

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências

*Identificação genética de amostras de
origem animal - Canis familiaris e Felis
Catus - em contexto forense*

Luísa Susana Jorge Ganço

Orientador:

Prof. Doutor Francisco Corte Real
Faculdade de Medicina da
Universidade de Coimbra

Co - Orientadora:

Doutora Ângela Xufre
DNAtech

2009

*“Identificação genética de amostras de origem animal
- Canis familiaris e Felis Catus -
em contexto forense”*



**Luísa Susana Jorge Ganço
2009**

Resumo

Numa investigação criminal, as amostras biológicas encontradas são maioritariamente humanas. Todavia, não são as únicas passíveis de constituir prova forense.

Animais domésticos como gatos (*Felis catus*) e cães (*Canis familiaris*) coabitam com os seres humanos e depositam amostras biológicas, designadamente pêlos, saliva e sangue, que podem vir a ser úteis para incriminar ou para provar a inocência de um suspeito.

O presente estudo tem por objectivo implementar técnicas de identificação individual através da análise de *Short Tandem Repeats* (STRs) do ADN nuclear para cada uma das espécies em estudo.

Foram analisadas 61 amostras de canídeos de várias raças sem parentesco entre si. As amostras sanguíneas foram extraídas pelo método Chelex100[®] e os pêlos extraídos pelo kit comercial DNA IQ[™] (Promega), tendo sido amplificadas com o *Multiplex Canine Stockmarks* (Applied Biosystems) com os marcadores PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 e FHC2079. Relativamente às amostras felinas, foram analisadas 64 amostras sanguíneas de animais sem parentesco entre si, extraídas pelo método Chelex100[®] e amplificadas para os marcadores FCA733, FCA723 e FCA731.

As Frequências Alélicas, a Heterozigotia esperada (Hesp), a Heterozigotia observada (Hobs) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foram calculados através do programa de computador CERVUS 3.0.3.

Os resultados evidenciaram uma elevada diversidade genética dos marcadores utilizados, para ambas as espécies e para as populações estudadas. Todos os *loci* estudados mostraram um elevado grau de polimorfismo e revelaram-se altamente informativos, tratando-se de uma importante ferramenta auxiliar na resolução de crimes e outras situações que envolvam amostras animais.

Este estudo pretende contribuir para a identificação genética de amostras de proveniência animal (*Felis catus* e *Canis familiaris*) e para o aumento do potencial forense deste tipo de amostras.

Palavras-chave: Canídeos, Felídeos, identificação individual, STRs, polimorfismos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra com vista à obtenção do grau de Mestre em Medicina Legal e Ciências Forenses.

Investigação laboratorial realizada no Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, sob a orientação do Professor Doutor Francisco Côrte-Real e co-orientação da Doutora Ângela Xufre.

"A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana."

(Charles Darwin)

ÍNDICE GERAL

	Página
Índice de Figuras, Gráficos, Esquemas e Tabelas	v
Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
<i>Abstract</i>	x
1 Introdução.....	2
1.1 As espécies em estudo	2
1.1.1 <i>Canis familiaris</i>	5
1.1.2 <i>Felis catus</i>	6
1.2 Biologia e Genética Forenses	9
1.3 Fundamentação do tema.....	16
1.4 Objectivos.....	20
2 Metodologia.....	22
2.1 Amostragem	22
2.2 Técnicas utilizadas	23
2.2.1 Extracção	24
2.2.2 Amplificação (PCR).....	28
2.2.3 Electroforese Capilar e análise de STR´s	35
3 Resultados e Discussão.....	38
3.1 Extracção de ADN.....	38
3.2 Caracterização macroscópica e microscópica do pêlo	38
3.3 Amplificação e análise de fragmentos.....	48
3.4 Polimorfismo dos marcadores	50
3.4.1 Canídeos	50
3.4.2 Felídeos	68

4	Conclusão e Considerações Futuras	77
4.1	Conclusão	77
4.2	Considerações futuras.....	78
5	Referências Bibliográficas.....	80
5.1	Bibliografia de imagens.....	86
6	Anexos.....	88
	Anexo 1 – Ficha para colheita de amostras	89
	Anexo 2 – Raças de canídeos amostradas	90
	Anexo 3 – Raças de felídeos amostradas	91
	Anexo 4 – Soluções do kit de extracção DNA IQ TM (Promega).....	92

Índice de Figuras, Gráficos, Esquemas e Tabelas

	Página
Figura 1 – Tempo geológico	3
Figura 2 – <i>Miacis</i>	4
Figura 3 – <i>Miacis</i>	4
Figura 4 – Evolução dos Canídeos e Felídeos a partir do Miacis	5
Figura 5 – Várias Raças de Cães	6
Figura 6 – Gato Doméstico	7
Figura 7 – Várias raças de Gatos Domésticos	8
Tabela 1 – Taxonomia das espécies em estudo	8
Figura 8 – Estrutura do ADN	10
Figura 9 – A: nucleótido; B: Bases azotadas	10
Figura 10 – Estrutura de um locus Minissatélite	11
Figura 11 – Estrutura de um Microsatélite	11
Figura 12 – Estrutura de um SNP	14
Esquema 1 – Métodos e procedimentos efectuados	23
Tabela 2 – Descrição dos marcadores utilizados para Canídeos	31
Tabela 3 – Condições de amplificação para STRs de canídeos	32
Tabela 4 – Descrição dos marcadores utilizados para Felídeos	33
Tabela 5 – Constituição da <i>Master Mix</i> para n=1	34
Tabela 6 – Condições de Amplificação para STRs de felídeos	34
Figura 13 – Esquema da Electroforese Capilar	36
Tabela 7 – Condições da Corrida Electroforética	36
Figura 14 – Constituição do pêlo	39
Figuras 15A e 15 B – Raiz e haste do pêlo de canídeo	40
Tabela 8 – Comparação das características dos cabelos humanos e não humanos	41
Tabela 9 – Caracterização macroscópica de pêlos de canídeos	43
Tabela 10 – Caracterização microscópica de pêlos de canídeos	46
Figuras 16 – Pêlo de Canídeo (Imagens Obtidas em microscopia óptica)	47
Figura 17 – Electroferograma obtido para os STRs PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 e FHC2079 de canídeos.	48

Figura 18 – Electroferograma obtido para os STRs FCA733, FCA723 e FCA731 de felídeos.	49
Tabela 11 – Parâmetros de diversidade genética determinados em 10 STRs de canídeos	52
Tabela 12 – Locus PEZ1	53
Gráfico 1 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ1	53
Tabela 13 – Locus FHC2054.....	54
Gráfico 2 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FHC2054.....	54
Tabela 14 – LocusFHC2010.....	55
Gráfico 3 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FHC2010.....	55
Tabela 15 – Locus PEZ5	56
Gráfico 4 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ5	56
Tabela 16 – Locus PEZ20	57
Gráfico 5 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ20	57
Tabela 17 – Locus PEZ12	58
Gráfico 6 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ12	59
Tabela 18 – Locus PEZ3	60
Gráfico 7 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ3	61
Tabela 19 – Locus PEZ6	62
Gráfico 8 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ6	63
Tabela 20 – Locus PEZ8	64
Gráfico 9 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ8	65
Tabela 21 – Locus FHC2079.....	66
Gráfico 10 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FHC2079.....	66
Tabela 22 – Parâmetros de diversidade genética determinados em 3 STRs de Felídeos.....	69
Tabela 23 – Locus FCA733.....	70
Gráfico 11 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FCA733.....	71
Tabela 24 – Locus FCA723.....	72
Gráfico 12 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FCA723.....	73
Tabela 25 – Locus FCA731.....	74
Gráfico 13 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FCA731.....	75

Agradecimentos

A todos quantos viabilizaram e apoiaram o desenvolvimento deste trabalho agradeço profundamente.

Em particular:

Ao Sr. Professor Doutor Duarte Nuno Vieira, Presidente do Instituto Nacional de Medicina Legal e coordenador do Curso de Mestrado, pelo exemplo ímpar que representa na área da Medicina Legal e Ciências Forenses.

Ao Sr. Professor Doutor Francisco Côrte-Real, por ter aceite a orientação da presente Dissertação de Mestrado.

À Sra. Doutora Ângela Xufre, co-orientadora da presente Dissertação de Mestrado. Obrigada pelas indicações, pelos conhecimentos que me transmitiu, pela simpatia e disponibilidade.

À Sra. Dra. Maria João Porto, directora do Serviço de Genética e Biologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação de Coimbra.

À Mestre. Ana Mónica Carvalho, do Serviço de Genética e Biologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação de Coimbra. Obrigada pelo interesse, pelos conselhos e sugestões.

Aos restantes membros do Serviço de Genética e Biologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação de Coimbra: Mestre Ana Margarida Bento, Mestre Filipa Balsa, Dr. Armando Serra, Dra. Virgínia Lopes, Sra. Clara Oliveira e Sra. Luísa Batista, pelo apoio prestado e pelos conhecimentos que me transmitiram.

À Dra. Marta Melo e à Dra. Sónia Lopes, da Dnatech. Obrigada pela disponibilidade e amizade.

À Sra. Doutora Maria do Mar Oom, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelo apoio prestado na análise dos dados.

Ao Dr. Nuno Paixão, à Dra. Susana Oliveira, à Dra. Sofia Peças, do Hospital Veterinário Central; à Dra. Cristina Perdigão e Dra. Sandra Cohen, do Hospital Veterinário do Seixal, e à Dra. Cláudia Florêncio e Dr. Miguel Almeida, do Canil do Seixal, pela colaboração na recolha das amostras.

Aos meus amigos e família pelo apoio incondicional, em particular à minha irmã pela paciência e dedicação!

Resumo

Numa investigação criminal, as amostras biológicas encontradas são maioritariamente humanas. Todavia, não são as únicas passíveis de constituir prova forense.

Animais domésticos como gatos (*Felis catus*) e cães (*Canis familiaris*) coabitam com os seres humanos e depositam amostras biológicas, designadamente pêlos, saliva e sangue, que podem vir a ser úteis para incriminar ou para provar a inocência de um suspeito.

O presente estudo tem por objectivo implementar técnicas de identificação individual através da análise de *Short Tandem Repeats* (STRs) do ADN nuclear para cada uma das espécies em estudo.

Foram analisadas 61 amostras de canídeos de várias raças sem parentesco entre si. As amostras sanguíneas foram extraídas pelo método Chelex100[®] e os pêlos extraídos pelo kit comercial DNA IQ[™] (Promega), tendo sido amplificadas com o *Multiplex Canine Stockmarks* (*Applied Biosystems*) com os marcadores PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 e FHC2079. Relativamente às amostras felinas, foram analisadas 64 amostras sanguíneas de animais sem parentesco entre si, extraídas pelo método Chelex100[®] e amplificadas para os marcadores FCA733, FCA723 e FCA731.

As Frequências Alélicas, a Heterozigotia esperada (Hesp), a Heterozigotia observada (Hobs) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foram calculados através do programa de computador CERVUS 3.0.3.

Os resultados evidenciaram uma elevada diversidade genética dos marcadores utilizados, para ambas as espécies e para as populações estudadas. Todos os *loci* estudados mostraram um elevado grau de polimorfismo e revelaram-se altamente informativos, tratando-se de uma importante ferramenta auxiliar na resolução de crimes e outras situações que envolvam amostras animais.

Este estudo pretende contribuir para a identificação genética de amostras de proveniência animal (*Felis catus* e *Canis familiaris*) e para o aumento do potencial forense deste tipo de amostras.

Palavras-chave: Canídeos, Felídeos, identificação individual, STRs, polimorfismos

Abstract

In a criminal investigation, the biological samples found are mostly human. However, they are not the only ones capable of provide forensic evidence.

Pets such as cats (*Felis catus*) and dogs (*Canis familiaris*) live with human and deposit biological samples, including hair, saliva and blood, which may be useful to incriminate or to prove the innocence of a suspect.

This study aims to implement techniques of individual identification by analysis of Short Tandem Repeats (STRs) of nuclear DNA, for each species under study.

There were analyzed 61 samples of non related dogs. The blood samples were extracted by the Chelex100® method and the hair extracted by the commercial kit IQTM DNA (Promega) and amplified with the multiplex canine Stockmarks (Applied Biosystems) with the markers PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 and FHC2079. For the feline samples were analyzed 64 blood samples from non related animals, extracted by the Chelex100 ® method and amplified for the markers FCA733, FCA723 and FCA731.

The Allele Frequencies, the Expected Heterozygote (Hesp), the Observed Heterozygote (Hobs) and Polymorphic Information Content (PIC) were calculated using the computer program CERVUS 3.0.3.

The results showed a high genetic diversity of markers used for both species and for both populations studied. All loci studied showed a high degree of polymorphism and they are highly informative; they are an important tool to assist in solving crime scene and casework related problems involving animal samples.

This study intends to contribute to the genetic identification of samples of animal origin (*Felis catus* and *Canis familiaris*) and also to increase the forensic potential of this type of samples.

Keywords: Canids, Felids, Individual Identification, STRs, Polymorphisms

1 Introdução

1 Introdução

1.1 As espécies em estudo

Os Mamíferos são um grupo muito diversificado, diferindo na estrutura e dimensão corporais e no *habitat* em que vivem. Devido ao seu sistema nervoso altamente desenvolvido e às suas numerosas adaptações, ocupam quase todo o ambiente na Terra capaz de suportar vida. Apesar de não serem um grupo numeroso, comparativamente às aves ou aos insectos, são o grupo mais diferenciado do Reino Animal (Hickman, 1997).

Os primeiros Mamíferos surgiram na era Mesozóica (ver fig. 1), que durou cerca de cento e sessenta milhões de anos. Na era seguinte, no Cenozóico, isto é, nos últimos sessenta e cinco milhões de anos, os Mamíferos ganharam supremacia, expandiram-se por todo o planeta e evoluíram numa ampla variedade de espécies (Mitchell, 1979).

No Paleocénico, a fauna de Mamíferos compreendia a ordem dos Créodontes, animais de pequenas dimensões, com formas pesadas, patas curtas e semi-plantígrados, mas evidenciando garras, prenúncio dos Carnívoros. Os primeiros Carnívoros que se conhecem desta época eram, do ponto de vista anatómico, bastante diferentes dos Carnívoros actuais, tendo desaparecido durante o período Eocénico e sendo substituídos pelos Carnívoros Fissípedes (Royal Canin, 2003). No seguimento da Ordem dos Créodontes, o *Miacis* (fig. 2 e 3), um tipo de gineto arborícola da América e Eurásia, com patas e corpo mais compridos, deu origem aos Miacídeos, animais intermediários entre os Créodontes e os Fissípedes. Estes eram animais de pequenas dimensões, provavelmente silvícolas.

Os Miacídeos extinguiram-se no final do período Eocénico e constituem certamente a origem mais provável (figura 4) dos antepassados remotos dos felinos e dos caninos actuais (Royal Canin, 2003).

EON	ERA	PERÍODO	ÉPOCA	MILHÕES DE ANOS	EVOLUÇÃO BIOLÓGICA	
FANEROZÓICO	GENOZÓICO	QUATERNÁRIO	RECENTE OU HOLOCÉNICO	0.01	Faunas e floras actuais	
			PLISTOCÉNICO	1.8		
		TERCIÁRIO	NEOGÉNICO	PLIOCÉNICO		5.3
				MIOCÉNICO		23.8
			PALEOGÉNICO	OLIGOCÉNICO		34.6
		EOCÉNICO		40		
		MESOZÓICO	CRETÁCICO	PALEOCÉNICO		56
				65		
				145		
	PALEOZÓICO	JURÁSSICO		208		
			TRIÁSICO	245		
			PÉRMICO	290		
		CARBONÍFERO		363		
			DEVÓNICO	409		
	SILÚRICO		439			
ORDOVICIANO		510				
CÂMBRICO		544				
PROTEROZÓICO	VENDIANO		544			
			1000			
			1400			
			1800			
ARCAICO			1800			
			2000			
			2500			
HADAICO			2500			
			3100			
			3500			
			4000			
			4600			

Figura 1 – Tempo geológico

Adaptado de J. Pais, Centro de Estudos Geológicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Monte da Caparica, disponível em <http://www.geopor.pt/imagens/HTerra.JPG>

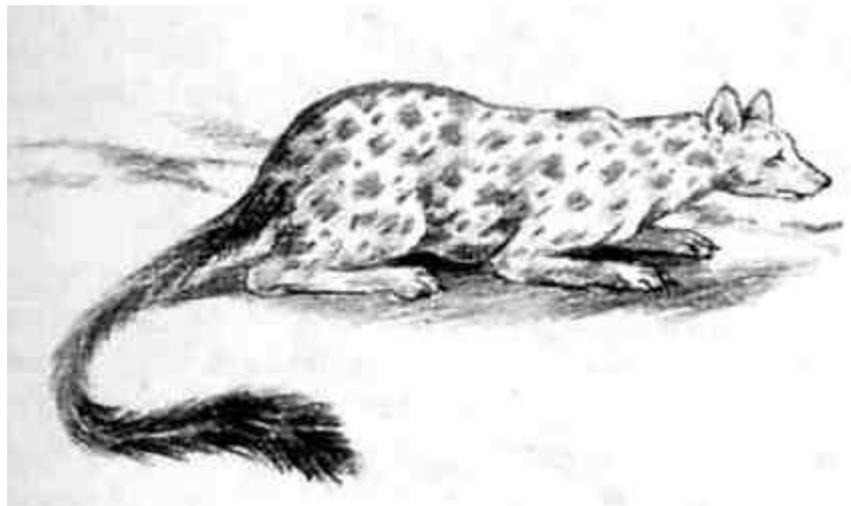


Figura 2 – Miacis

Disponível em <http://www.dogwhispererworld.co.uk/theordercarnivora.html>



Figura 3 – Miacis

Disponível em <http://wilddead.skyrock.com/3.html>

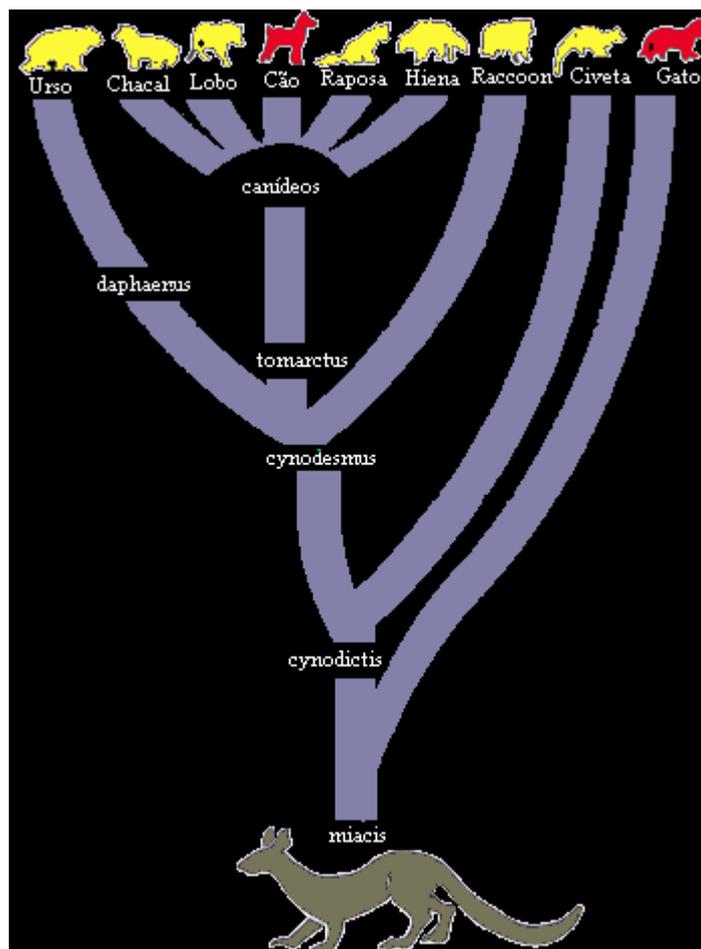


Figura 4 – Evolução dos Canídeos e Felídeos a partir do Miacis
http://www.sosmascote.com.br/pages/origem_dos_caes.htm

1.1.1 *Canis familiaris*

Os canídeos são Mamíferos caracterizados por possuírem dentes caninos pontiagudos, dentição adaptada a um regime omnívoro e um esqueleto dimensionado para a locomoção digitígrada.

Achados arqueológicos do Mesolítico de locais de todo o mundo indicam que o cão foi o primeiro animal doméstico (Clutton-Brock, 1995, cit. por Savolainen, 2002). Os mais antigos esqueletos de cães descobertos datam aproximadamente de trinta mil anos após o aparecimento do Homem de Cro-Magnon (*Homo sapiens sapiens*). A sua exumação foi sempre feita em associação com restos de ossadas humanas, razão que justifica a designação *Canis familiaris*. Afigura-se lógico pensar que o cão doméstico descenda de um canídeo

selvagem pré-existente. Entre os potenciais antepassados figuram o lobo (*Canis lupus*), o chacal (*Canis aureus*) e o coiote (*Canis latrans*) (Royal Canin, 2001). Numerosas teorias com base em analogias osteológicas e dentárias confrontaram-se durante muito tempo no sentido de atribuir apenas a uma destas espécies a qualidade de antepassado do cão. Contudo, outras teorias avançam a hipótese de que raças de cães tão diferentes como o Chow-Chow ou o Galgo poderiam descender de espécies diferentes do mesmo género *Canis* (Royal Canin, 2001). Uma origem a partir de diversas populações de lobos poderia explicar a grande variação morfológica entre as raças de cães (Savolainen *et al.*, 2002).

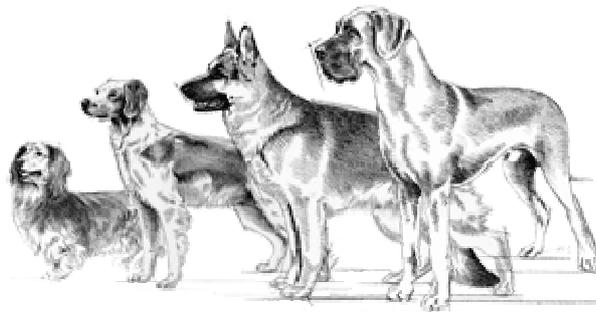


Figura 5 – Várias Raças de Cães
<http://www.royalcanin.pt/main.aspx>

1.1.2 *Felis catus*

Os felinos parecem igualmente descender da família dos Miacídeos que apareceram nas regiões correspondentes ao actual continente norte-americano. Foram encontrados fósseis de felinos que datam de há quarenta milhões de anos (Mitchell, 1979).

Na era Quaternária surgiram os primeiros gatos selvagens actuais. Datado provavelmente do início do Pleistocénico (um milhão e oitocentos mil anos), o gato selvagem de *Martelli* (*Felis lunensis*) pode ser considerado um dos antepassados directos dos nossos gatos actuais. Este felino teria dado origem ao gato selvagem (*Felis silvestris*) que apareceu no final do segundo período glacial. Rapidamente, espalhou-se pela Europa, Ásia e África, evoluindo para três tipos principais: o Gato Selvagem Europeu ou Gato do Mato (*Felis silvestris silvestris*), o Gato Selvagem Africano (*Felis silvestris lybica*) e o Gato do Deserto Asiático

ou Gato Ornado (*Felis silvestris ornata*). De acordo com alguns pareceres, a separação total entre os Gatos Selvagens Europeus e Africanos terá ocorrido há cerca de vinte mil anos (Royal Canin, 2003).

O Gato Doméstico (*Felis silvestris catus*) descende do gato selvagem africano e pensa-se que provenha de diversas espécies selvagens, entre as quais o Gato Ornado (*Felis silvestris ornata*) existente no Irão, Paquistão e Índia. Este animal, que se aproximou naturalmente do homem, tinha uma pelagem cinzenta amarelada com manchas negras arredondadas e uma cauda longa, anelada e negra na extremidade.

A domesticação do gato permanece envolta em mistério. Segundo a crença tradicional, a domesticação terá ocorrido no Egito, local onde foram encontrados os primeiros vestígios da domesticação do gato, por volta do ano quatro mil e quinhentos A.C.. O gato egípcio seria, assim, descendente de uma das subespécies do gato selvagem. Inicialmente, este gato começou por ser um comensal do Homem, partilhando a sua alimentação; posteriormente, estabeleceu-se uma relação de maior proximidade entre o Homem e o animal, que primeiro se tornou "familiar" e, mais tarde, de "companhia".



Figura 6 – Gato Doméstico
www.mundodosanimais.com

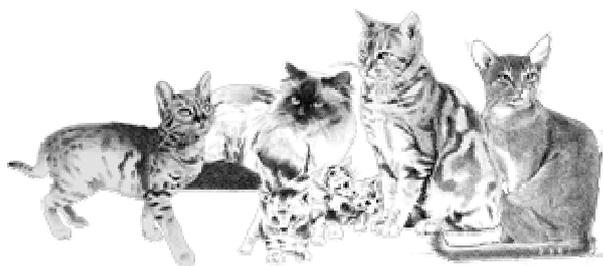


Figura 7 – Várias raças de Gatos Domésticos

<http://www.royalcanin.pt/main.aspx>

Reino	<i>Animalia</i>	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Chordata</i>	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Mammalia</i>	<i>Mammalia</i>
Ordem	<i>Carnivora</i>	<i>Carnivora</i>
Família	<i>Canidae</i>	<i>Felidae</i>
Género	<i>Canis</i>	<i>Felis</i>
Espécie	<i>Canis lupus</i>	<i>Felis silvestris</i>
Subespécie	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Felis silvestris catus</i>
	CÃO	GATO

Tabela 1 – Taxonomia das espécies em estudo

1.2 *Biologia e Genética Forenses*

A célula é a unidade básica da vida, uma “fábrica” auto sustentável, capaz de produzir matéria, energia e eliminar os seus próprios resíduos. São necessários milhares de proteínas – enzimas – para manter estas fábricas celulares operacionais. Dentro das células, uma substância conhecida como ADN (ácido desoxirribonucleico) contém a informação necessária para proceder à sua replicação e construir as enzimas que são necessárias. O ADN total de uma célula é chamado de genoma. O genoma tem uma pequena componente mitocondrial existente nas mitocôndrias (organelos citoplasmáticos) e uma componente nuclear, localizada no núcleo das células.

O ADN é uma molécula biológica complexa que codifica toda a informação genética de um organismo. A sua estrutura foi descrita por James Watson e Francis Crick em 1953. Tem a forma de uma dupla hélice, duas cadeias helicoidais compostas por nucleótidos que se enrolam à volta de um eixo comum com orientações opostas ou antiparalelas, com as bases nucleotídicas dispostas para o interior da hélice (figura 8).

Cada nucleótido é composto por uma base, uma molécula de desoxirribose e uma molécula de fosfato (figura 9). As bases podem ser púricas, a Adenina (A) e a Guanina (G), ou pirimídicas, a citosina (C) e a Timina (T).

Relativamente ao ADN mitocondrial (ADNmt), este está localizado nas mitocôndrias, pequenos organitos celulares, que produzem energia para os processos bioquímicos que ocorrem na célula, como a divisão celular e a replicação de ADN. Estes organitos são semi-autónomos e têm um ADN específico que lhes permite a auto-replicação. O ADNmt está organizado num único cromossoma circular e possui cerca de 16569 pares de bases (Pb).

Por outro lado, o ADN nuclear encontra-se no núcleo das células e está organizado em pequenas estruturas, os cromossomas. Cada molécula de ADN num cromossoma é composta por vários tipos de sequências – sequências codificantes, sequências pseudo-codificantes e sequências sem qualquer função conhecida.

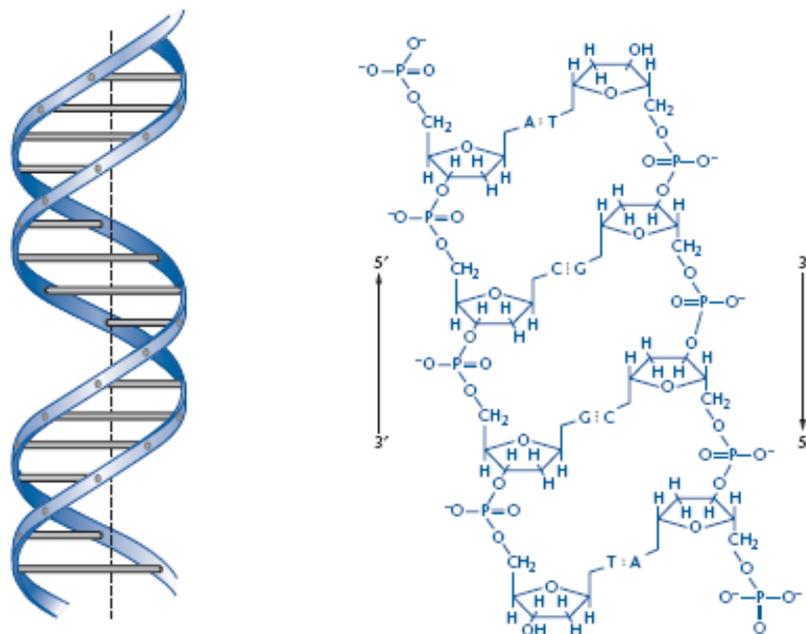


Figura 8 – Estrutura do ADN
(Wiley, 2005)

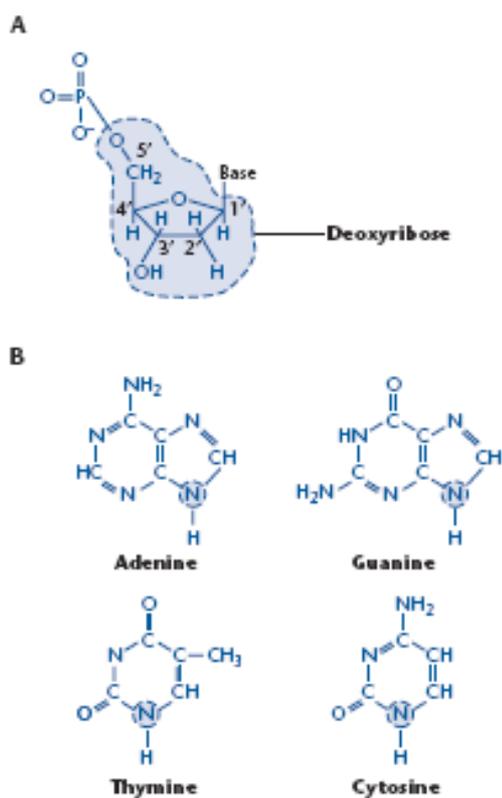


Figura 9 – A: nucleótido; B: Bases azotadas
(Wiley, 2005)

As sequências codificantes são conhecidas como genes e contêm a informação necessária para que a célula fabrique proteínas; as sequências pseudo-codificantes contêm informação para os elementos que regulam a actividade de genes; as sequências não codificantes, são também chamadas de “*junk DNA*” – lixo genético pois não traduzem informação genética (Gunn, 2006).

A análise do ADN nuclear permitiu ainda definir que no genoma humano existem regiões não codificantes que se podem classificar em ADN não repetitivo ou ADN repetitivo. Estas regiões repetitivas ou hipervariáveis, designadas de loci VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), são chamadas minissatélites se a sequência (*core*) é constituída por 10-70pb que se repete entre 20 e 60 vezes (figura 10). Se as referidas sequências são constituídas apenas por 2-7 nucleótidos que se repetem (figura 11), também, várias vezes, as regiões são denominadas microsatélites ou loci STR (Short Tandem Repeats) (Semikhosdkii, 2007).

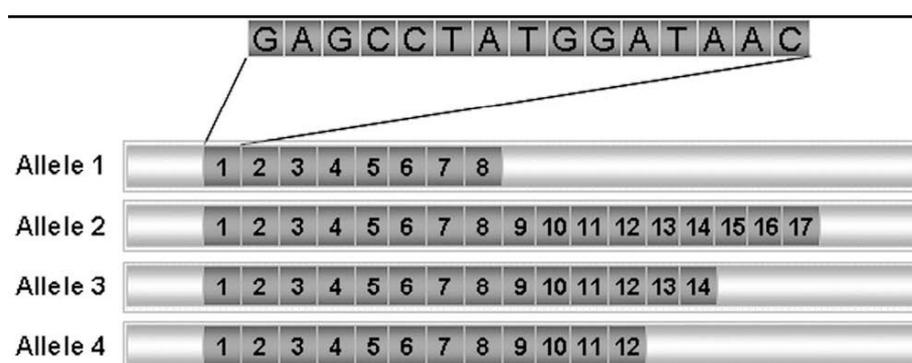


Figura 10 – Estrutura de um locus Minissatélite
(Semikhosdkii, 2007)

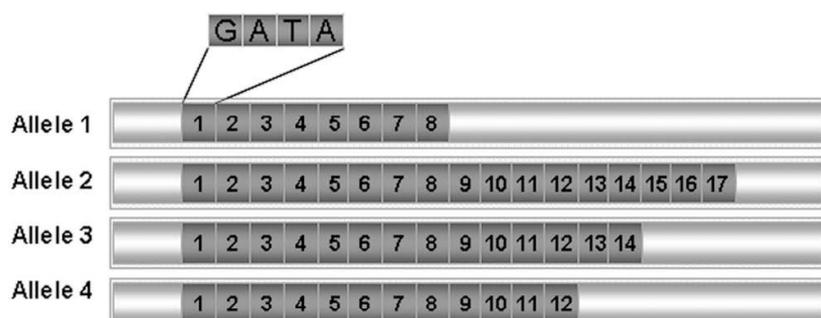


Figura 11 – Estrutura de um Microsatélite
(Semikhosdkii, 2007)

O ADN que forma estas regiões hipervariáveis (HVR-Hipervariable Regions) do genoma, proporciona a existência de uma grande variação entre os indivíduos de uma população. Esta variação consiste no número de vezes que a sequência (*core*) se repete e é variável de indivíduo para indivíduo, permitindo uma individualização. São estas regiões, não codificantes e hipervariáveis, que têm interesse forense.

O objectivo da análise forense de ADN consiste em identificar a fonte biológica dos elementos de prova recolhidos numa cena do crime; o ADN pode ser usado para identificar, por exemplo, uma vítima ou um criminoso em crimes graves de violação, ataque sexual ou homicídio (Gunn, 2006).

A essência da identificação forense mudou radicalmente no ano de 1985, ano em que Alec Jeffreys e seus colegas demonstraram as potencialidades do uso do ADN em investigações criminais (Jeffreys et al., 1985a e b). Jeffreys usou um método de análise de VNTR (minissatélites) que utilizava Enzimas de Restrição ou RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para revelar a variação genética.

Este método de detecção baseia-se na capacidade de certas enzimas, denominadas Enzimas de Restrição, para reconhecer e cortar uma determinada sequência de ADN. O ADN é cortado com uma Enzima de Restrição e o tamanho dos fragmentos resultantes varia de acordo com o número de repetições, sendo os fragmentos separados por electroforese.

Verificando que o número de repetições varia de pessoa para pessoa, este autor serviu-se da variação de comprimento dos segmentos num caso de violação e homicídio de duas raparigas, demonstrando a inocência de um suspeito. Nesse mesmo caso mostrou que um outro suspeito possuía um perfil de ADN que correspondia ao ADN identificado numa amostra de sémen encontrado nas cenas dos crimes.

Pouco tempo depois, alguns laboratórios usaram a técnica descoberta por Jeffreys e, em 1988, o FBI (*Federal Bureau of Investigation*), também a implementou nas suas investigações de crimes. O FBI melhorou a robustez e sensibilidade da técnica e procedeu à recolha de dados sobre a frequência de diferentes comprimentos de segmentos repetidos de ADN em várias populações (National Institute of Justice, 2000).

Entretanto, em 1986, Kary Mullis inventou uma técnica denominada PCR ou Reacção em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*), tendo recebido parte do Prémio Nobel da Química desse ano por esta invenção (Rudin et al, 2002). A PCR é actualmente usada

pela maioria dos laboratórios forenses e serve para amplificar uma quantidade ínfima de ADN, empregando o mesmo princípio que as células utilizam para proceder à replicação do seu ADN, com a diferença de copiar apenas um determinado segmento de ADN previamente escolhido, enquanto a célula faz a replicação de um cromossoma completo.

Esta técnica tornou possível a análise de ADN em cenas de crimes nas quais foi deixada uma pequeníssima quantidade de ADN e aumentou a sensibilidade e fiabilidade do sistema forense, do qual depende todo o sistema de justiça. Graças à PCR, é possível analisar com sucesso pequenas quantidades de ADN extraídas de cabelos, selos de correio, beatas de cigarro, copos de café e de outros objectos (National Institute of Justice, 2000).

Vários métodos foram desenvolvidos utilizando a PCR, nomeadamente a análise de locus STR ou microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) na literatura científica. As sequências microssatélites estão dispersas aleatoriamente no genoma e são repetições simples; geralmente o comprimento de uma unidade é de 1 a 7 nucleótidos, sendo repetida 5 a 100 vezes.

Os *loci* STR, ou regiões de microssatélite, são muito abundantes, ocupando cerca de 3% do genoma humano. Devido à sua abundância, ao elevado grau de polimorfismo e à possibilidade de serem facilmente estudados mediante técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), converteram-se nos marcadores de eleição na identificação genética humana (Fátima Pinheiro, 2008).

Os STRs mais utilizados em genética forense são os tetra ou pentaméricos (4 ou 5 pares de bases) e podem ser classificados como tendo repetições simples, repetições simples mas com repetições não consensuais, repetições compostas e repetições complexas (Semikhosdkii, 2007), podendo por isso surgir alelos com unidades de repetição parciais ou também designados de alelos intermédios.

Recentemente e ainda em estudo, outros marcadores chamaram a atenção dos cientistas forenses; esses marcadores são conhecidos como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Um SNP existe na população quando há dois alelos que diferem apenas numa base

nucleotídica (ver figura 12). Os marcadores SNP são usualmente bi-alélicos, isto é, existem apenas dois alelos num determinado *locus*.

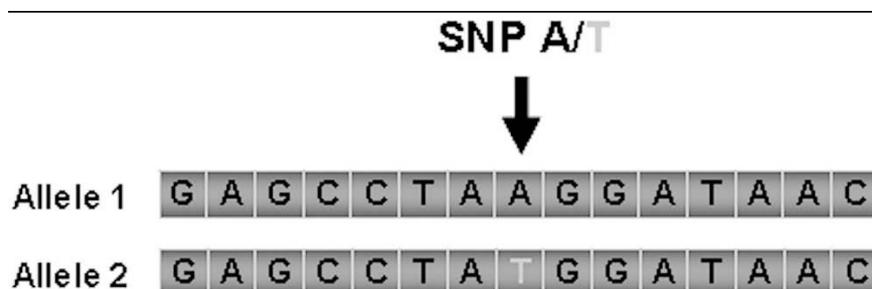


Figura 12 – Estrutura de um SNP
(Semikhosdkii, 2007)

A precisão e fiabilidade dos resultados obtidos com o perfil de ADN são afectadas por factores como o número de marcadores de ADN testados e o seu poder de discriminação. Quanto mais marcadores forem analisados, mais fiável é o resultado da análise. O poder discriminativo de um marcador é função da frequência dos alelos e do número de variantes alélicas do marcador que podem ser usados numa população específica. Em regra, quantos mais alelos para um determinado marcador estiverem presentes na população, mais informativo será o marcador (Semikhosdkii, 2007).

Um marcador de ADN ocupa um local específico num cromossoma que, por analogia com os genes, é também chamado de *locus*. Em termos forenses, os termos '*locus*' e '*marcador*' são muitas vezes utilizados alternadamente. Os indivíduos com cariótipo normal possuem duas cópias de cada cromossoma, pelo que existem também duas cópias de cada marcador de ADN. Muitas vezes, há mais do que uma variante do mesmo marcador numa população. Estes são chamados "alelos" ou "variantes alélicas".

Alguns marcadores forenses de ADN têm mais de vinte diferentes alelos, enquanto, para alguns outros marcadores, apenas dois ou três alelos são conhecidos. Quando um organismo tem dois alelos idênticos o marcador é chamado homozigótico; quando os alelos são

diferentes, é denominado heterozigótico. A combinação de alelos num determinado locus é chamada de "genótipo".

O termo "polimorfismo" é usado para descrever a presença de vários alelos de um determinado gene ou marcador de ADN numa população. Numa população polimórfica, os alelos de um determinado locus estão presentes com uma frequência específica. A frequência alélica é determinada como a proporção de um alelo específico num determinado locus entre todos os alelos presentes na população. As frequências alélicas variam consoante o tipo de população e etnia. Todos os cálculos ou probabilidades de uma comparação de ADN são baseados em frequências alélicas.

Outra medida de polimorfismo ou variabilidade genética é a heterozigotia, considerando-se um *locus* polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência inferior a 0,95. A heterozigotia de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto e depende do número de alelos e de sua frequência na população. A heterozigotia observada é a proporção de indivíduos heterozigotos nas amostras da população. A heterozigotia esperada é calculada usando uma fórmula imparcial ou não enviesada a partir das frequências alélicas, assumindo que se verifica o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A lei de Hardy-Weinberg foi verificada independentemente por Godfrey Hardy e Wilhelm Weinberg, em 1908. Segundo estes autores, numa população de grandes dimensões, com acasalamento aleatório, sem selecção, mutação ou migração, as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes de geração em geração, considerando-se uma população em completo equilíbrio. A heterozigotia esperada é equivalente à heterozigotia observada quando as populações se encontram em completo equilíbrio.

Um outro indicador de qualidade do marcador em estudos genéticos (e.g. segregação, identificação de populações e controlo de paternidade) é o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein e colaboradores (1980). Segundo a classificação destes autores, os marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito

informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos e os que têm valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

A análise do ADN tornou-se uma ferramenta indispensável, de importância fundamental em Medicina Legal, pois permite uma identificação inequívoca dos criminosos ou a absolvição de inocentes suspeitos através de vestígios biológicos, sendo utilizado o ADN de seres humanos e de muitos outros organismos, tais como gatos, cães, ovinos, bovinos, tigres, cavalos, plantas e bactérias (Buckleton *et al.*, 2005).

1.3 Fundamentação do tema

Numa investigação criminal, as amostras biológicas encontradas são maioritariamente humanas. Contudo, podem não ser as únicas passíveis de constituir prova forense. Isto porque, uma grande percentagem de pessoas possui animais de estimação, com os quais mantém uma relação de proximidade. Animais como gatos (*Felis catus*) e cães (*Canis familiaris*) coabitam com os seres humanos e depositam amostras biológicas, designadamente pêlos, saliva e sangue, que podem vir a ser úteis para incriminar ou para provar a inocência de um suspeito.

Em cenas de crimes, para além das amostras biológicas humanas, é comum encontrar também pêlos de animais, embora estes sejam frequentemente subestimados como vestígios (Halverson & Basten, 2005). Apesar de estar demonstrada a potencialidade do pêlo como vestígio biológico, o seu estudo morfológico permite distinguir espécies mas não revelar uma identificação positiva nem uma individualização. Para além disso, raramente podem ser usados para excluir um indivíduo ou uma raça, sendo necessária a obtenção do perfil genético (D'Andrea *et al.* 1998). Desta forma, a aplicação da análise de ADN a estas amostras pode providenciar uma significativa melhoria nas investigações forenses (Savolainen, 1999).

O ADN animal pode efectivamente ser usado para relacionar suspeitos com a cena de crime e vários estudos foram desenvolvidos no sentido de evidenciar o potencial forense de amostras animais, nomeadamente estudos sobre a transferência de pêlos de animais das vítimas para o agressor (D'Andrea *et al.* 1998).

Outros estudos genéticos têm sido realizados no sentido de complementar a caracterização morfológica dos pêlos, nomeadamente ao nível do ADN mitocondrial. Uma das regiões usada para estabelecer relações filogenéticas entre várias espécies e na identificação destas, é um fragmento de um gene que codifica para o citocromo b (cytb) (Branicki e tal, 2003). Este tem sido usado com sucesso em aplicações forenses, permitindo a identificação específica de outros vestígios biológicos que não os pêlos, contudo, à semelhança da caracterização morfológica destes, permite apenas uma identificação da espécie e não uma identificação individual.

Alguns estudos em genética animal, utilizando quer ADN mitocondrial quer nuclear, têm contribuído para a resolução de investigações criminais, nomeadamente, em casos de mortes ilegais de animais (Pádár *et al.* 2001), ataques caninos que podem resultar em morte de humanos (Brauner e tal, 2001; Padar *et al.* 2002; Eichmann et al, 2004c; Tsuji, 2008), para ilibar um animal (Wiegand *et al.*, 1999) ou mesmo para relacionar um suspeito com o crime (Shutler *et al.*, 1999).

A título de exemplo encontra-se um caso descrito por Halverson e Basten (2005), em que membros de um *gang*, à procura de dinheiro para droga, invadiram uma casa e assassinaram um jovem casal; o cão do casal atacou um dos agressores acabando por ser morto com dois disparos a curta distância. Houve transferência do sangue no animal para as roupas do agressor que mais tarde permitiram a confirmação dos suspeitos como autores do crime.

Segundo Butler (2005), existem três tipos diferentes de evidências de ADN animal: o animal como testemunha (1), o animal como agressor (2) e o animal como vítima (3):

(1) Os pêlos dos animais de estimação podem ser facilmente encontrados nas roupas, nas casas, nos carros e são transferidos nas actividades diárias (Halverson & Basten, 2005).

Desta forma, um suspeito pode, sem saber, transportar pêlos do gato da vítima para longe da cena de crime ou deixar pêlos do seu próprio gato na própria cena do crime (Butler, 2005);

(2) Quando os animais estão envolvidos em ataques a pessoas, a tipificação do ADN pode ser usada para identificar o animal agressor sendo que, em caso de falecimento da vítima, o ADN pode ser a única testemunha capaz de provar a culpa ou inocência de um determinado animal (Butler, 2005);

(3) O reconhecimento da importância dos direitos dos animais emerge actualmente em todo o mundo e, à parte dos aspectos éticos, as lutas de animais podem trazer graves consequências para pessoas e bens (Pádár *et al*, 2001). Os restos mortais de um animal perdido ou um animal roubado podem também ser positivamente identificados através de análise genética (Butler, 2005).

Relativamente à análise de ADN nuclear, a identificação genética humana utiliza *Short Tandem Repeats* (STRs ou microssatélites), método escolhido devido à grande informação contida nestes marcadores, à sua standardização na comunidade forense bem como à disponibilização de kits comerciais (Halverson & Basten, 2005). Os microssatélites no genoma humano foram pela primeira vez descritos em 1990. Os cientistas aperceberam-se rapidamente da utilidade destes para o mapeamento genético de seres humanos e outras espécies; o primeiro registo para canídeos apareceu em 1993 (Halverson & Basten, 2005).

No cão doméstico foram já caracterizados vários marcadores STR (Butler, 2005). Esta espécie possui trinta e oito pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais; vários marcadores STR têm sido mapeados e caracterizados para a espécie *Canis familiaris*, inicialmente para efeitos de pedigrees e análises de parentesco (Denise *et al*, 2003; Halverson & Basten, 2005) e mais tarde para uso forense (Eichmann *et al*, 2004a e 2005; Hellmann *et al* 2005).

No decorrer do seu trabalho, Eichmann e colaboradores (2004b) caracterizaram e propuseram uma nomenclatura para 15 STRs caninos, no sentido de standardizar o uso desses marcadores em contexto forense. Contudo não existe ainda uma uniformização e

vários autores utilizam diferentes conjuntos de microssatélites. Muito recentemente, Dayton e colaboradores (2009), desenvolveram um novo kit com 18 STRs para estudos forenses.

Relativamente aos gatos (*Felis catus*), estes possuem dezoito pares de autossomas e um par de cromossomas sexuais (X e Y); À semelhança dos canídeos, têm sido desenvolvidos marcadores genéticos (STR) em cada um dos cromossomas desta espécie (Menotti-Raymond et al. 1997). Um painel designado de ‘MeowPlex’ foi desenvolvido por Butler e colaboradores, em 2002, e validado por Coomber e colaboradores, em 2007, para identificação de amostras de origem felina.

1.4 Objectivos

O presente trabalho tem como principal objectivo a determinação da identificação individual do animal para cada uma das espécies em estudo.

Este estudo tem como propósito analisar vários *loci* microssatélites (STRs) para as espécies *Felis catus* e *Canis familiaris*, pretendendo-se evidenciar/demonstrar a importância do estudo genético de amostras animais em contexto forense.

É também objectivo deste estudo a optimização e implementação de técnicas de genética animal para identificação forense, no Serviço de Genética do Instituto Nacional de Medicina Legal, Delegação do Centro.

2 Metodologia

2 Metodologia

2.1 Amostragem

Foram recolhidas 61 amostras de duas origens (sangue e pêlo da região dorsal) no caso da espécie *Canis familiaris* e 64 amostras sanguíneas relativas à espécie *Felis catus*. A ficha de colheita de amostras encontra-se no Anexo 1. Para este estudo foram colhidas amostras de animais de diversas raças para ambas as espécies (Anexos 2 e 3).

As amostras foram colhidas entre Fevereiro e Setembro de 2008 no Hospital Veterinário Central, no Hospital Veterinário do Seixal e no Canil/Gatil Municipal do Seixal, tendo sido obtido o consentimento informado por parte dos proprietários ou responsáveis legais. Os animais foram escolhidos de forma aleatória e todos os indivíduos pertencentes à amostragem foram considerados não aparentados.

As amostras sanguíneas foram colhidas pelo veterinário por punção venosa sem qualquer tipo de anticoagulante e foi de seguida feita uma mancha em papel FTA (*FTA Classic Card Whatman Inc., USA*) a qual foi armazenada à temperatura ambiente. Este papel é composto por uma matriz de celulose que contém químicos que permitem a lise celular, a preservação dos ácidos nucleicos e, ao mesmo tempo, inibem o crescimento bacteriano.

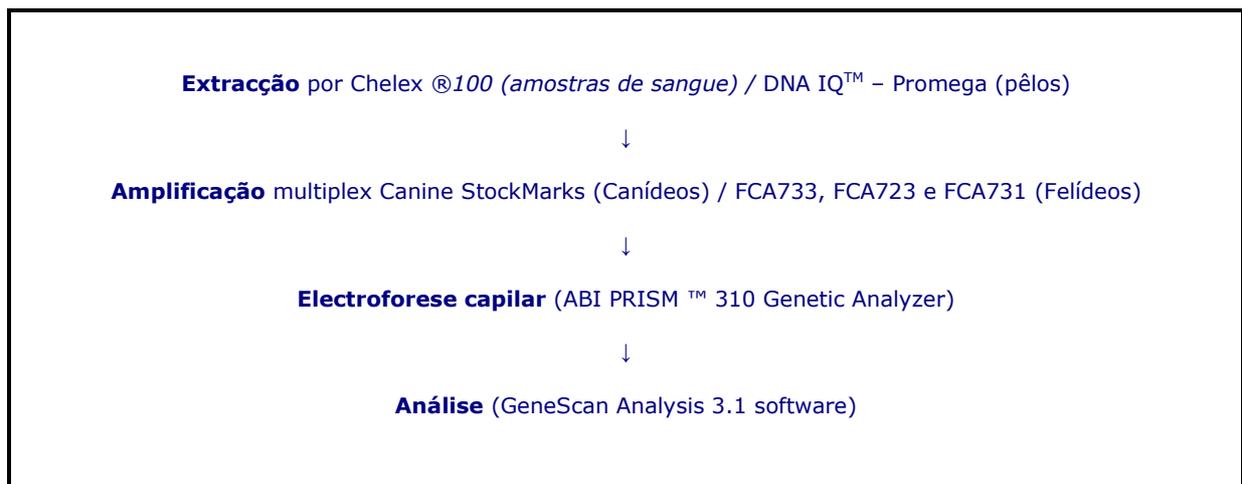
Os pêlos foram colhidos pelo próprio autor do estudo, usando luvas descartáveis, para cada animal, de forma a minimizar possíveis contaminações entre animais. Foram colhidos na região dorsal, por arracamento, garantido assim a presença de folículo, foram depois colocados separadamente em envelopes de papel e armazenados igualmente à temperatura ambiente.

As amostras sanguíneas nos canídeos, uma vez que são amostras que contêm mais material celular, serviram de referência para as amostras de pêlos, amostras mais complicadas para a extracção de ADN e com mais interesse forense.

Nos felídeos recolheu-se apenas sangue uma vez que, havendo poucos estudos realizados, seria necessário primeiramente testar os marcadores com amostras que seguramente teriam ADN.

2.2 Técnicas utilizadas

Neste estudo foram utilizados métodos, procedimentos e técnicas (Esquema 1) e em todas eles foram seguidos todos os procedimentos laboratoriais de assépsia, designadamente o uso de câmara própria previamente irradiada com raios ultra-violeta, de forma a evitar contaminações. Foram utilizados controlos negativos (amostra sem material biológico) e positivos (amostra para a qual já se obtiveram resultados positivos) para os processos de extracção, amplificação e electroforese capilar.



Esquema 1 – Métodos e procedimentos efectuados

2.2.1 Extracção

O ADN pode ser extraído e isolado de qualquer amostra biológica que contenha células nucleadas. Para esse procedimento existem numerosos métodos e a escolha depende de vários factores, nomeadamente do tipo de amostra e da quantidade disponível, o que em estudos forenses pode ser limitante.

Independentemente da técnica, a extracção de ADN pode ser dividida em três fases: a ruptura das membranas celulares e consequente lise celular, a desnaturação de proteínas e a separação do ADN das proteínas desnaturadas e outros componentes celulares (Goodwin, 2007).

Neste estudo foram colhidas amostras provenientes de duas origens: sangue e pêlo, tendo sido utilizado o método Chelex®100 para amostras sanguíneas e o *kit* de extracção *DNA IQ™* (Promega) para pêlos. No caso de amostras sanguíneas para as quais não houve resultados com o método Chelex®100, foi igualmente usado o *kit* de extracção *DNA IQ™* (Promega) com as devidas alterações para o uso de amostras sanguíneas.

2.2.1.1 Extracção de Sangue pelo método Chelex®100

O método de extracção Chelex®100 (Walsh *et al*, 1991) foi introduzido em 1991 na comunidade forense e tem sido uma alternativa rápida e eficaz ao método orgânico (fenol-clorofórmio). O Chelex é uma resina quelante, que se liga a iões metálicos polivalentes, como o Magnésio. Uma vez removido o magnésio, as endonucleases que destroem o ADN ficam inactivas, ficando o ADN protegido. A técnica recorre a elevadas temperaturas que, em conjugação com forças físicas (vortex e centrifugação), promovem a ruptura das células, com a consequente libertação do ADN, bem como a desnaturação de proteínas.

A cada mancha de sangue foi retirada uma porção com cerca de 3 mm² que foi colocada num tubo *Eppendorf* de 1,5 ml devidamente marcado com o número da amostra. Seguidamente, a cada tubo foi adicionado 1 ml de água desionizada e autoclavada e incubou-se 30 minutos à temperatura ambiente, com vista à libertação do material celular. Após esse tempo procedeu-se à centrifugação a 14000 rotações por minuto (rpm) durante 3 minutos, para provocar a lise celular.

De seguida, encontrando-se o ADN no *pellet*, o sobrenadante foi removido, deixando-se apenas 30 µl de solução. A essa porção foram adicionados 170 µl de *Chelex* 100 a 5% (5g de *Chelex* em 100 ml de água desionizada autoclavada), previamente preparado e colocaram-se os tubos em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. Seguiu-se um passo de agitação durante cerca de 5 segundos no Vortex e colocaram-se os tubos em banho fervente durante 8 minutos.

Findo este tempo, repetiu-se a agitação no Vortex, seguida de centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. As extracções foram armazenadas a -4°C sem a adição de qualquer conservante.

2.2.1.2 Extracção de ADN através do *DNA IQ™* (Promega)

O *DNA IQ™ System* é um kit de extracção e quantificação de ADN concebido especificamente para amostras vestigiais, permitindo a extracção, o isolamento e quantificação do ADN de várias amostras, podendo ser usado para extrair ADN de manchas ou líquidos. Este sistema utiliza uma tecnologia inovadora com partículas magnéticas ou para-magnéticas, baseada na utilização de sílica, aproveitando a afinidade desta para com o ADN.

Ao método de extracção é adicionada uma certa quantidade de esferas de sílica, as quais se “agarram” à maior quantidade possível de ADN. Quando o ADN é eluído da sílica, aparece a rentabilidade máxima de ADN que é possível obter (Goodwin, 2007).

Segundo Goodwin (2007), tem a vantagem de combinar os passos de extração e quantificação de ADN e a desvantagem de não ser um método específico nem para amostras humanas nem para amostras de outra origem.

2.2.1.2.1 Extração de ADN de Sangue através DNA IQ™ (Promega)

Em alguns casos, em amostras de sangue, não foi possível obter resultados com o método Chelex®100. Repetiu-se a extração dessas amostras com o kit DNA IQ™ (Promega).

A cada mancha de sangue foi retirada uma porção com cerca de 3 mm² que foi colocada num tubo *Eppendorf* de 1,5 ml devidamente marcado com o número da amostra. Seguidamente adicionou-se 150 µl da solução *Lysis Buffer* + DTT 1M (Anexo 4) iniciando-se o processo de Extração. Incubou-se durante 30 minutos a 70°C. Removeram-se os tubos da fonte de calor e adicionou-se 7µl da *DNA IQ™ Resin* ressuspendida. Colocou-se no Vortex a alta velocidade durante 3 segundos e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente.

De seguida, colocou-se no Vortex a alta velocidade para homogeneizar e colocou-se o tubo no suporte magnético (*MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand*). A separação ocorreu imediatamente e cuidadosamente retirou-se e descartou-se a solução sem perturbar o *pellet* da resina. Adicionou-se 100 µl da solução de *Lysis Buffer* + DTT 1M e removeu-se o tubo do suporte magnético. Colocou-se no Vortex a alta velocidade durante 2 segundos e seguidamente passou-se para o suporte magnético. Retirou-se e descartou-se todo o *Lysis Buffer*.

Posteriormente adicionou-se 100µl de *Wash Buffer* (1x) (anexo 4), retirou-se do suporte magnético, passando pelo Vortex durante 2 segundos voltando novamente ao suporte para descartar toda a solução sem perturbar o *pellet*. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes, num total de três lavagens. O tubo foi deixado no suporte magnético com a tampa aberta durante 5 minutos, para a resina secar. Seguidamente adicionou-se 35µl de *Elution Buffer* passando pelo Vortex durante 2 segundos para homogeneizar. Incubou-se durante 5 minutos a 65°C.

O tubo foi removido da fonte de calor, passou pelo Vortex durante 2 segundos e foi imediatamente colocado no suporte magnético. A solução de ADN foi cuidadosamente transferida para outro tubo e armazenada sem adição de qualquer conservante a -4°C.

2.2.1.2.2 *Extracção de ADN de Pêlos através DNA IQ™ (Promega)*

O procedimento laboratorial iniciou-se com a observação macroscópica e microscópica dos pêlos. Macroscopicamente foram observados parâmetros tais como a cor, comprimento e a forma do pêlo (Anexo 2). Microscopicamente foi observada a presença ou ausência de bolbo, foi descrita a parte distal, observadas as características da medula e da epidermícula, bem como medidos os índices medular e de secção de cada pêlo (Anexo 3 e 4).

Após caracterização macroscópica e microscópica do pêlo, seguiu-se o processo de lavagem: cada pêlo foi lavado individualmente com SDS (dodecil sulfato de sódio) a 2% (2g de SDS em 100 ml de água desionizada autoclavada) num vidro de relógio devidamente esterilizado durante 30 minutos; depois o SDS foi removido e fez-se uma lavagem com álcool a 96% durante 15 minutos após os quais se procedeu à lavagem com água destilada durante igual período; por fim, a água foi removida, seccionou-se o pêlo em vários fragmentos, os quais foram colocados num tubo *Eppendorf* de 1,5 ml; seguidamente adicionou-se 100 µl da solução *Incubation Buffer*/Proteinase K (anexo 5), iniciando-se o processo de Extracção. Incubou-se durante uma hora a 56°C.

Findo o período de incubação, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente e adicionou-se 200 µl de solução de *Lysis Buffer* + DTT 1M (Anexo 4) e 7 µl da *DNA IQ™ Resin* ressuspensa. Colocou-se no Vortex a alta velocidade durante 3 segundos e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os passos seguintes foram realizados como descrito anteriormente para as amostras sanguíneas. A solução de ADN foi cuidadosamente transferida para outro tubo e armazenada sem adição de qualquer conservante a -4°C.

2.2.2 Amplificação (PCR)

A Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) permite a de amplificação de ADN. Esta técnica tem revolucionado todas as áreas da Biologia Molecular, incluindo a área Forense, permitindo a amplificação quantidades relativamente pequenas de ADN. Trata-se de uma técnica simples, rápida e altamente específica, com várias vantagens, principalmente a de permitir estudar quantidades mínimas de ADN facilitando a análise forense de material antigo e degradado.

Uma reacção de PCR tem os seguintes componentes: ADN molde, primers, *Taq polimerase* termoestável, cloreto de magnésio, dNTPs e tampão de reacção.

Para amplificação através da técnica de PCR, é necessário o conhecimento prévio da sequência de nucleótidos de uma pequena parte do fragmento que se deseja amplificar para se proceder à preparação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), complementares às regiões que flanqueiam o fragmento, nos seus terminais 3' (Rapley e Whitehouse, 2007). As regiões flanqueantes devem corresponder a regiões conservativas, apresentando uma sequência comum para todos os indivíduos. Os *primers* assim obtidos vão permitir a actuação da ADN polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do ADN a amplificar.

A *Taq* polimerase é uma enzima termo estável isolada em 1960 a partir da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. Esta *Taq*, ao contrário de outras isoladas de outras espécies bacterianas, consegue tolerar as altas temperaturas, tendo a sua temperatura óptima entre os 72 e os 80°C. Actualmente existem *Taq*s modificadas, nomeadamente a *AmpliTaq Gold® polymerase* (*Applied Biosystems*), que permanecem inactivas à temperatura ambiente e apenas ganham actividade quando a solução atinge os 95°C. Com este passo de *hot start* minimizam-se as ligações inespecíficas que ocorrem quando as polimerases ganham actividade a temperaturas mais baixas (Goodwin, 2007).

O cloreto de magnésio é essencial para a reacção de PCR, uma vez que vai estabilizar os dímeros formados pelos *primers* e cadeias alvo. Por outro lado, a própria Taq polimerase necessita de magnésio para a sua actuação (Goodwin, 2007).

Para que a amplificação ocorra são ainda necessários os dNTPs, os “blocos” de construção do processo, que vão sendo incorporados na cadeia crescente de ADN durante a replicação. O tampão de reacção é necessário para manter o pH e as concentrações de sais na reacção a um nível óptimo (Goodwin, 2007).

A amplificação propriamente dita é realizada num aparelho denominado termociclador, que é capaz de automatizar a reacção (Saiki *et al*, 1988; Lawyer, 1989) que se compõe de um número determinado de ciclos, constituídos, cada um, por três fases:

- i) Desnaturalização do ADN alvo, por acção do calor, acima dos 90°C;
- ii) Acoplamento dos *primers*, por ligações de hidrogénio às sequências complementares na cadeia simples; para tal, a temperatura de reacção diminui entre os 40° e os 60°C;
- iii) extensão, através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, por volta dos 72°C, temperatura óptima para a actuação da Taq polimerase.

Estes três passos que constituem um ciclo são repetidos entre 28 a 32 vezes, sendo que, em cada ciclo, a quantidade de ADN presente aumenta exponencialmente. Em determinados casos quando a quantidade de ADN alvo é muito pequeno, os ciclos podem ser aumentados até 34 (Goodwin, 2007).

2.2.2.1 Str's Caninos

No estudo dos STRs caninos foi usado o kit de amplificação *StockMarks Canine Genotyping kit (Applied Biosystems)* de acordo com as instruções do fabricante. A identificação dos STRs e sequência dos *primers* estão descritas na tabela 2.

Cada reacção de *multiplex* foi realizada num volume final de 10 µl, contendo 1,4 µl de PCR Buffer, 0,36 µl MgCl₂ (25 mM), 2,2 µl de dNTPs (1, 25 mM), 0,36 µl de AmpliTaq Gold Polymerase (5U/ml), 2,8 µl de Primer mix (10 x) e 1,9 µl água autoclavada. Finalmente foi adicionado 1 µl de ADN à reacção. A amplificação foi levada a cabo num termociclador *GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems)*.

As condições de amplificação são descritas na Tabela 3.

Tabela 2 – Descrição dos marcadores utilizados para Canídeos

STR	Repetição	Localização Cromossômica	Fluorocromo	Sequência do <i>primer</i> directo	Sequência do <i>primer</i> Reverso	Referência
PEZ1	CATA	CFA7	FAM	GGCTGTCACCTTTCCCTTTC	CACCACAATCTCTCTCATAAATAC	Halverson (2005)
PEZ3	AAG	CFA19	NED	CACTTCTCATACCCAGACTC	CAATATGTCAACTATACTTC	Halverson (2005)
PEZ5	AAAG	CFA12	JOE	GCTATCTTGTTCCACAGC	GTCCATGTATAACATTGTC	Halverson (2005)
PEZ6	AAAT	CFA27	NED	ATGAGCACTGGGTGTTATAC	ACACAATTGCATTGTCAAAC	Halverson (2005)
PEZ8	AAAT	CFA17	NED	TATCGACTTTATCACTGTGG	ATGGAGCCTCATGTCTCATC	Halverson (2005)
PEZ12	AAAG	CFA3	JOE	GTAGATTAGATCTCAGGCAG	GTAGGTCCTGGTAGGGTGTGG	Halverson (2005)
PEZ20	AAAT	CFA22	JOE	CCTAAATTAGAGGTCTAACC	GTAAGCGGAATGTGCTCCTC	Disponível no <i>US National Institute of Standards and Technology website</i> http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/dogSTRs.htm
FHC2010	ATGA	CFA24	FAM	AAATGGAACAGTTGAGCATGC	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	Halverson (2005)
FHC2054	GATA	CFA12	FAM	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTGAACCTTCCC	Halverson (2005)
FHC2079	GGAT	CFA24	NED	CAGCCGAGCACATGGTTT	ATTGATTCTCATATGCCAGC	Halverson (2005)

1x	95°C	10 min
	95°C	30s
20x	58°C	30s
	72°C	30s
	95°C	30s
15x	56°C	30s
	72°C	60s
1x	72°C	30 min
1x	4°C	∞

Tabela 3 – Condições de amplificação para STRs de canídeos

2.2.2.2 Str's Felinos

Para os felídeos foram amplificados três STRs numa reacção em multiplex. A identificação destes, bem como a sequência dos *primers* e concentrações finais na reacção são descritas na tabela 4, tendo sido feitas algumas alterações nas concentrações dos *primers* propostas por Menotti-Raymond (2005) com vista à optimização do protocolo.

Cada reacção de *multiplex* foi realizada num volume final de 20 µl, contendo 11,02 µl de TE, 6,08 µl de Master Mix (tabela 5) 0,5 µl de BSA (0,16 mg/mL) e 1,9 µl AmpliTaq Gold Polymerase (2,0 U). Finalmente foi adicionado 2 µl de ADN à reacção. A amplificação foi levada a cabo num termociclador VWR Collection DuoCycler. As condições de amplificação são descritas na tabela 6.

Tabela 4 – Descrição dos marcadores utilizados para Felídeos

STR	Repetição	Localização Cromossômica	Fluorocromo	Sequência do primer directo	Sequência do primer Reverso	Referência
FCA733	(GATA)	B2	6 - FAM	GAAGATGTGGGATAGATACACCAA	TGTTTCAGAGGGCAAATTTCA	Menotti-Raymond (2005)
FCA723	(GGAA)G(GAAA)	A1	6- FAM	TGAAGGCTAAGGCACGATAGA	CGGAAAGATACAGGAAGGGTA	Menotti-Raymond (2005)
FCA731	(CCAT)/(CCAT)	B1	6 - FAM	GATCCGTCTATCCATCTGTCC	ATGCTCCCCTGAAGCTGTAA	Menotti-Raymond (2005)

• Tampão (1x)	2ml
• MgCl ₂ (1,5mM)	1,2 ml
• d NTP ' s (200 µM)	
dATP	0,4 ml
dTTP	0,4 ml
dCTP	0,4 ml
dGTP	0,4 ml
• Primers	
FCA733- F (0,8 µM)	0.16 ml
FCA733- R (0,8 µM)	0.16 ml
FCA723- F (1,6 µM)	0.32 ml
FCA723- R (1,6 µM)	0.32 ml
FCA731- F (1,6 µM)	0.32 ml
FCA731- R (1,6 µM)	0.32 ml

Tabela 5 – Constituição da *Master Mix* para n=1

1x	90°C	10 minutos
	94°C	1 minuto
28x	59°C	1 minuto
	72°C	1 minuto
1x	60°C	45 minutos
1x	10°C	∞

Tabela 6 – Condições de Amplificação para STRs de felídeos

2.2.3 Electroforese Capilar e análise de STR's

A detecção dos STR's, quer de canídeos quer de felídeos, foi feita por Electroforese Capilar (EC), no sequenciador automático *ABI PRISM® 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)*.

Com esta técnica, as moléculas de ADN são separadas num capilar com diâmetro interno de 50 a 100 micrómetros, possibilitando a automatização da injeção, separação e detecção. O estreito capilar permite a aplicação de elevados campos eléctricos, aumentando a rapidez da corrida electroforética e diminuindo o sobreaquecimento e outros problemas associados às altas voltagens utilizadas (Butler *et al*, 2004).

As amostras são transferidas para o capilar através de uma injeção electrocinética. Após a aplicação da voltagem, as moléculas carregadas migram dentro do capilar. Depois da injeção, é mantida uma voltagem constante através do capilar e os produtos de PCR migram em direcção ao ânodo positivamente carregado, através do polímero que enche o capilar e que actua como uma matriz (Goodwin, 2007).

Durante a EC, um laser de árgon incide no capilar através de uma janela. Os produtos de PCR marcados com fluorocromos vão migrando em direcção ao ânodo e são separados com base no seu tamanho. Quando o laser incide na marcação dos produtos de PCR, esta fica excitada e emite luz fluorescente, que passa através de um filtro que remove o ruído de fundo e depois passa para um dispositivo que detecta os comprimentos de onda e envia a informação para um computador sendo então possível analisar o perfil (Goodwin, 2007) (figura 13).

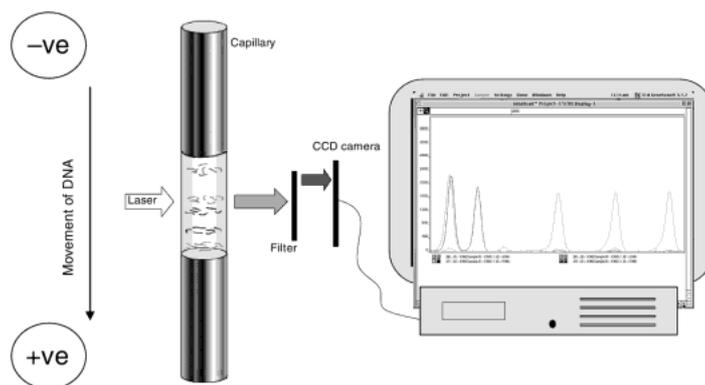


Figura 13 – Esquema da Electroforese Capilar
(Goodwin, 2007)

Para medir o tamanho dos produtos de PCR, utilizam-se fragmentos de ADN de tamanho conhecido marcados com um fluorocromo, sendo estes detectados durante a EC juntamente com os produtos de PCR (Goodwin, 2007).

Neste estudo, preparam-se as amostras, adicionando 15 μL de formamida (Hi-Di™ *Formamide* da Applied Biosystems) para 1 μL de amostra, de forma a desnaturar o ADN; adicionou-se 0,5 μL de padrão interno (ROX™ 350 para os canídeos e ROX™ 500 para os felídeos da *Applied Biosystems*) por amostras; seguidamente, os tubos foram colocados a 95° C durante 3 minutos para garantir que os produtos de PCR se encontram em cadeia simples, transferindo-se a solução obtida para o sequenciador. Foram seguidas as instruções do manual do utilizador do *ABI PRISM® 310 Genetic Analyser*. As condições da corrida encontram-se na tabela 7. Os perfis foram analisados com a aplicação *GeneScan® 3.1* da *Applied Biosystems*.

Sequenciador	310 – Genetic Analyser (ABI PRISM®)
Modulo	GS STR POP4 (1ml) F
Tempo de Injecção	5 s
Voltagem de Injecção	15,0 Kv
Voltagem de Corrida	15,0 Kv
Temperatura de Corrida	60°C
Tempo de Corrida	27 min.
Matrix	M.F. FAMJOENEDROX

Tabela 7 – Condições da Corrida Electroforética

3 Resultados e Discussão

3 Resultados e Discussão

3.1 *Extracção de ADN*

Foram analisadas amostras de duas origens (sangue e pêlo). As amostras sanguíneas foram extraídas pelo método Chelex®100, contudo não foi possível obter resultados com este método em quatro das amostras, tendo-se repetido a extracção das mesmas com o kit DNA IQ™ (Promega). Analisando a ficha clínica dos animais em questão foi possível verificar que todos eles tinham, dias antes, sido anestesiados para cirurgia, pelo que, os anestésicos, tais como, Propofol, Isoflurano e Bialzepam, estando ainda em circulação na altura da amostragem, podem ter actuado como inibidores da extracção. O facto de não ter sido possível obter resultados com o método Chelex®100 deve ter sido devido à presença de inibidores, uma vez que esta não é uma técnica muito pura. Através do kit DNA IQ™ (Promega) foi então possível extrair ADN destas quatro amostras.

Relativamente à extracção de pêlos, esta decorreu sem qualquer problema, mostrando a robustez e fiabilidade do kit, uma vez que foi possível obter ADN de um único pêlo com folículo. Foi possível obter resultados de todas as amostras extraídas.

3.2 *Caracterização macroscópica e microscópica do pêlo*

Os pêlos são compostos principalmente por queratina e podem ser definidos como finos anexos dérmicos. Cada espécie animal possui pêlos com comprimento, cor, forma, raiz e características microscópicas específicas que permitem distinguir um animal de outro. Há também uma grande variabilidade nos tipos de pêlos que são encontrados no corpo do mesmo animal, conforme a região anatómica. Da mesma forma, no ser humano, cabelos e pêlos encontrados na cabeça, região púbica, braços, pernas e outras zonas do corpo possuem características específicas que permitem identificar a sua origem (Deedrick, 2000).

No decurso de uma investigação criminal, a identificação e comparação de cabelo humano e animal pode ser útil na demonstração de contacto físico com um suspeito, vítima ou cena de

crime. Os pêlos humanos são distinguíveis dos pêlos de outros mamíferos e podem fornecer informações valiosas para os investigadores (Deedrick, 2004).

Os pêlos são compostos por três regiões morfológicas: a cutícula, o córtex e a medula; a caracterização destas requer um estudo sistemático e detalhado (Robertson, 1999).

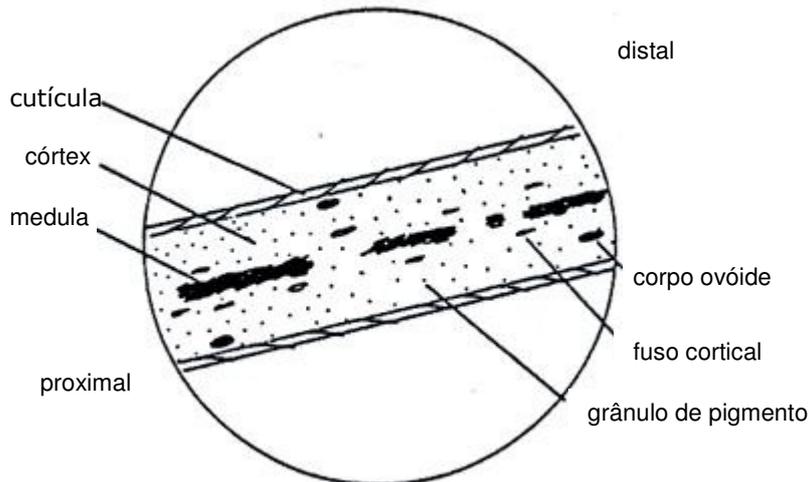


Figura 14 – Constituição do pêlo
(Robertson, 1999)

Os pêlos animais podem ser classificados em três tipos básicos (Deedrick, 2004):

1. Os que formam o revestimento exterior do animal e proporcionam protecção;
2. Os que formam o revestimento interior de um animal e proporcionam isolamento;
3. Os pêlos tácteis, que são encontrados na cabeça dos animais e têm funções sensoriais.

No que diz respeito às diferenças entre pêlos humanos e não humanos (tabela 8), os pêlos e cabelos humanos são geralmente consistentes na cor e pigmentação em todo o comprimento da haste capilar, enquanto os pêlos animais podem apresentar cores variadas e mudanças radicais numa curta distância – estrias ou anéis (do inglês *banding*) (Deedrick, 2004).

A raiz dos cabelos humanos é geralmente claviforme, enquanto as raízes dos pêlos dos animais revelam formas variadas (figura 15A).

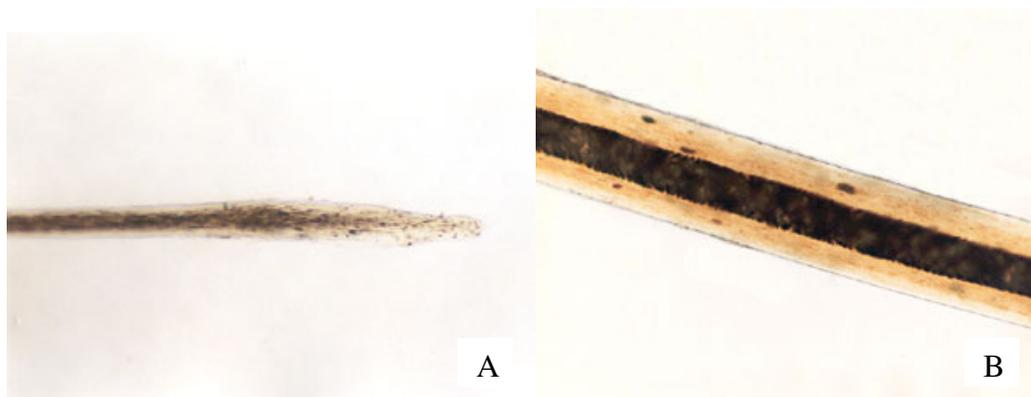
A distribuição e densidade de pigmento nos pêlos dos animais também podem ser características identificativas. A pigmentação do cabelo humano é distribuída de modo

uniforme, ou um pouco mais densa em direção à cutícula, enquanto a pigmentação dos pêlos animais é distribuída centralmente e mais densa em direção à medula (Deedrick, 2004).

Quando presente no cabelo humano, a medula é amorfa na aparência e a sua largura é geralmente inferior a um terço do diâmetro total da haste capilar. A medula do pêlo animal é normalmente contínua, estruturada e ocupa geralmente uma área de mais de um terço do diâmetro total da haste capilar (figura 15B).

As células da cutícula dos humanos são imbricadas e as dos pêlos animais apresentam vários padrões. A forma da haste capilar também é mais variável nos pêlos dos animais (Deedrick, 2004).

No que diz respeito ao pêlo dos cães, o diâmetro é bastante variável, podendo ser muito fino ou bastante grosso. A medula é contínua, apresentando segmentos aplinados; as células da cutícula não costumam ser salientes, apresentando-se longitudinalmente; o pigmento é grosseiro e estende-se até à raiz que, geralmente, tem a forma de pá (Deedrick, 2004).



Figuras 15A e 15 B – Raiz e haste do pêlo de canídeo
(Deedrick, 2004)

CARACTERÍSTICA	CABELO HUMANO	CABELO NÃO HUMANO
COR	Relativamente consistente ao longo da haste	Mostra frequentemente anéis ou bandas e alterações de cor
CORTEX	Ocupa quase toda a largura da haste - maior que a medula	Geralmente inferior à largura da medula
DISTRIBUIÇÃO DO PIGMENTO	Ligeiramente mais para a cutícula	Central ou denso em direcção à medula
MEDULA	Menos de um terço da largura da haste, amorfa, geralmente não contínua quando presente	Maior do que um terço da largura da haste. Contínua, geralmente variando na aparência ao longo da haste, estrutura definida
CUTÍCULA	Imbricado (disposto como as telhas de um telhado), semelhante ao longo do eixo da raiz até á ponta	Mostra frequentemente variações na estrutura ao longo da haste, da raiz à ponta

Tabela 8 – Comparação das características dos cabelos humanos e não humanos
Traduzido e adaptado de Robertson (1999)

No presente estudo a caracterização morfológica do pêlo (análise macro e microscópica) foi efectuada apenas no sentido de confirmar a origem canina deste, para posteriormente ser efectuada a análise genética. Os resultados dos parâmetros observados encontram-se descritos nas tabelas 9 e 10 e todas as características apontam para uma origem canina como, aliás seria de esperar. Na figura 16 são apresentadas fotografias da análise microscópica do pêlo em microscopia óptica.

Caracterização macroscópica de Pêlos

Animal	Cor do Pêlo	Forma do Pêlo	Comprimento (cm)
C1.	Branco	Liso	0,7
C2.	Branco	Liso	2,2
C3.	Preto	Liso	3,7
C4.	Castanho-escuro	Liso	1,3
C5.	Zona folicular branca; pelo alaranjado	Liso	2
C6.	Zona folicular branca; pelo alaranjado	Liso	3,2
C7.	Zona folicular branca; pelo alaranjado	Liso	4,2
C8.	Preto	Liso	3,4
C9.	Preto	Liso	4,5
C10.	Preto	Liso	2,2
C11.	Amarelo	Liso	3,4
C12.	Preto, branco, preto e laranja	Liso	6,1
C13.	Preto e Branco na ponta	Ondulado e fino	8,2
C14.	Preto	Ondulado e fino	5,6
C15.	Amarelo e laranja	Liso	4,1
C16.	Castanho-escuro	Liso	2,6
C17.	Branco, amarelo e Laranja	Liso	2,9
C18.	Branco e castanho	Liso e fino	3,9
C19.	Preto	Liso	2,8
C20.	Branco, preto e laranja	Liso	2,3
C21.	Branco, amarelo e laranja	Ondulado e liso	5,8
C22.	Branco, amarelo e laranja	Liso	4
C23.	Preto	Ondulado e fino	6,2
C24.	Branco e amarelo	Liso	5
C25.	Amarelo	Liso	0,7
C26.	Preto	Ondulado	3,4
C27.	Preto	Liso	5,9
C28.	Branco, amarelo e laranja	Ondulado	5,6
C29.	Preto	Liso	1,7
C30.	Preto	Liso	4
C31.	Branco, castanho-escuro e preto	Liso	1,1
C32.	Preto	Liso	2,7
C33.	Preto, castanho claro e castanho-escuro	Liso	3,9
C34.	Preto	Ondulado	4,7
C35.	Branco	Ondulado e fino	6,1
C36.	Branco e preto	Liso	2,2
C37.	Preto	Liso	2,8
C38.	Castanho claro	Ondulado e fino	8,5
C39.	Preto	Liso	3,3
C40.	Castanho claro e escuro	Ondulado	2,6
C41.	Branco, bege e preto	Liso	4,4
C42.	Branco e preto	Liso	6,2
C43.	Preto	Liso	4,5

C44.	Branco e laranja	Liso	2,8
C45.	Branco e laranja	Liso	2,2
C46.	Branco e amarelo	Ondulado	7,2
C47.	Preto	Liso	7,2
C48.	Preto	Liso	1,5
C49.	Branco	Liso e fino	6,2
C50.	Preto com extremidade branca	Liso	2,3
C51.	Branco	Liso	3
C52.	Branco e laranja	Liso	1,8
C53.	Branco	Ondulado	2,8
C54.	Preto	Liso	2,7
C55.	Branco	Liso	2,4
C56.	Amarelo	Liso	4,7
C57.	Preto	Ondulado	2,7
C58.	Branco	Liso	4
C59.	Branco e amarelo (dois pelos)	Ondulado	2,1
C60.	Castanho-escuro	Liso	2,8
C61.	Preto	Liso	2,9

Tabela 9 – Caracterização macroscópica de pêlos de canídeos

Caracterização microscópica de Pêlos

Animal	Presença de Bolbo	Extremidade Distal	Características da Medula	Índice de Secção	Índice Medular	Cutícula
C1.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,43	0,43	Células tipo longitudinais
C2.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,5	0,67	Células tipo longitudinais
C3.	sim	Espigada	Contínua	0,6	*	Não se observa
C4.	sim	Afilada	Contínua	0,56	0,56	Células tipo longitudinais
C5.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,6	0,8	Células tipo longitudinais
C6.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,72	0,67	Células tipo longitudinais
C7.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,77	0,56	Células tipo longitudinais
C8.	sim	Afilada	Não é possível observar	0,6	*	Não se observa
C9.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,67	0,67	Células tipo longitudinais
C10.	sim	Afilada	Contínua	0,6	*	Não se observa
C11.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,8	0,6	Células tipo longitudinais
C12.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,07	0,56	Células tipo longitudinais
C13.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,8	*	Células tipo longitudinais
C14.	sim	Cortada transversalmente	Contínua	0,5	*	Não se observa
C15.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,75	0,67	Células tipo longitudinais
C16.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,8	0,6	Células tipo longitudinais
C17.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,46	0,69	Células tipo longitudinais
C18.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,57	0,43	Células tipo longitudinais
C19.	sim	Espigada	Contínua	0,63	*	Células tipo longitudinais
C20.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,43	0,5	Células tipo longitudinais
C21.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,71	0,71	Células tipo longitudinais
C22.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,5	0,58	Células tipo longitudinais
C23.	sim	Afilada	Contínua	0,6	*	Células tipo longitudinais
C24.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,65	0,59	Células tipo longitudinais
C25.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,71	0,57	Células tipo longitudinais
C26.	sim	Afilada	Não é possível observar	0,71	*	Não se observa

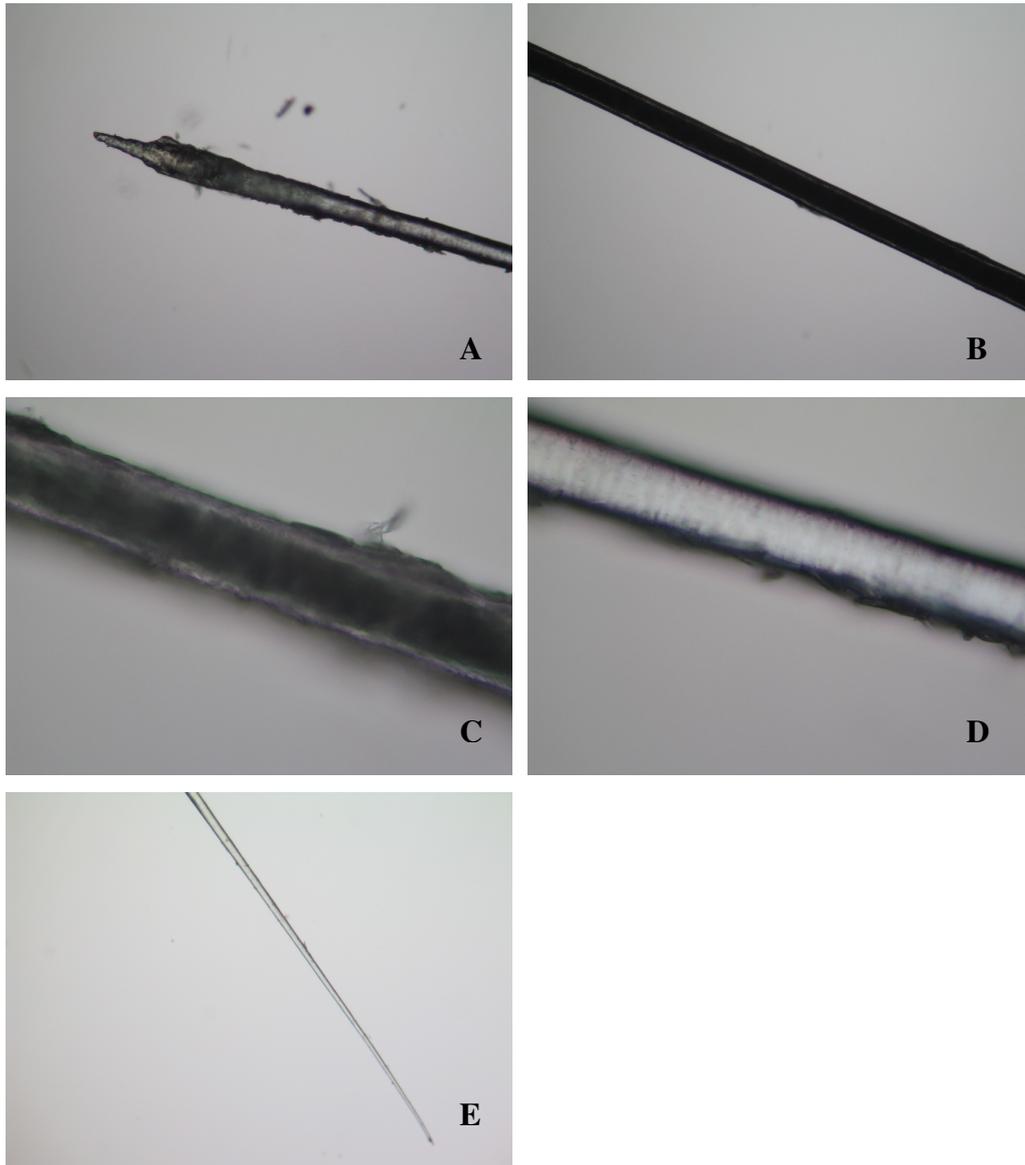
c27.	sim	Cortada transversalmente	Não é possível observar	0,64	*	Não se observa
c28.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,78	0,72	Células tipo longitudinais
c29.	sim	Afilada	Não é possível observar	0,54	*	Não se observa
c30.	sim	Espigada	Contínua	0,7	*	Não se observa
c31.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,63	0,63	Células tipo longitudinais
c32.	sim	Espigada	Não é possível observar	0,48	*	Não se observa
c33.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,8	0,7	Células tipo longitudinais
c34.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,8	0,8	Células tipo longitudinais
c35.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,33	0,33	Células tipo longitudinais
c36.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,73	0,64	Células tipo longitudinais
c37.	sim	Afilada	Contínua	0,71	*	Não se observa
c38.	sim	Cortada transversalmente	Não é possível observar	0,76	*	Células tipo longitudinais
c39.	sim	Afilada	Não é possível observar	0,73	*	Não se observa
c40.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,62	0,62	Células tipo longitudinais
c41.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,71	0,58	Células tipo longitudinais
c42.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,67	0,67	Células tipo longitudinais
c43.	sim	Cortada transversalmente	Contínua	0,72	*	Células tipo longitudinais
c44.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,62	0,69	Células tipo longitudinais
c45.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,67	0,58	Células tipo longitudinais
c46.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,88	0,5	Células tipo longitudinais
c47.	sim	Afilada	Contínua	0,6	*	Células tipo longitudinais
c48.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,6	0,6	Células tipo longitudinais
c49.	sim	Cortada transversalmente	Não se observa	0,5	*	Células tipo longitudinais
c50.	sim	Cortada transversalmente	Contínua	0,62	*	Células tipo longitudinais
c51.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,64	0,73	Células tipo longitudinais
c52.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,71	0,75	Células tipo longitudinais
c53.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,67	0,67	Células tipo longitudinais
c54.	sim	Afilada	Contínua	0,71	*	Não se observa
c55.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,71	0,75	Células tipo longitudinais
c56.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,77	0,69	Células tipo longitudinais

c57.	sim	Afilada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,63	*	Células tipo longitudinais
c58.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,65	0,7	Células tipo longitudinais
c59.	sim	Espigada	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,69	0,75	Células tipo longitudinais
c60.	sim	Cortada transversalmente	Contínua, reticular com segmentos aplainados	0,8	0,6	Células tipo longitudinais
c61.	sim	Afilada	Contínua	0,8	*	Não se observa

* - Não foi possível calcular o índice medular pelo facto de não se conseguir medir a zona medular.

Tabela 10 – Caracterização microscópica de pêlos de canídeos

Caracterização microscópica de Pêlos (Fotos)



Figuras 16 – Pêlo de Canídeo (Imagens Obtidas em microscopia óptica)

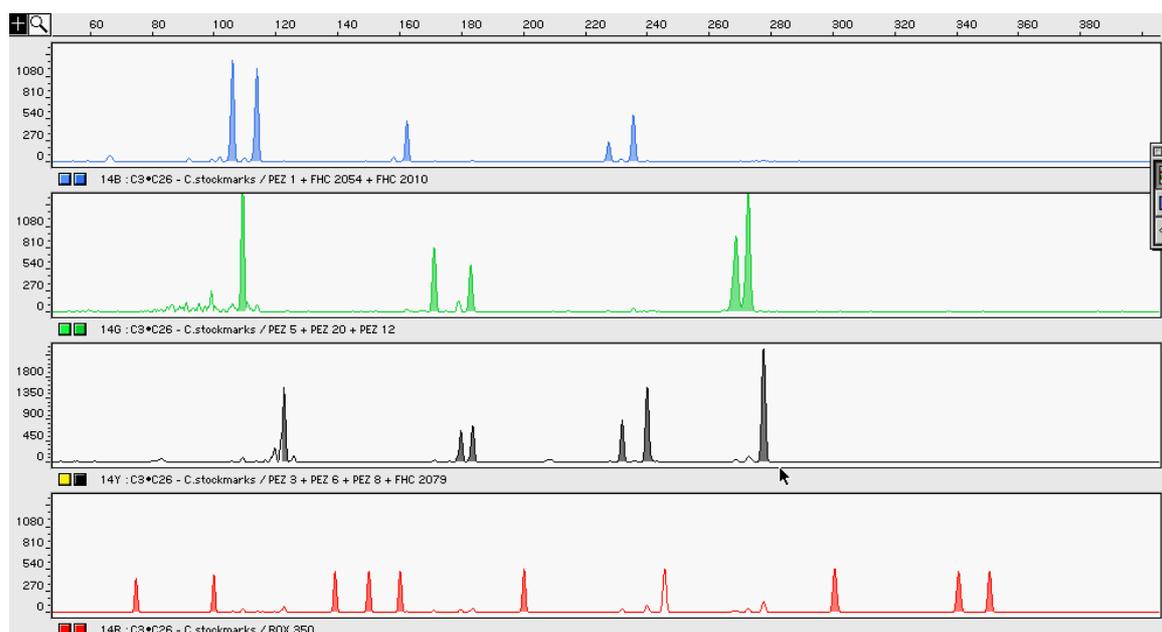
Legenda:

- A – Raiz (ampliação total 100x)**
- B – Haste (ampliação total 100x)**
- C – Haste (ampliação total 400x)**
- D – Cutícula (ampliação total 400x)**
- E – Extremidade (ampliação total 100x)**

3.3 Amplificação e análise de fragmentos

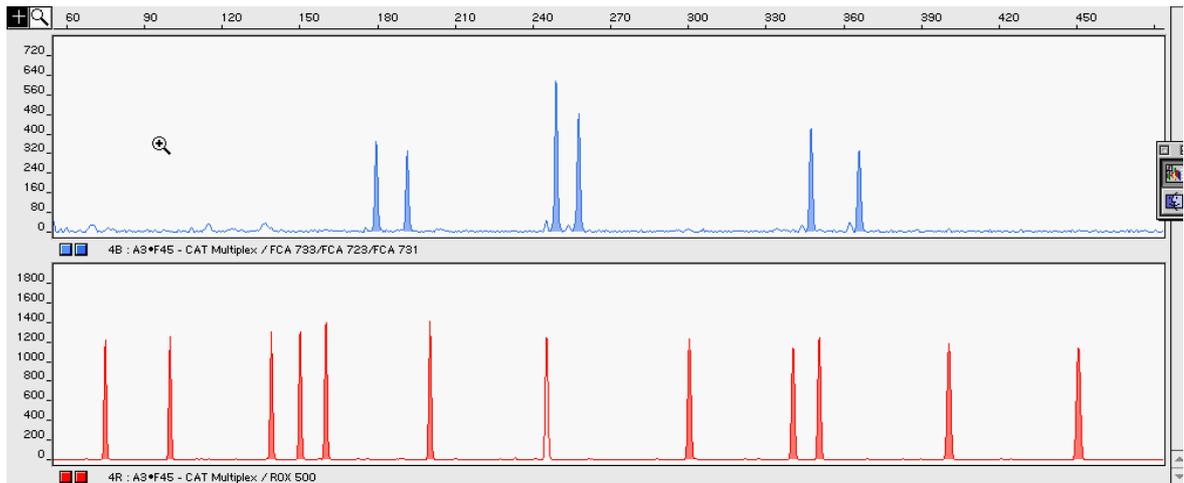
Neste estudo foram recolhidas e extraídas 61 amostras (sangue e pêlo) no caso da espécie *Canis familiaris* e 64 amostras sanguíneas no que diz respeito à espécie *Felis catus*, tendo sido possível obter o perfil genético de todos os animais em estudo, pelo que não se salientam adversidades quer na amplificação quer na análise de fragmentos.

Na figura 17 e 18 apresentam-se os electroferogramas obtidos com a aplicação *GeneScan*® 3.1 da *Applied Biosystems*, para canídeos e para felídeos.



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
14B, 5	14.31	105.99	1295	12223	3902
14B, 7	14.59	113.84	1181	11663	3978
14B, 10	16.15	162.18	529	4094	4403
14B, 12	18.26	227.20	257	2333	4980
14B, 14	18.52	235.24	599	5581	5049
14G, 30	14.43	109.28	1803	13860	3934
14G, 37	16.43	170.94	816	8033	4480
14G, 40	16.82	182.71	592	5684	4585
14G, 50	19.53	268.26	973	12788	5326
14G, 51	19.65	272.15	1588	17576	5358
14Y, 17	14.89	122.61	1619	12411	4061
14Y, 22	16.71	179.59	693	6322	4557
14Y, 23	16.84	183.38	777	6996	4591
14Y, 29	18.40	231.62	901	7538	5018
14Y, 31	18.65	239.58	1585	14816	5086
14Y, 35	19.80	277.16	2413	23009	5399
14R, 1	13.23	75.00	433	3166	3607
14R, 2	14.09	100.00	484	3560	3843
14R, 9	15.44	139.00	518	3870	4211
14R, 10	15.78	150.00	525	3902	4302
14R, 11	16.08	160.00	531	3945	4384
14R, 15	17.39	200.00	548	4339	4742
14R, 22	20.47	300.00	552	5136	5583
14R, 23	21.60	340.00	530	5324	5890
14R, 24	21.94	350.00	525	5472	5982

Figura 17 – Electroferograma obtido para os STRs PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 e FHC2079 de canídeos.



Dye/Sample Peak	Minutes	Size	Peak Height	Peak Area	Data Point
4B, 1	17.21	179.35	379	3439	4693
4B, 2	17.63	191.26	334	3027	4806
4B, 3	19.58	248.72	618	5713	5339
4B, 4	19.86	257.35	489	4638	5416
4B, 5	22.65	346.82	427	4393	6175
4B, 6	23.27	365.47	337	3564	6346
4R, 1 •	13.57	75.00	1245	8351	3700
4R, 2 •	14.47	100.00	1266	8349	3946
4R, 3 •	15.89	139.00	1335	8990	4332
4R, 4 •	16.23	150.00	1330	8945	4426
4R, 5 •	16.55	160.00	1405	9602	4513
4R, 6 •	17.93	200.00	1416	10433	4890
4R, 8 •	21.22	300.00	1261	11002	5786
4R, 9 •	22.40	340.00	1148	10782	6109
4R, 10 •	22.76	350.00	1262	11986	6206
4R, 11 •	24.34	400.00	1188	12356	6637
4R, 12 •	25.78	450.00	1150	12653	7031

Figura 18 – Electroferograma obtido para os STRs FCA733, FCA723 e FCA731 de felídeos.

3.4 Polimorfismo dos marcadores

Através do Programa Cervus 3.0.3. (Marshall et al. 1998; Kalinowski et al. 2007), desenvolvido pela Field Genetics e disponível online (www.fieldgenetics.com), foram calculados as frequências alélicas, a Heterozigotia esperada (Hesp), a Heterozigotia observada (Hobs) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), parâmetros informativos da variabilidade genética dos marcadores analisados.

Neste estudo e através do Programa Cervus 3.0.3. não foi possível calcular o equilíbrio de Hardy – Weinberg devido ao facto de a população ser insuficiente para se proceder ao teste, o que não implica propriamente um desequilíbrio. Contudo, há também que considerar que os pressupostos para que este possa ser calculado nem sempre se verificam nestas espécies, nomeadamente porque, na maioria das vezes, os cruzamentos não se dão ao acaso para apuramento de raças.

3.4.1 Canídeos

Dos 10 loci analisados (tabela 11) o número de alelos por locus variou entre um mínimo de 8 (FHC2054) e um máximo de 23 (PEZ3) apresentando um elevado grau de heterozigotia observada, com valores entre a 0,557 (PEZ5) e 0,787 (PEZ8) o que evidencia um grau mediano a elevado de polimorfismo. Segundo Ott (1992), um marcador é considerado altamente polimórfico quando apresenta heterozigotia maior que 0,700.

A heterozigotia esperada teve um valor mínimo de 0,707 no locus PEZ20 e um valor máximo de 0,923 nos loci PEZ6 e PEZ8 indicando elevada variabilidade genética dos marcadores analisados.

A qualidade dos marcadores foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica, sendo verificados valores superiores a 0,698 nos *loci* analisados. Segundo Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores 0,500 são considerados muito informativos.

As tabelas (de 12 a 21) para os Locus PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 e FHC2079 respectivamente, evidenciam o número de Heterozigotos e de Homozigotos encontrados na população estudada, bem como as frequências de cada alelo.

Os gráficos 1 a 10 demonstram a distribuição das frequências alélicas na amostra para os vários Loci estudados.

STR	Size Range	Nº de alelos	Conteúdo de informação polimórfica	Homozigotos	Heterozigotos	Hesp	Hobs	N
PEZ1	105-131	15	0.815	14	47	0.840	0.770	61
PEZ3	101-142	23	0.905	26	35	0.919	0.574	61
PEZ5	97-114	9	0.740	27	34	0.772	0.557	61
PEZ6	164-200	22	0.910	18	43	0.923	0.705	61
PEZ8	216-248	18	0.909	13	48	0.923	0.787	61
PEZ12	257-302	23	0.889	19	42	0.905	0.689	61
PEZ20	171-227	11	0.675	25	36	0.707	0.590	61
FHC2010	223-239	8	0.698	25	36	0.745	0.590	61
FHC2054	140-175	15	0.870	16	45	0.888	0.738	61
FHC2079	268-293	12	0.782	26	35	0.810	0.574	61

Tabela 11 – Parâmetros de diversidade genética determinados em 10 STRs de canídeos

Legenda: PIC - Conteúdo de informação polimórfica; Hobs – Heterozigotia Observada; Hesp – Heterozigotia Esperada

Locus PEZ1

O Locus PEZ1 apresenta 15 alelos com uma distribuição mais ou menos centralizada (gráfico 1), os alelos mais frequentes são o alelo 114 (aparecendo em 25 heterozigotos e 3 homozigotos) e 118 (com 21 heterozigotos e 6 homozigotos).

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
105	1	1	0	0.0082
106	7	7	0	0.0574
109	2	2	0	0.0164
110	12	10	1	0.0984
113	9	7	1	0.0738
114	31	25	3	0.2541
117	3	3	0	0.0246
118	33	21	6	0.2705
119	2	0	1	0.0164
121	4	2	1	0.0328
122	10	10	0	0.0820
125	1	1	0	0.0082
126	3	3	0	0.0246
130	3	1	1	0.0246
131	1	1	0	0.0082

Tabela 12 – Locus PEZ1

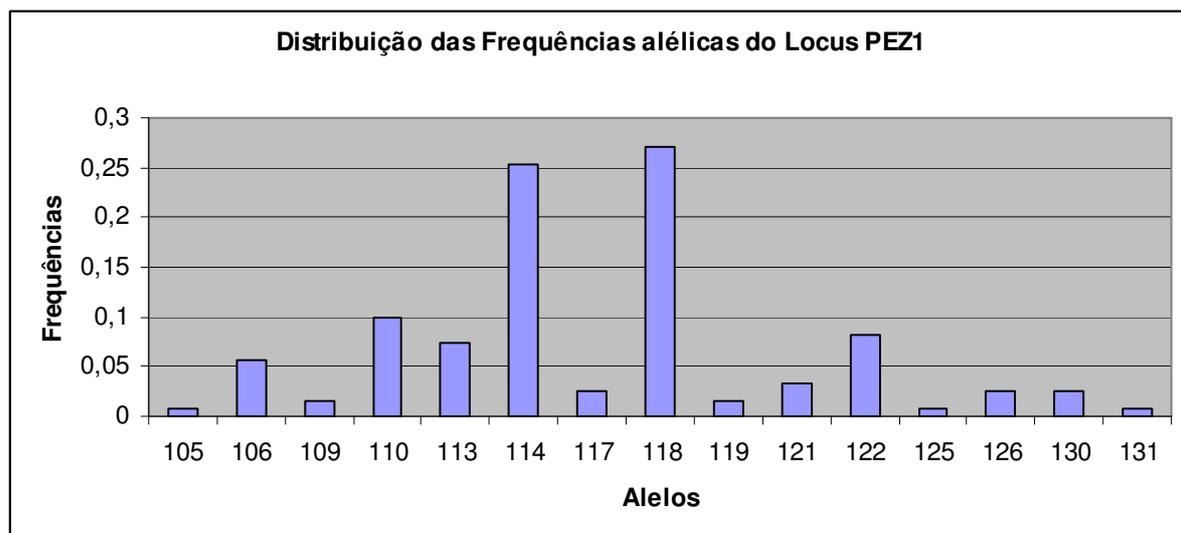


Gráfico 1 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ1

Locus FHC2054

Para o Locus FHC2054 foram encontrados 23 alelos, sendo o mais frequente o 149 (com 24 heterozigotos e apenas 2 homozigotos) apresentando uma distribuição alélica irregular (gráfico 2).

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
140	3	3	0	0.0246
144	5	3	1	0.0410
145	3	3	0	0.0246
149	28	24	2	0.2295
153	10	6	2	0.0820
154	16	8	4	0.1311
158	7	7	0	0.0574
162	14	10	2	0.1148
163	3	1	1	0.0246
166	14	10	2	0.1148
167	2	0	1	0.0164
170	11	9	1	0.0902
171	3	3	0	0.0246
174	2	2	0	0.0164
175	1	1	0	0.0082

Tabela 13 – Locus FHC2054

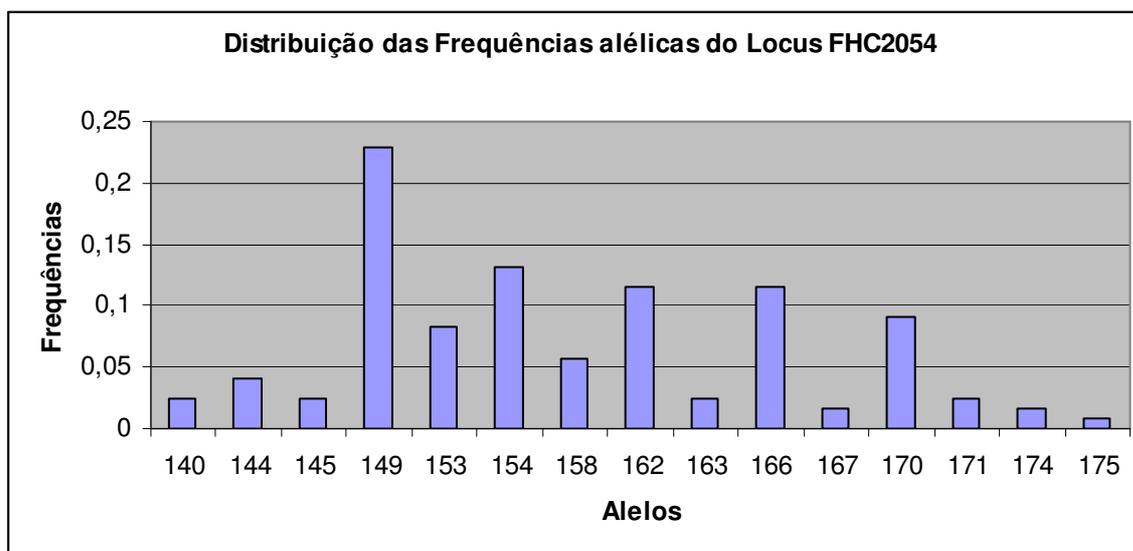


Gráfico 2 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FHC2054

Locus FHC2010

Para o Locus FHC2010 os alelos mais frequentes são os alelos 227 (com 25 heterozigotos e 11 homozigotos), 231 (com 17 heterozigotos e 5 homozigotos) e 235 (com 21 heterozigotos e 4 homozigoto), tendo sido encontrados 8 alelos no total que se encontram distribuídos irregularmente na amostra (gráfico 3).

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
223	9	5	2	0.0738
227	47	25	11	0.3852
228	3	1	1	0.0246
231	27	17	5	0.2213
232	3	1	1	0.0246
235	29	21	4	0.2377
236	2	0	1	0.0164
239	2	2	0	0.0164

Tabela 14 – LocusFHC2010

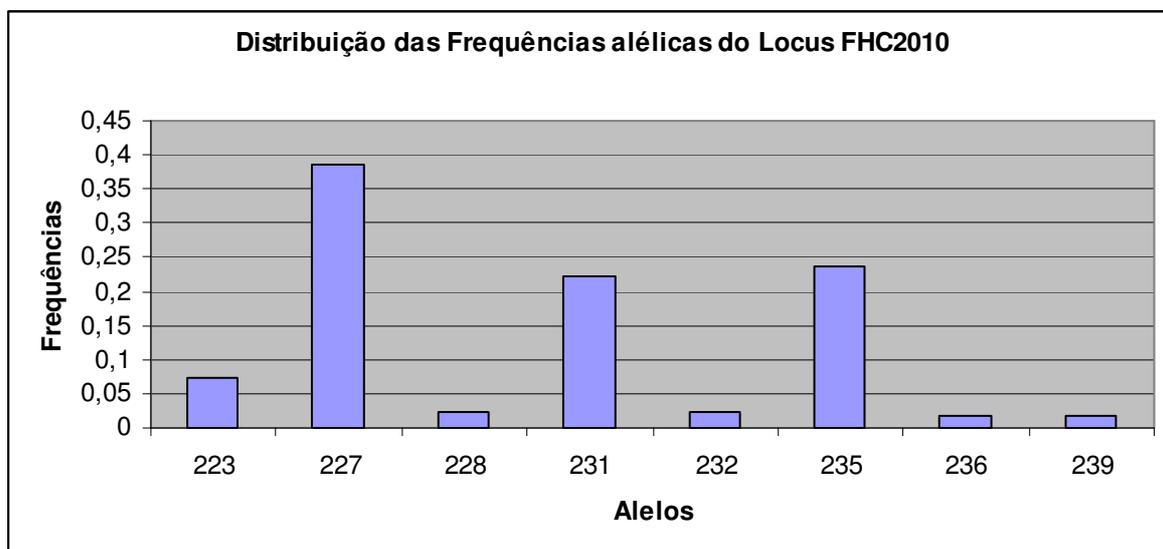


Gráfico 3 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FHC2010

Locus PEZ5

Para o Locus PEZ5 encontraram-se 9 alelos com uma distribuição irregular (gráfico 4). O alelo mais frequente é o 101 (com 22 heterozigotos e 14 homozigotos).

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
97	1	1	0	0.0082
101	50	22	14	0.4098
102	15	3	6	0.1230
105	16	14	1	0.1311
106	2	0	1	0.0164
109	19	17	1	0.1557
110	7	3	2	0.0574
113	9	7	1	0.0738
114	3	1	1	0.0246

Tabela 15 – Locus PEZ5

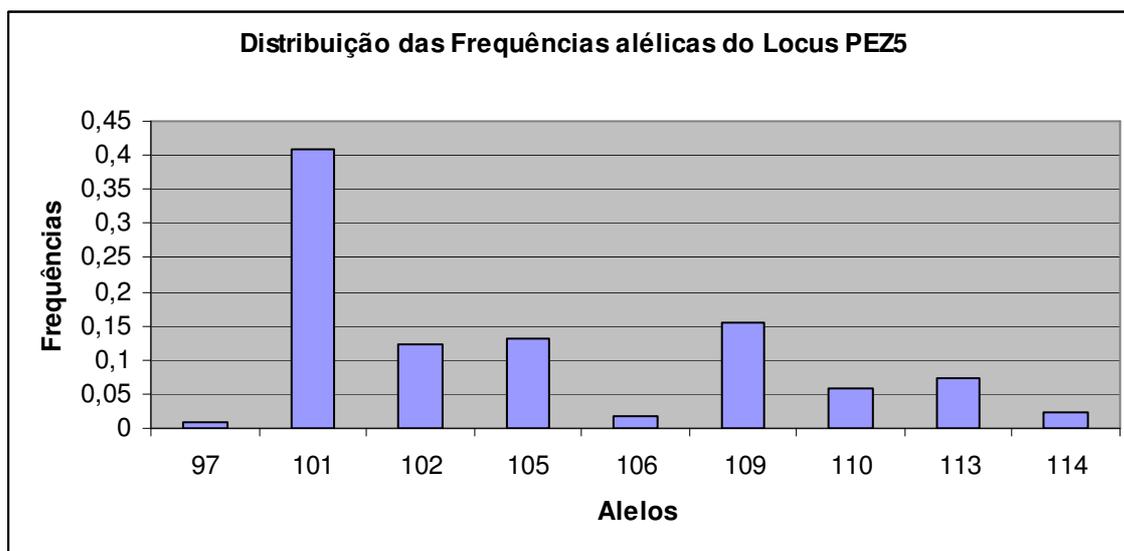


Gráfico 4 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ5

Locus PEZ20

O Locus PEZ20 apresenta 11 alelos, o alelo mais frequente é o alelo 175 (com 29 heterozigotos e 16 homozigotos), apresentando uma distribuição tendencialmente unimodal (moda no alelo 175) (gráfico 5).

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
171	13	11	1	0.1066
172	1	1	0	0.0082
175	61	29	16	0.5000
176	9	1	4	0.0738
179	16	12	2	0.1311
180	4	2	1	0.0328
183	14	12	1	0.1148
186	1	1	0	0.0082
187	1	1	0	0.0082
191	1	1	0	0.0082
227	1	1	0	0.0082

Tabela 16 – Locus PEZ20

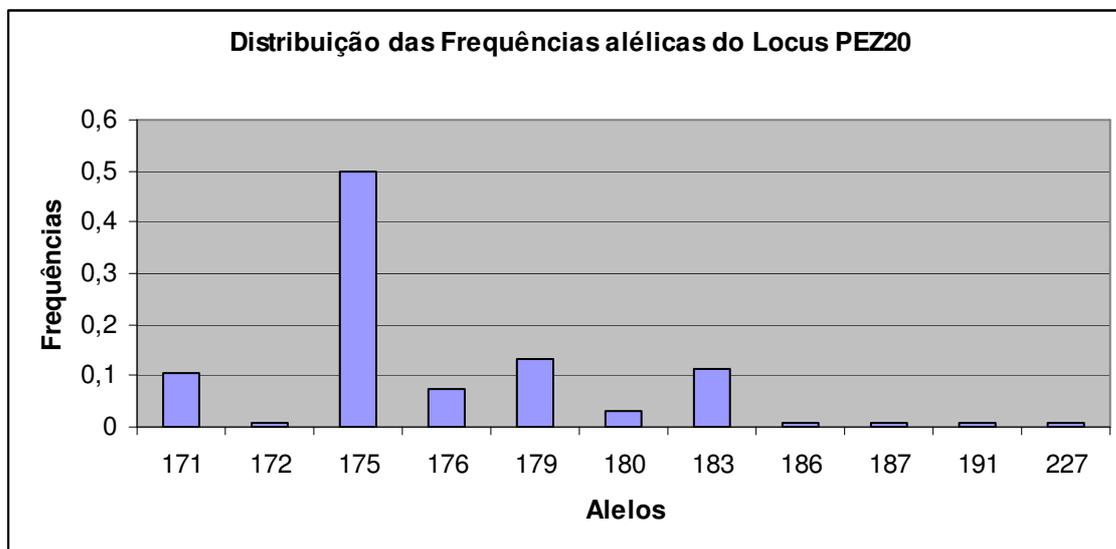


Gráfico 5 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ20

Locus PEZ12

Para o Locus PEZ12 os alelos mais frequentes são os alelos 268 (com 13 heterozigotos e 4 homozigotos), 269 (com 6 heterozigotos e 6 homozigotos) e 272 (com 18 heterozigotos e apenas 1 homozigoto). Este locus apresenta uma distribuição alélica irregular (gráfico 6), dada a presença de vários alelos com unidades de repetição parciais (alelos intermédios), apresentando um total de 23 alelos.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
257	1	1	0	0.0082
260	4	4	0	0.0328
261	3	3	0	0.0246
264	10	8	1	0.0820
265	2	0	1	0.0164
267	1	1	0	0.0082
268	21	13	4	0.1721
269	18	6	6	0.1475
272	20	18	1	0.1639
273	10	2	4	0.0820
276	8	8	0	0.0656
277	3	3	0	0.0246
280	1	1	0	0.0082
281	1	1	0	0.0082
284	4	2	1	0.0328
285	1	1	0	0.0082
287	1	1	0	0.0082
288	1	1	0	0.0082
291	2	2	0	0.0164
292	1	1	0	0.0082
295	3	1	1	0.0246
298	3	3	0	0.0246
302	3	3	0	0.0246

Tabela 17 – Locus PEZ12

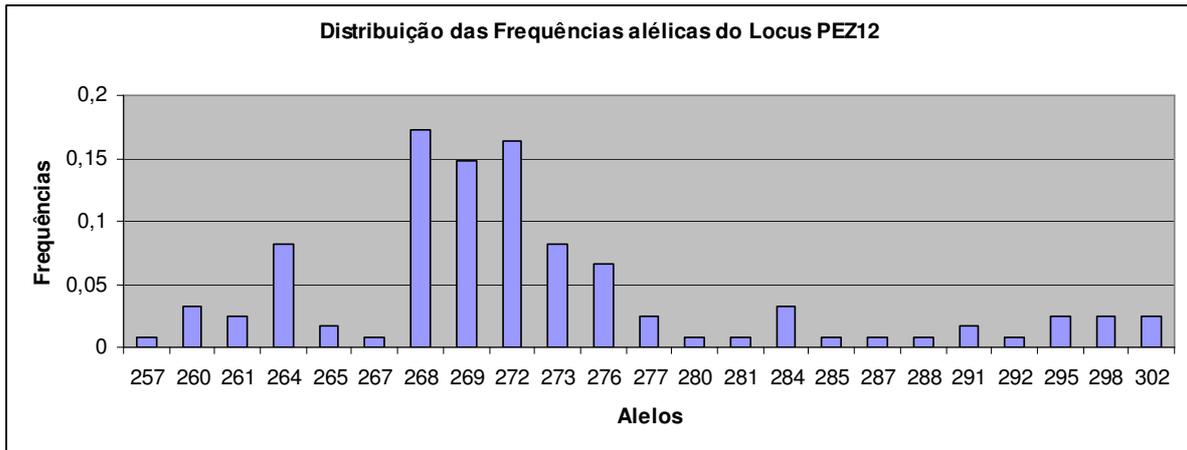


Gráfico 6 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ12

Locus PEZ3

O Locus PEZ3 apresenta 23 alelos, os mais frequentes são os alelos 118 (com 5 heterozigotos e 6 homozigotos) e 123 (com 7 heterozigotos e apenas 7 homozigotos).

Este locus apresenta uma distribuição alélica irregular (gráfico 7), dada a presença de vários alelos com unidades de repetição parciais.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
101	1	1	0	0.0082
107	1	1	0	0.0082
113	1	1	0	0.0082
114	3	1	1	0.0246
117	1	1	0	0.0082
118	17	5	6	0.1393
119	12	8	2	0.0984
120	9	7	1	0.0738
121	1	1	0	0.0082
122	6	4	1	0.0492
123	21	7	7	0.1721
125	6	2	2	0.0492
126	6	4	1	0.0492
127	2	2	0	0.0164
128	2	0	1	0.0164
129	11	7	2	0.0902
131	2	2	0	0.0164
132	4	4	0	0.0328
133	2	2	0	0.0164
134	2	0	1	0.0164
135	9	7	1	0.0738
138	2	2	0	0.0164
142	1	1	0	0.0082

Tabela 18 – Locus PEZ3

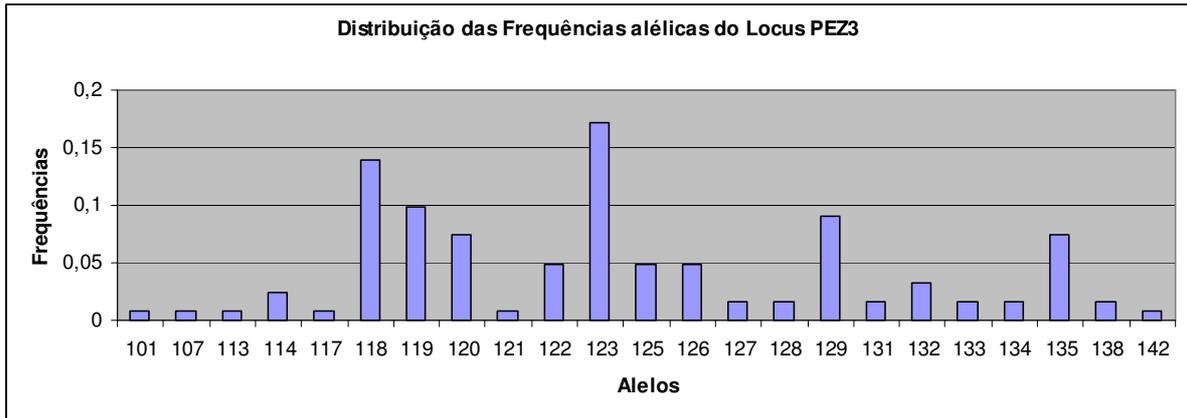


Gráfico 7 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ3

Locus PEZ6

O Locus PEZ6 possui 22 alelos sendo o mais frequente o alelo 180 (com 15 heterozigotos e apenas 3 homozigoto). Este locus apresenta uma distribuição alélica irregular (gráfico 8), com presença de vários alelos com unidades de repetição parciais.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
164	1	1	0	0.0082
168	1	1	0	0.0082
171	1	1	0	0.0082
172	11	11	0	0.0902
175	1	1	0	0.0082
176	12	10	1	0.0984
179	4	2	1	0.0328
180	21	15	3	0.1721
181	4	2	1	0.0328
183	11	9	1	0.0902
184	9	3	3	0.0738
185	12	6	3	0.0984
186	1	1	0	0.0082
187	5	3	1	0.0410
188	3	3	0	0.0246
189	6	2	2	0.0492
191	4	4	0	0.0328
192	7	5	1	0.0574
195	1	1	0	0.0082
196	5	3	1	0.0410
198	1	1	0	0.0082
200	1	1	0	0.0082

Tabela 19 – Locus PEZ6

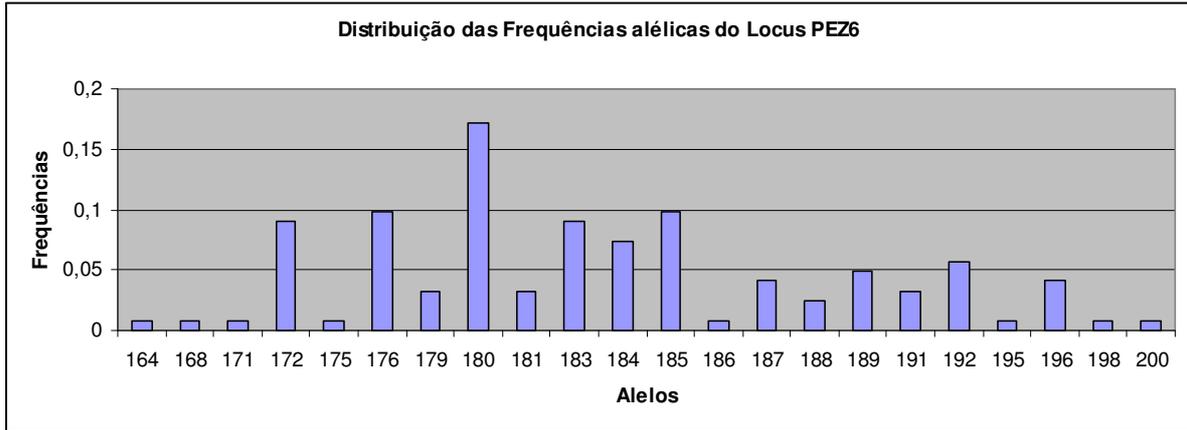


Gráfico 8 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ6

Locus PEZ8

Para o Locus PEZ8 o alelo mais frequente é o alelo 240 (com 17 heterozigotos e apenas 1 homozigoto). Este locus apresenta 18 alelos com uma distribuição alélica mais ou menos regular (gráfico 9) e presença de vários alelos com unidades de repetição parciais.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
216	2	2	0	0.0164
219	3	3	0	0.0246
220	1	1	0	0.0082
223	9	9	0	0.0738
224	7	3	2	0.0574
225	11	7	2	0.0902
227	5	5	0	0.0410
228	7	5	1	0.0574
229	6	4	1	0.0492
231	8	6	1	0.0656
232	14	12	1	0.1148
233	6	2	2	0.0492
235	5	5	0	0.0410
236	14	10	2	0.1148
237	1	1	0	0.0082
239	2	2	0	0.0164
240	19	17	1	0.1557
248	2	2	0	0.0164

Tabela 20 – Locus PEZ8

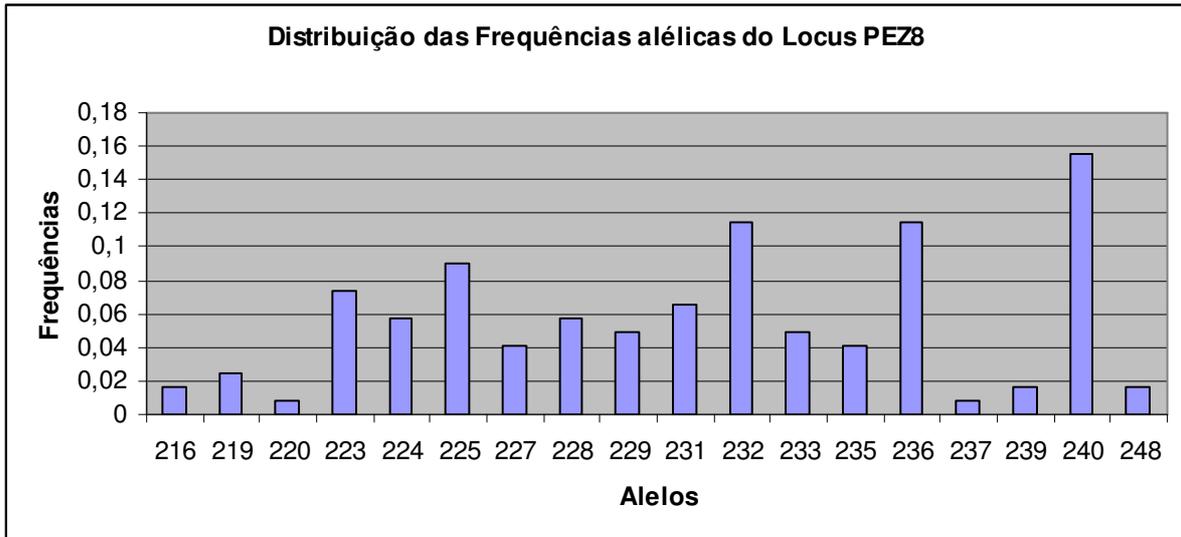


Gráfico 9 – Distribuição das frequências alélicas do Locus PEZ8

Locus FHC2079

Para o Locus FHC2079 o alelo mais frequente é o alelo 273 (com 18 heterozigotos e 13 homozigotos). Este locus apresenta uma distribuição alélica irregular (gráfico 10), com 12 alelos incluindo alelos com unidades de repetição parciais.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
268	16	12	2	0.1311
269	17	9	4	0.1393
272	6	4	1	0.0492
273	44	18	13	0.3607
275	1	1	0	0.0082
276	3	3	0	0.0246
277	17	9	4	0.1393
279	1	1	0	0.0082
281	1	1	0	0.0082
285	8	4	2	0.0656
289	7	7	0	0.0574
293	1	1	0	0.0082

Tabela 21 – Locus FHC2079

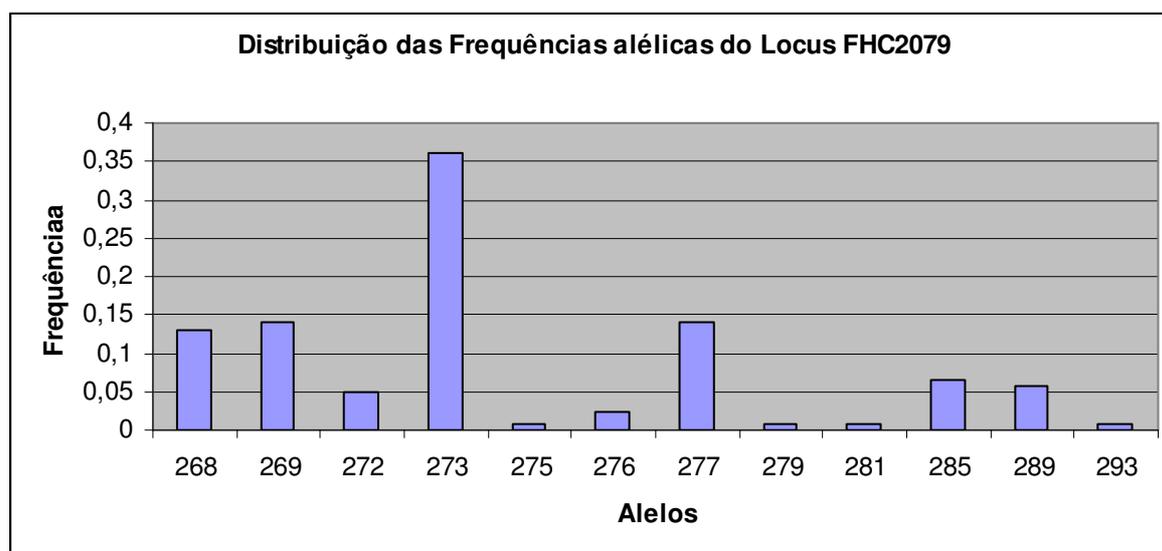


Gráfico 10 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FHC2079

Em análise global, verifica-se que os *Loci* PEZ8, PEZ6 e PEZ3 são os que apresentam maior variabilidade genética, apresentando um número considerável de alelos e valores de conteúdo de informação polimórfica e de heterozigotia observada superiores aos restantes *loci* em estudo.

3.4.2 Felídeos

Dos 3 *loci* analisados (tabela 22), o número de alelos por *locus* variou entre um mínimo de 17 (FCA731) e um máximo de 30 (FCA733), apresentando um elevado grau de heterozigotia observada, com valores entre 0,813 (FCA731) e 0,922 (FCA733), o que evidencia um grau elevado de polimorfismo.

A heterozigotia esperada teve um valor mínimo de 0,834 no *locus* FCA731 e um valor máximo de 0,937 no *locus* FCA733, indicando elevada variabilidade genética dos marcadores analisados.

No conteúdo de informação polimórfica, verificaram-se valores superiores a 0,810 nos *loci* analisados, podendo considerar-se muito informativos acima dos 0,500.

As tabelas 23, 24 e 25, para os *Loci* FCA733, FCA723 e FCA731 respectivamente, evidenciam o número de heterozigotos e de homozigotos encontrados na população estudada, bem como as frequências de cada alelo.

Os gráficos 1 a 3 demonstram a distribuição das frequências alélicas na amostra para os *loci* estudados.

<i>STR</i>	<i>Size Range</i>	Nº de alelos	Conteúdo de informação polimórfica (PIC)	Homozigotos	Heterozigotos	Hobs	Hesp	N
FCA733	128 - 230	30	0.926	5	59	0.922	0.937	64
FCA723	241 - 298	29	0.913	10	54	0.844	0.925	64
FCA731	336 - 397	17	0.810	12	52	0.813	0.834	64

Tabela 22 – Parâmetros de diversidade genética determinados em 3 STRs de Felídeos

Legenda: PIC - Conteúdo de informação polimórfica; Hobs – Heterozigotia Observada; Hesp – Heterozigotia Esperada

Locus FCA733

Para o Locus FCA733 os alelos mais frequentes são os alelos 179 (com 19 heterozigotos e apenas 1 homozigoto), 191 (com 14 heterozigotos e nenhum homozigoto) e 209 (com 9 heterozigotos e apenas 1 homozigoto). Este locus apresenta 30 alelos com uma distribuição irregular (gráfico 11), dada a presença de vários alelos com unidades de repetição parciais (alelos intermédios).

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
128	1	1	0	0.0078
132	1	1	0	0.0078
136	3	1	1	0.0234
150	1	1	0	0.0078
167	1	1	0	0.0078
172	1	1	0	0.0078
175	2	2	0	0.0156
179	21	19	1	0.1641
180	3	3	0	0.0234
183	3	3	0	0.0234
187	2	2	0	0.0156
188	1	1	0	0.0078
190	1	1	0	0.0078
191	14	14	0	0.1094
192	5	5	0	0.0391
195	5	5	0	0.0391
196	7	3	2	0.0547
199	2	2	0	0.0156
201	6	6	0	0.0469
203	8	8	0	0.0625
209	11	9	1	0.0859
213	5	5	0	0.0391
215	4	4	0	0.0313
217	2	2	0	0.0156
220	2	2	0	0.0156
221	1	1	0	0.0078
223	9	9	0	0.0703
225	2	2	0	0.0156
227	3	3	0	0.0234
230	1	1	0	0.0078

Tabela 23 – Locus FCA733

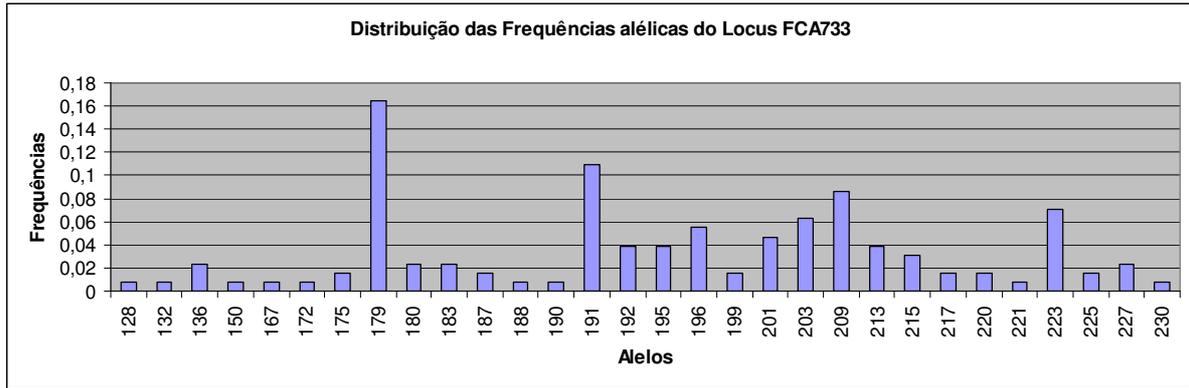


Gráfico 11 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FCA733

Locus FCA723

O Locus FCA723 apresenta 29 alelos com uma distribuição irregular (gráfico 12). Os alelos mais frequentes são os alelos 249 (com 16 heterozigotos e 4 homozigotos) e 281 (com 19 heterozigotos e nenhum homozigoto), existindo vários alelos com unidades de repetição parciais.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
241	1	1	0	0.0078
245	6	4	1	0.0469
249	24	16	4	0.1875
250	1	1	0	0.0078
253	10	8	1	0.0781
254	3	3	0	0.0234
256	1	1	0	0.0078
257	7	5	1	0.0547
258	2	2	0	0.0156
260	1	1	0	0.0078
261	1	1	0	0.0078
265	3	1	1	0.0234
266	5	5	0	0.0391
268	1	1	0	0.0078
270	3	3	0	0.0234
273	4	4	0	0.0313
276	1	1	0	0.0078
277	5	3	1	0.0391
278	2	2	0	0.0156
281	19	19	0	0.1484
282	3	1	1	0.0234
285	5	5	0	0.0391
286	3	3	0	0.0234
289	3	3	0	0.0234
290	1	1	0	0.0078
293	5	5	0	0.0391
294	1	1	0	0.0078
297	6	6	0	0.0469
298	1	1	0	0.0078

Tabela 24 – Locus FCA723

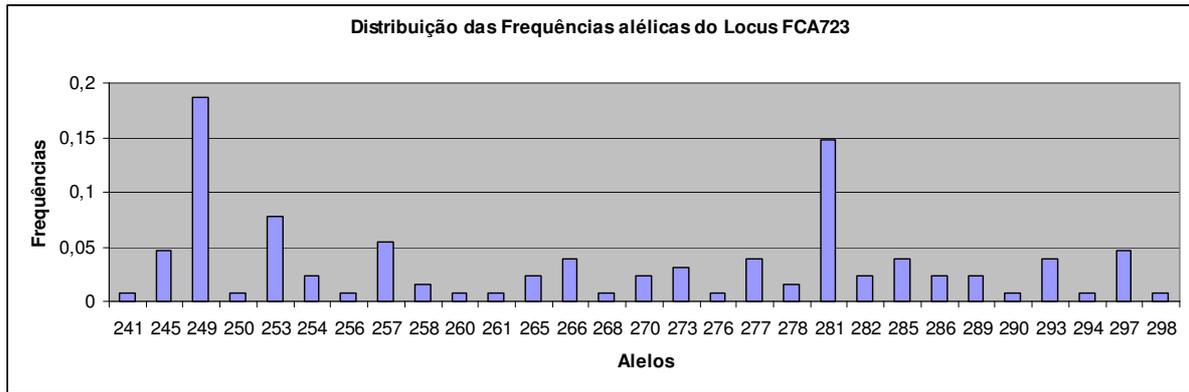


Gráfico 12 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FCA723

Locus FCA731

Para o Locus FCA731 encontraram-se 17 alelos, sendo os mais frequentes o 347 (com 25 heterozigotos e 4 homozigotos), 369 (com 23 heterozigotos e 7 homozigotos) e 377 (com 19 heterozigotos e nenhum homozigoto), apresentando uma distribuição igualmente irregular (gráfico 13). À semelhança dos *loci* anteriores, existem vários alelos com unidades de repetição parciais.

Nº de alelos	N	Heterozigotos	Homozigotos	Frequência alélica
336	1	1	0	0.0078
339	1	1	0	0.0078
340	2	2	0	0.0156
343	2	2	0	0.0156
347	33	25	4	0.2578
350	5	3	1	0.0391
351	1	1	0	0.0078
354	5	5	0	0.0391
365	8	8	0	0.0625
366	4	4	0	0.0313
369	37	23	7	0.2891
373	4	4	0	0.0313
377	12	12	0	0.0938
385	2	2	0	0.0156
392	3	3	0	0.0234
393	7	7	0	0.0547
397	1	1	0	0.0078

Tabela 25 – Locus FCA731

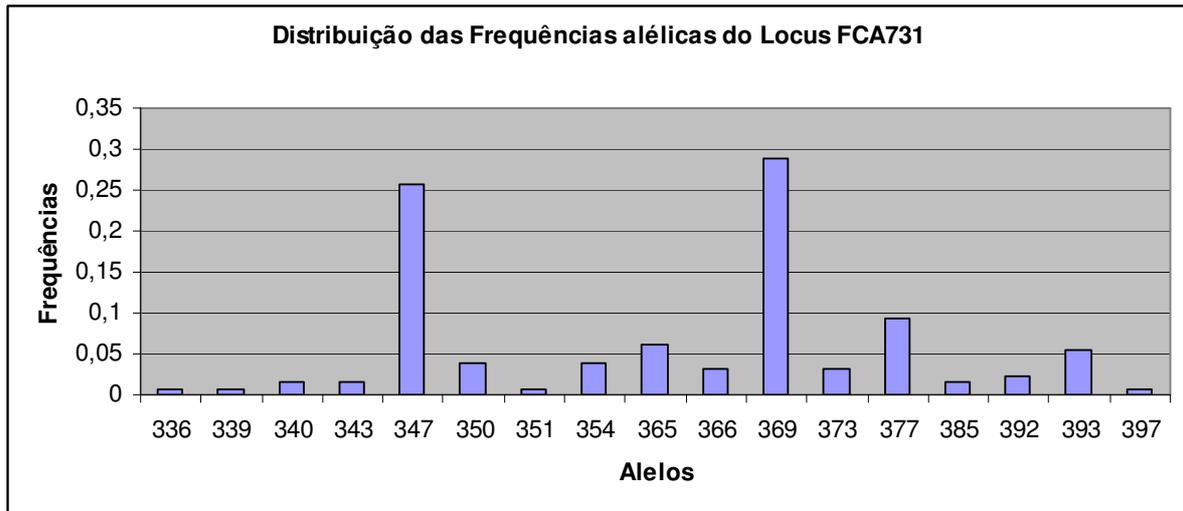


Gráfico 13 – Distribuição das frequências alélicas do Locus FCA731

Em análise global, verifica-se que o *Locus* FCA733 é o mais polimórfico, tendo um maior número de alelos e apresentando valores de conteúdo de informação polimórfica e de heterozigotia observada superiores aos outros dois *loci* em estudo.

4 Conclusões e Considerações Futuras

4 Conclusão e Considerações Futuras

4.1 Conclusão

Neste estudo foi possível realizar a extração de ADN de todas as amostras, contudo o Kit DNA IQ™ (Promega) mostrou-se mais sensível que o método Chelex®100, no caso de amostras com inibidores ou amostras com pouco material como o caso dos pêlos.

A caracterização morfológica do pêlo demonstrou ser útil no sentido de orientar a origem da amostra para uma espécie em concreto, não sendo útil para uma individualização.

O principal objectivo deste estudo consistiu na análise de vários *loci* microssatélite para animais (*Felis Catus e Canis Familiaris*), para aplicação à resolução de casos forenses, tendo sido possível obter o perfil de todos os animais amostrados.

Relativamente ao kit *StockMarks Canine Genotyping kit (Applied Biosystems)* utilizado para os canídeos pode-se concluir que este produz resultados robustos, fiáveis e reproduzíveis podendo ser usado para identificação genética em contexto forense.

No caso dos felídeos foi possível verificar que os três microssatélites analisados mostram um elevado grau de polimorfismo para caracterização da espécie. Contudo, para uma identificação genética individual em contexto forense afigura-se insuficiente o uso de apenas três marcadores, sendo de extrema importância a caracterização de mais *loci* STR's, igualmente polimórficos, de forma a desenvolver um conjunto mais vasto de marcadores que possam ser estandardizados, à semelhança do que acontece para Humanos.

Neste estudo foi ainda possível obter as frequências alélicas da população de felídeos amostrada relativamente aos STRs FCA733, FCA723 e FCA731 e na população de Canídeos amostrada, relativamente aos STRs PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8 e FHC2079.

Através dos valores de heterozigotia e de PIC obtidos, podemos afirmar que o conjunto dos quinze *loci*, do presente estudo (10 para canídeos e 3 para felídeos), têm grande utilidade na resolução de perícias médico-legais.

Em análise global, os resultados mostraram uma elevada diversidade genética dos marcadores utilizados, para ambas as espécies e para as populações estudadas. Todos os loci estudados evidenciam um elevado grau de polimorfismo revelando-se altamente informativos e como tal uma importante ferramenta para auxiliar na resolução de casos relacionados com o crime bem como problemas que envolvem amostras animais.

4.2 Considerações futuras

Este estudo pretende ser um contributo para a identificação genética de amostras de proveniência animal (*Felis catus* e *Canis familiaris*) permitindo aumentar o potencial forense deste tipo de amostras. No entanto, afigura-se importante desenvolver mais estudos em genética animal aplicada às ciências forenses, nomeadamente desenvolver projectos com outras espécies.

Seria igualmente importante desenvolver estudos em raças particulares, nomeadamente nos canídeos, uma vez que são definidas perigosas por lei (Decretos-Lei nº 312/2003; 313/2003; 314/2003 e 315/2003 do DR nº 290 Série I-A de 17/12/2003).

Seria também de particular interesse desenvolver uma base de dados genética para animais domésticos, à semelhança do que existe para humanos em vários países, facilitando a identificação do animal mesmo em questões civis e substituindo o chip electrónico. Esta base de dados poderia ser desenvolvida conjuntamente com o clube Português de Canicultura/Fenicultura possibilitando uma certificação individual destes animais e permitindo um cruzamento de informações no caso de questões criminais.

5 Referências Bibliográficas

5 Referências Bibliográficas

- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., Davis, R. (1980) Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, 32:314-331.
- Brauner, P., Reshef, A., Gorski, A. (2001) DNA profiling of trace evidence – mitigating evidence in a dog biting case, *Journal of Forensic Science*, 46(5): 1232-1234.
- Buckleton, J., Triggs, C., Walsh, S. (2005) *Forensic DNA Evidence Interpretation*, CRC press.
- Butler, J., David, V., O'Brien, S., Menotti-Raymond, M. (2002) The Meowplex: A New DNA Test using Tetranucleotide STR Markers for the Domestic Cat, profiles in DNA.
- Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, Second Edition. Elsevier Academic Press.
- Butler, J.M., Buel, E., Crivellente, F., McCord, B.R. (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis: using the ABI Prism 310 and 3100 Genetic Analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25: 1397-1412.
- Coomber, N., David, V.A., O'Brien, S.J, Menotti-Raymond, M. (2007) Validation of a short tandem repeat multiplex typing system for genetic individualization of domestic cat samples. *Croatian Medical Journal*, 48(4): 547-55.
- D'Andrea, F. et al. (1998) Preliminary experiments on the transfer of animal hair during simulated criminal behavior. *Journal of Forensic Science*. 43, 1257–1258.

- Dayton, M., Koskinen, M.T., Tom, B.K., Mattila, A.M., Johnston, E., Halverson, J., Fantin, D., Denise, S., Budowle, B., Glenn Smith, D., Kanthaswamy, S. (2009) Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material, *Croatian Medical Journal*, 50(3):268-85.
- Decreto-Lei n.º 312/2003, Diário da República, nº 290 Série I-A de 17/12/2003 - Estabelece o regime jurídico de detenção de animais perigosos e potencialmente perigosos como animais de companhia.
- Decreto-Lei n.º 313/2003, Diário da República, nº 290 Série I-A de 17/12/2003 - Aprova o Sistema de Identificação e Registo de Caninos e Felinos (SICAFE).
- Decreto-Lei n.º 314/2003 Diário da República, nº 290 Série I-A de 17/12/2003 - Aprova o Programa Nacional de Luta e Vigilância Epidemiológica da Raiva Animal e Outras zoonoses (PNLVERAZ) e estabelece as regras relativas à posse e detenção, comércio, exposições e entrada em território nacional de animais susceptíveis à raiva.
- Decreto-Lei n.º 315/2003, Diário da República, nº 290 Série I-A de 17/12/2003 - Altera o Decreto-Lei n.º 276/2001, de 17 de Outubro, que estabelece as normas legais tendentes a pôr em aplicação em Portugal a Convenção Europeia para a Protecção dos Animais de companhia.
- Deedrick, D., (2000) Hair fibers crime and evidence, Federal Bureau of Investigation, U.S. Department of Justice, Forensic Science Communications, 2 (3).
- Deedrick, D., Koch, S. (2004) Microscopy of hair part II: a practical guide and manual for animal hairs, Forensic science communications, 6 (3).
- DeNise, S., Johnston, E., Halverson, J., Marshall, K., Rosenfeld, D., McKenna, S., Sharp, T., Edwards, J. (2003) Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers, *Animal Genetics*.

- Eichmann, C., Berger, B., e Parson, W. (2004) A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*. 118(5): 249-266.
- Eichmann, C., Berger, B., Parson, W. (2006) Relevant aspects for forensic STR analysis of canine DNA: repeat-based nomenclature and sensitive PCR multiplexes. *International congress series*, 1288: 813-815.
- Eichmann, C., Berger, B., Reinhold, M., Lutz, M., e Parson, W. (2004) Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *International Journal of Legal Medicine*. 118(6): 337-342.
- Eichmann, C., Berger, B., Steinlechner, M., Parson, W. (2005) Estimating the probability of identity in a random dog population using 15 highly polymorphic canine STR markers, *Forensic science international*, 151: 37 – 44.
- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007) An Introduction to Forensic genetics, Wiley, UK.
- Gunn, A. (2006) Essencial Forensic Biology, Wiley, UK.
- Halverson, J., Basten, C. (2005) Forensic DNA Identification of Animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. *Journal of Forensic Science* 46(4):598-605.
- Halverson, J., Basten, C. (2005) A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *Journal of Forensic Science*. 50(2): 352-363.
- Hellmann, A.P., Rohleder, U., Eichmann, C., Pfeiffer, I., Parson, W., Schleenbecker, U. (2006) A proposal for standardization in forensic canine DNA typing: allele nomenclature of six canine-specific STR loci. *Journal of Forensic Science*, 51(2): 274-81.

- Hickman, C., Roberts, L., Larson, A. (1997) *Integrated Principles of Zoology*, WCB Publishers.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314, 67–73.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76–79.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1006.
- Lawyer, F., Stoffel, S., Saiki, R., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D. (1989) Isolation, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of the DNA Polymerase Gene from *Thermus aquaticus*". *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (11): 6427-6437.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 7: 639-655.
- Menotti-Raymond, M.A., David, V.A., Wachter, L.L., Butler, J.M., O'Brien, S.J. (2005) An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples, *Journal of Forensic Science*; 50(5):1061-70.
- Menotti-Raymond, M. et al. (1997) Genetic individualization of domestic cats using feline STR Loci for Forensic Applications, *Journal of Forensic Science*, 42 (6): 1039-1051.
- Menotti-Raymond, M., David, V., Wachter, L., Yuhki, N., O'Brien, J.B. (2003) Quantitative polymerase chain reaction-based assay for estimating DNA yield extracted from domestic cat specimens. *Croatian Medical Journal*, 44(3): 327-31.

- Mitchell, B.(1979) O Mundo do Animais – Grandes Felinos, Porto Editora.
- Ott, J. (1992) Strategies for Characterizing Highly Polymorphic Markers in Human Gene Mapping, *American Journal of Human Genetics*, 51:283-290, 1992
- Pádár, Z., Angyal, M., Egyed, B., Furedi, S., Woller, J., Zoldag, L., and Fekete, S. (2001) Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian zoological gardens, *International Journal of Legal Medicine*, 115(2): 79-81.
- Pádár, Z., Egyed, B., Kontadakis, K., Furedi, S., Woller, J., Zoldag, L., and Fekete, S. (2002) Canine STR analyses in forensic practice. Observation of a possible mutation in a dog hair, *International Journal of Legal Medicine*; 116(5): 286-8.
- Pasternak, Jack J., (2005) An introduction to molecular human genetics – mechanisms of Inherited Diseases, Second edition, Wiley, UK.
- Pemberton, J.M., Slate, J., Bancroft, D.R. Barrett, J.A. (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, 4: 249-252.
- Pinheiro, F. (org) (2008) CSI Criminal. Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Rapley, R., Whitehouse, D. (Editors) (2007) Molecular Forensics, Wiley.
- Regateiro, F. (2007) Manual de Genética Médica. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Robertson, J. (editor) Forensic Examination of Hair, Taylor & Francis Forensic Science Series.
- Royal canin (2001) Enciclopédia do Cão, Aniwa Publishing.
- Royal canin (2003) Enciclopédia do Gato, Aniwa Publishing.

- Rudin, N., Inman, K. (2002) An introduction to Forensic Analysis, Second edition, CRC Press.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, s., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase, *Science*. Vol. 239: 487- 491.
- Savolainen, P.,Lundeberg, J. (1999) Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. *Journal of Forensic Sciences* 44(1):77-81.
- Savolainen, P., Zhang, Y., Luo, J., Lundeberg, J., Leitner, T. (2002) Genetic Evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs, *Science* 22, Vol. 298. no. 5598, pp. 1610 – 1613.
- Semikhodskii , A. (2007) Dealing with DNA evidence: a legal guide, Routledge Cavendish.
- Shutler, G.G. , Gagnon, P., Verret, M.S., Kalyn, H., Korkosh, S., Johnston, E., Halverson, J. (1999) Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case, *Journal of Forensic Science*, 44(3): 623-626.
- StockMarks® Horse, Cattle, and Dog Genotyping Kits, Protocol, Applied Biosystems, 2007.
- The Future of Forensic DNA Testing. Predictions of the Research and Development (2000) National Institute of Justice, National Commission on the future of DNA Evidence.
- Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™.) Protocol, Instructions for use of product DC6740, Technical Bulletin, Promega Corporation, 2006.

- Tsuji, A., Ishiko, A., Kimura, H., Nurimoto, M., Kudo, K., Ikeda, N. (2006) Unusual death of a baby: a dog attack and confirmation using human and canine STRs, *International Journal of Legal Medicine*, 22 (1): 59-62.
- US National Institute of Standards and Technology website (<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/dogSTRs.htm>)
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991) *BioTechniques*, 10, 506–513.
- Wiegand, P., Schmidt, V., Kleiber, M. (1999) German shepherd dog is suspected of sexually abusing a child, *International Journal of Legal Medicine*, 112: 324-325.

5.1 Bibliografia de imagens

Figuras da Capa:

- Alaskan Malamute
<http://www.sxc.hu/browse.phtml?f=download&id=1046540>
- Tabby cat
<http://www.sxc.hu/browse.phtml?f=download&id=984626>
programa: Adobe Photoshop cs3

Figura 1 – Adaptado de J. Pais, Centro de Estudos Geológicos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Monte da Caparica, disponível em <http://www.geopor.pt/imagens/HTerra.JPG>

Figura 2 – <http://www.dogwhispererworld.co.uk/theordercarnivora.html>

Figura 3 – <http://wilddead.skyrock.com/3.html>

Figura 4 – http://www.sosmascote.com.br/pages/origem_dos_caes.htm

Figura 5 – <http://www.royalcanin.pt/main.aspx>

Figura 6 – www.mundodosanimais.com

Figura 7 – <http://www.royalcanin.pt/main.aspx>

Figura 8 – Pasternak, Jack J., (2005) An introduction to molecular human genetics – mechanisms of Inherited Diseases, Second edition, Wiley.

Figura 9 A e B – Pasternak, Jack J., (2005) An introduction to molecular human genetics – mechanisms of Inherited Diseases, Second edition, Wiley.

Figura 10 - Semikhodskii , A. (2007) Dealing with DNA evidence: a legal guide, Routledge Cavendish.

Figura 11 - Semikhodskii , A. (2007) Dealing with DNA evidence: a legal guide, Routledge Cavendish.

Figura 12 - Semikhodskii , A. (2007) Dealing with DNA evidence: a legal guide, Routledge Cavendish.

Figura 13 - Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007) An Introduction to Forensic genetics, Wiley, UK.

Figura 14 - Robertson, J. (editor) Forensic Examination of Hair, Taylor & Francis Forensic Science Series.

Figuras 15A e 15 B – Deedrick, D., Koch, S. (2004) Microscopy of hair part II: a practical guide and manual for animal hairs, Forensic science communications, 6 (3)

6 Anexos

Anexo 1 – Ficha para colheita de amostras

Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses

“Identificação genética de amostras de origem animal (*Canis familiaris* e *Felis Catus*) em contexto forense”

Data : __/__/__

Hospital Veterinário _____

Ficha nº _____

Nome _____

Espécie _____ Raça _____

Idade _____ Sexo _____

Raça dos progenitores:

Mãe: _____

Pai: _____

Grau de consanguinidade: _____

Nacionalidade/ Naturalidade: _____

Amostra Colhida:

Sangue

Saliva

Pelos

Outra : _____

O Médico,

Anexo 2 – Raças de canídeos amostradas

RAÇA	Nº
BOXER	1
BRACO ALEMÃO	1
BULLDOG INGLÊS	1
CANICHE	3
CANICHE ANÃO	1
CÃO DE ÁGUA	1
COCKER	1
DÁLMATA	1
EPAGNEUL BRETON	1
GALGO	1
GOLDEN RETRIEVER	2
HUSKY	1
LABRADOR	2
PASTOR ALEMÃO	3
PERDIGUEIRO	3
PITBULL	2
PODENGO	1
RAFEIRO DO ALENTEJO	2
ROTTWEILLER	3
SERRA D'AIRES	1
SHIH TZU	1
SEM RAÇA DETERMINADA	28
TOTAL	61

Anexo 3 – Raças de felídeos amostradas

RAÇA	Nº
EUROPEU COMUM	54
SIAMÊS	3
PERSA	7
TOTAL	64

Anexo 4 – Soluções do kit de extracção DNA IQ™ (Promega)

Preparação da Solução Stock de Proteinase K

- 1- Adicionar 5,5 ml do Incubation Buffer ao frasco de Proteinase K liofilizada. Agitar suavemente até dissolver.

[Proteinase K] final = 18 mg/ml

- 2- Distribuir a Solução Stock de Proteinase K em pequenas aliquotas que reflectam a utilização e congelar a -20°C durante o período máximo de um ano. A Proteinase k pode ser congelada e descongelada e descongelada até 5 vezes sem perda significativa de actividade. Antes de utilizar, a Proteinase K deve ser descongelada e guardada em gelo.

Preparação da solução de DTT 1M

- 1- Dissolver 5g de DTT em água estéril de modo a que o volume final seja de 32,4 ml. Distribuir o DTT em pequenas aliquotas que reflectam a utilização e congelar a -20°C.

[DTT] final = 1M

Preparação da Solução Incubation Buffer /Proteinase K

1- Por cada raiz de cabelo: preparar 25-100µl de Incubation Buffer/Solução de Proteinase K.

Por cada amostra de tecido: preparar 50-100µl de Incubation Buffer/Solução de Proteinase K.

[Proteinase K] final = 1.8 mg/ml

Incubation Buffer	800 µl
DTT 1M	100 µl
Solução Stock de Proteinase K	100 µl
<hr/>	
VOLUME TOTAL	1000 µl

2- Misturar suavemente e guardar em gelo durante a utilização

Preparação de 1X Wash Buffer

NOTA: O 2X Wash Buffer utilizado para preparar o 1X Wash Buffer é fornecido com o Kit DNA IQ™ System (Cat.#DC6700 e DC6701)

- 1- Para o DNA IQ™ System (Cat.# DC6700: 400 reacções) adicionar 35ml de etanol 95-100% e 35ml de álcool isopropílico ao 2X Wash Buffer.
Para o DNA IQ™ System (Cat.# DC6701: 100 reacções) adicionar 15ml de etanol 95-100% e 15ml de álcool isopropílico ao 2X Wash Buffer.
- 2- Colocar a tampa e misturar por inversão várias vezes.
- 3- Rotular para se saber que os álcoois já foram adicionados. Marcar o fraco como 1X Wash Buffer. A solução pode ser armazenada à temperatura ambiente. Garantir que o frasco está bem fechado para evitar a evaporação.

Preparação do Lysis Buffer

NOTA: o Lysis Buffer é fornecido com o Kit DNA IQ™ System (Cat.#DC6700 e DC6701)

- 1- Determinar a quantidade total de Lysis Buffer a preparar:

ADN Genómico de raízes de cabelos: 150-300µl de Lysis Buffer por amostra.

ADN Genómico de tecidos frescos, congelados, fixados em formalina ou parafinados: 150-300µl de Lysis Buffer por amostra.

ADN mitocondrial de hastes de cabelos: 450µl de Lysis Buffer por amostra.

- 2- Adicionar 1µl de DTT 1M por cada 100µl de Lysis Buffer.
- 3- Misturar por inversão várias vezes.
- 4- Rotular para lembrar a adição de DTT. A solução pode ser armazenada à temperatura ambiente durante um mês, se estiver selada.