine pancreatic cancer in the hamster model. **Environmental Health Perspectives**. v.56, p.229-243, 1984.
- PRANKE, P. A importância de discutir o uso de células-tronco embrionárias para fins terapêuticos. **Ciência e Cultura**, v. 56, n. 3, p. 33-38, 2004.
- PRZYBYLSKI, R.J. Cytodifferentiation of the chick pancreas: Ultrastructure of the acinar cells. **Journal of Morphology**. v.123. p.85-108, 1967.
- RIEDEL, M. J.; ASADI, A.; WANG, R.; AO, Z.; WARNOCK, G.L.; KIEFFER, T.J. Immunohistochemical characterisation of cells co-producing insulin and glucagon in the developing human pancreas. **Diabetologia**, v. 55, n. 2, p. 372-381, 2012.
- ROVIRA, M., SCOTT, S.G., LISS, A.S., JENSEN, J., THAYER, S.P., LEACH, S.D. Isolation and characterization of centroacinar / terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. **PNAS**. v.107. n.1. p.75-80, 2010.
- RUTH, B.; MARK, O. **The atlas of chick development**. 3 ed. Elsevier: São Paulo, 2005. 476p.
- SERUP, P. A galinha e o camundongo como modelos de embriologia. *In: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED*. **Embriologia Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Elsevier, cap.20, 2012. p. 383-401.
- SHIH, H.P., WANG, A., SANDER, M. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 81–105, 2013.
- SLACK, J.M.W. Developmental Biology of Pancreas. **Development**. n. 121. p.1569-1580. 1995.
- SMEETS, S; VELD, P.I. Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. *In: Islets of Langerhans*. Springer Netherlands, 2015. p. 19-38.

SOUSA, R.P. **Análise Morfológica do Sistema Respiratório de Emas (*Rhea Americana*) em Diferentes Fases do Desenvolvimento.** 2015. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; STEEGERS, E.A.P. Embryonic health: new insights, mHealth and personalised patient care. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 4, p. 712-715, 2015.

TITLBACH, M., MANAKOVA, E. Development of the rabbit pancreas with particular regard to the argyrophilic cells. **Acta Veterinaria Brno**, v. 76, n. 4, p. 509–517, 2007.

TIWARI, S.; MISHRA, S.; KAUL, J. M. Morphological Study of the Developing Human Exocrine Pancreas at Various Gestational Ages. **Indian Journal of Anatomy**, v. 4, n. 2, p. 77, 2015.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in cell biology**, v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

VILLASENOR, A., CHONG, D.C., Henkemeyer, M., Cleaver, O. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. **Development**, v. 137, n. 24, p. 4295–4305, 2010.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WANG, X.; ZIELINSKI, M.C.; MISAWA, R., WEN, P. WANG, T.Y.; WANG, C.Z.; WITKOWSKI, P.; HARA, M. Quantitative analysis of pancreatic polypeptide cell distribution in the human pancreas. **Plos one**, v. 8, n. 1, p. 55501, 2013.

WILD, A. Somatostatin immunoreactivity demonstrated in the pancreas of very young chick embryos. **Gen. Comp. Endocrinology**. v.38; n.3; p.370-373, 1979.

YASHPAL, N.K., LI, J., WANG, R., Characterization of c-kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**. v.229, n.4; p.813-825, 2004.

YE, L., ROBERTSON, M.A., HESSELSON, D., STAINIER, D.Y.R., ANDERSON, R.M. Glucagon is essential for alpha cell transdifferentiation and beta cell neogenesis. **Development**. 142. 1407-1417. 2015.

ZEIGEL, R.F. Cytogenic study of embryonic chick pancreas: Exocrine tissue. **Journal of national cancer institute**. v.28, n.2, 1962.

ZHAO, P.; SCHULZ, T.C.; SHERRER, E.S.; WEATHERLY, D.B.; ROBINS, A.J.; WELLS, L. The human embryonic stem cell proteome revealed by multidimensional fractionation followed by tandem mass spectrometry. **Proteomics**, v. 15, n. 2-3, p. 554-566, 2015.

## 8.Apêndice



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**  
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil, CEP: 64049-550  
Telefone (86) 3215-5734 \_e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br




### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Organogênese pancreática, isolamento e caracterização *in vitro* das células pancreáticas de embriões de galinha (*Gallus gallus*)**", protocolo nº **040/15**, sob a responsabilidade de **AIRTON MENDES CONDE JÚNIOR**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 19/06/2015.

Vigência do Projeto	<b>Julho/ 2015 à Março/ 2017</b>
Espécie/ linhagem	<b>Aves/ híbridos</b>
Nº de Animais	<b>70</b>
Peso/ Idade	<b>50 gramas/ 4 a 21 dias</b>
Sexo	<b>Machos e Fêmeas</b>
Origem	<b>Ovos fecundados de aves híbridas (<i>Gallus gallus</i>) obtidas de Criação Particular.</b>

Teresina, 19 de Junho de 2015.

  
**Prof. Ivete L. de Mendonça**  
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI  
Coordenadora

  
em 03/07/2015.