MARCELO BITTENCOURT CONTIERI

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS MÉTODOS GENÉTICO E MORFOLÓGICO PARA A DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESPÉCIES, UTILIZANDO O TECIDO ÓSSEO COMO MATÉRIA

===== SÃO PAULO =====
2006

MARCELO BITTENCOURT CONTIERI

Estudo comparativo entre os métodos genético e morfológico para a diferenciação entre espécies, utilizando o tecido ósseo como matéria

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Idércio Luíz Sinhorini

===== SÃO PAULO =====
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1731
FMVZ

Contieri, Marcelo Bittencourt
Estudo comparativo entre os métodos genético e morfológico para a identificação entre espécies, utilizando o tecido ósseo como matéria / Marcelo Bittencourt Contieri. – São Paulo: M. B., Contieri, 2006.
85 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Idércio Luíz Sinhorini.

1. Identificação de espécie. 2. Histologia. Morfologia. 3. Enzimas de restrição. 4. PCR-RFLP. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
capa	título	2	diferenciação	identificação
página de rosto	título	2	diferenciação	identificação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo comparativo entre os métodos genéticos e morfológicos para diferenciação entre espécies, utilizando tecido ósseo", protocolado sob o nº947/2006, utilizando peças ósseas de esqueletos mantidos do museu, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun" da Comissão.

(We certify that the Research "Morphological and genetic methods for differentiation between species by the use of bone tissues", protocol number 947/2006, under the responsibility of Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" in the meeting.

São Paulo, 03 de julho de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CONTIERI, Marcelo Bittencourt
Título**:** Estudo comparativo entre os métodos genético e morfológico para a identificação entre espécies, utilizando o tecido ósseo como matéria

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

A minha esposa Camila Gabriela Domingues e aos meus pais José Contieri e Jacila Bittencourt Contieri, pelo carinho, incentivo e paciência.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Idércio Luíz Sinhorini, que com sua simplicidade e paciência, me acolheu em todos os momentos que precisei, e ainda, me permitiu compartilhar de seus conhecimentos, experiências e alegrias. Espero um dia, poder retribuir o que me foi confiado, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Maria Lucia Zaidan Dagli, pelo carinho dedicado à todos nós, pós-graduandos, e pela gentileza de ter aberto as portas do Laboratório de Oncologia Experimental, pois sem isso, este trabalho não teria se realizado.

A Cíntia por despender seu tempo valioso nos experimentos que nem sempre atingiam o resultado desejado.

Ao José Luis Avanzo pelos momentos de discussão e luz, essenciais para o bom desenvolvimento do trabalho.

A Tereza pela paciência no momento da análise das lâminas histológicas.

Ao Luciano, Livia, Cláudio e esposa, pela amizade incondicional em todos os momentos e ótimo trabalho na confecção do material histológico.

Aos amigos Luciana, Daniel, Viviane, Renata, Marcos, Ariela, Emerson, Lílian, Priscila, Edson, Shirlei, Marguiti, Raimundo, Romeika e Kátia por estarem presentes nos momentos importantes da minha vida profissional e pessoal.

A Mariney, que com muito carinho, considero minha segunda mãe, cuja trajetória profissional e pessoal respeitosamente admiro, sendo ainda, responsável por muitas atitudes que me incentivaram nos períodos difíceis.

Ao Marcos Barbosa pela grande contribuição neste trabalho, por sua amizade e companheirismo neste momento da minha vida.

Aos estagiários do Laboratório de Oncologia Experimental, especialmente ao Lucas, por todo auxílio e convivência.

A todos os docentes do Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT), que de alguma forma, ajudaram no desenvolvimento e amadurecimento deste trabalho.

A todos, que acolham os meus mais sinceros e verdadeiros agradecimentos.

RESUMO

CONTIERI, M. B. **Estudo comparativo entre os métodos genético e morfológico para a identificação entre espécies, utilizando o tecido ósseo como matéria**. [Comparative study among double genetic and morphologic methods for species identification, studying the bone tissue]. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Na medicina legal a identificação de produtos de origem animal vem atingindo grande importância. A grande maioria das amostras encontradas na cena do crime são fragmentos de tecido não facilmente degradável, entre estes o tecido ósseo. Por ter sua estrutura composta por uma matriz mineral o osso preserva sua característica morfológica e material genético viável. Os objetivos do presente trabalho foram: caracterizar morfologicamente o tecido íntegro, agregando assim mais informações a respeito da espécie animal, e verificar se os dados da literatura quanto à identificação genética são confiáveis e passíveis de reprodução. Para isso foram utilizados 10 fêmures de espécies diferentes. Este material foi descarnado e teve suas características morfológicas avaliadas. Após realizar a diferenciação macroscópica, o material foi serrado em sua porção diafisária, de onde retiramos um fragmento para avaliação histológica e outro para estudo do material genético. Os métodos de avaliação histológica foram baseados na morfologia do sistema harvesiano, na disposição destes na superfície de corte, conformação do canal de Havers e nas características dos osteócitos. As características morfométricas foram baseadas apenas na área do canal haversiano e no diâmetro do Sistema Harvesiano (osteon). A avaliação genética teve como objeto de estudo o citocromo B, localizado no DNA mitocondrial, que é encontrado em maior quantidade que o DNA nuclear, além de possuir herança materna que lhe confere grande especificidade quanto à espécie animal. Utilizando um par de *primers* que seleciona uma porção de 358 pares de

bases e três enzimas de restrição, HinfI, AluI e Hae III, foi possível identificar geneticamente as 10 espécies estudadas. Este estudo revelou que a metodologia de identificação animal por morfologia macroscópica, microscópica e genética podem ser reproduzidas e são de grande importância dentro da medicina legal. Entretanto, o método genético mostrou-se mais eficiente e confiável quando dispomos de fragmentos ósseos muito reduzidos.

Palavras-chave: Identificação de espécie. Histologia. Morfologia. Enzimas de restrição. PCR-RFLP.

ABSTRACT

CONTIERI, M. B. **Comparative study among double genetic and morphologic methods for species identification, studying the bone tissue**. [Estudo comparativo entre os métodos genético e morfológico para a identificação entre espécies, utilizando o tecido ósseo como matéria]. 2006. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In Legal Medicine, the identification of products from animals has been reaching a great importance. The great majority of samples that have been founded in a crime scene are pieces of tissues that are not easily destroyed, between them, the bone tissue. Because of their structure, composed by a mineral matrix, bone preserves morphologic characteristics and viable genetic materials. The objective of the present work had been: to characterize morphologically the complete tissue, thus adding more information regarding the animal species and the verification concerning the information in literature about the genetic identification, if they are trustworthy and available to reproduction. For this 10 femur of different species had been used. This material was picked the flesh off and its morphologic characteristics had been evaluated. After to carry through the macrocospic differentiation, the material was sawed in its diafisary portion, where we remove a piece for histologic evaluation and another one for genetic material study. The methods of histologic evaluation had been based on the morphology of the harvesian system, in the disposal of these in the cut surface, conformation of the Havers canal and in the characteristics of the osteocitos. The morphometric characteristics had been based only on the area of the haversiano canal and on the diameter of the Harvesiano System (osteon). The genetic evaluation had as study object the citocromo B, located in the mitochondrial DNA, which is better founded than the nuclear DNA, besides possessing mother inheritance that confers a great especify about animal

specie. Using a pair of primers that selects a portion of 358 pairs of bases and three enzymes of restriction, HinfI, AluI and Hae III, it was possible to identify genetically the 10 studied species. This study disclosed that the methodology of animal identification for macrocospic, microscopical and genetic morphology can be reproduced and it has a great importance inside of the medical jurisprudence. However, the genetic method revealed more efficient and trustworthy when the work involves the use of very reduced bone pieces.

Words-key: Identification of species. Histology. Morphology. Enzymes of restriction. PCR-RFLP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um felino doméstico..... 48

Figura 2 A – Vista cranial B – Vista caudal do fêmur de um canideo doméstico 49

Figura 3 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um bovino..... 50

Figura 4 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um suíno 51

Figura 5 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um ovino..... 51

Figura 6 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um bugio..... 52

Figura 7 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um cachorra do mato..... 53

Figura 8 A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um gambá 53

Figura 9 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de felinos, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 55

Figura 10 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de cães, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 55

Figura 11 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de bovino, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm) 56

Figura 12 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de suíno, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 57

Figura 13 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de ovíno, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 58

Figura 14 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de bugio, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 59

Figura 15 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de cachorro do mato, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 59

Figura 16 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de gambá, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 60

Figura 17 Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de coelho, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 µm). 61

Figura 18 Diâmetros dos sistemas Harvesianos de cães e gatos. 62

Figura 19 Áreas dos canais de Havers de cães e gatos. 62

Figura 20 Produto de amplificação do gene do citocromo B com 358 pb (seta) linha 5, 6, 8 e 9, linha 2 leader de 100 pb.. 64

Figura 21 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie felina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 65

Figura 22 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie canina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 66

Figura 23 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie bovina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 67

Figura 24 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie suína. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 67

Figura 25 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie ovina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 68

Figura 26 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie primata. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 69

Figura 27 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III no cachorro do mato. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição. 69

Figura 28 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie gambá. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição..... 70

Figura 29 Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie leprina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidade de reagentes aplicados em cada microtubo para amplificação do DNA 41

Tabela 2 Quantidade de reagentes HinfI, AluI e Hae III utilizados para cada amostra..... 43

Tabela 3 Reagentes e suas quantidades utilizados para a formação do gel de poliacrilamida a 8%. 44

Tabela 4 Reagentes e suas quantidades utilizados para a coloração do gel de poliacrilamida a 8% 45

Tabela 5 Animais estudados e número de amostras colhidas..... 46

Tabela 6 Dados estatísticos da área a do canal de Havers e diâmetro do Sistema Haversiano apresentados em forma de tabela 61

Tabela 7 Quantificação do DNA extraído de osso das diferentes espécies e respectiva avaliação da pureza do DNA obtido..... 63

Tabela 8 Exibe o tamanho dos fragmentos (em pares de base) gerados pela lise enzimática com as enzimas HinfI, AluI e HaeIII no produto de amplificação do citocromo B 64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **17**
2 REVISÃO DE LITERATURA **19**
2.1 ANIMAIS E SEUS PRODUTOS PERANTE A JUSTIÇA NO BRASIL 21
2.2 IDENTIFICAÇÃO 22
2.2.1 Métodos de identificação 22
2.3 TECIDO ÓSSEO 25
2.3.1 Componentes ósseos 25
2.3.2 Osteoblastos 26
2.3.3 Osteócito 27
2.3.3.1 Distribuição dos osteócitos no tecido ósseo 28
2.4 MOLÉCULA DE DNA 32
2.4.1 Fundamentos teóricos do teste de DNA para identificação das espécies 33
2.4.1.1 A diversidade genética entre indivíduos e o polimorfismo genético 33
2.5 DNA MITOCONDRIAL 34
2.6 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E O POLIMORFISMO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO 35
3 MATERIAL E MÉTODOS **37**
3.1 OSSOS 37
3.1.1 Coleta dos ossos 37
3.1.2 Obtenção dos fragmentos ósseos 38
3.2 PROCESSAMETO DO DECIDO ÓSSEO PARA ANÁLISE DO DNA 38
3.2.1 Porcesso de limpeza e pulverização dos ossos 38
3.2.2 Extração do DNA das amostras ósseas 39
3.2.3 Quantificação do DNA 40
3.2.4 Protocolo de amplificação 40
3.2.5 Análise do produto amplificado 42
3.2.6 RFLP enzimas de restrição 42
3.2.7 Gel de poliacrilamida 43
3.2.8 Coloração do gel de poliacrilamida utilizando método de Sammons et al. 1981 e Schoenle et al. 1984 44
3.3 PROCESSAMENTO DO TECIDO ÓSSEO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA 45

4 RESULTADOS 46
4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DOS OSSOS COLETADOS 47
4.1.1 Descrição dos ossos intactos 47
4.1.1.1 Gato 47
4.1.1.2 Cão 48
4.1.1.3 Bovino 49
4.1.1.4 Suíno 50
4.1.1.5 Ovino 51
4.1.1.6 Bugio 51
4.1.1.7 Cachorro do mato 52
4.1.1.8 Gambá 53
4.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS OSSOS COLETADOS 54
4.2.1 Cortes histológicos de fragmentos de ossos de diáfise femural 54
4.2.1.1 Gato 54
4.2.1.2 Cão 55
4.2.1.3 Bovino 55
4.2.1.4 Suíno 56
4.2.1.5 Ovino 57
4.2.1.6 Bugio 58
4.2.1.7 Cachorro do mato 59
4.2.1.8 Gambá 60
4.2.1.9 Coelho 60
4.2.2 Registro das caracteristicas histomorfométricas dos ossos 61
4.3 ANÁLISE DE DNA MITOCONDRIAL 62
4.3.1 Produto da amplificação do citocromo B 64
4.3.2 Produtos da Reação enzimática em DNA do citocromo B amplificado 64
5 DISCUSSÃO 71
6 CONCLUSÕES 79
REFERÊNCIAS 80

1 INTRODUÇÃO

Frente ao aumento de questões judiciais envolvendo animais ou alimentos de origem animal, a câmara dos deputados votou a Lei n° 5.517 de 23 de outubro 1999 que regulamenta a profissão de médico veterinário e cria o Conselho Federal de Medicina Veterinária, que em seu estatuto privatiza a esta classe a peritagem.

Em decorrência, grandes desafios começaram a surgir para o médico veterinário, principalmente na área de identificação de produtos de origem animal, como: pele, ossadas, pêlos, sangue, cascos, carne e outros subprodutos animais (BELLAGAMBA et al., 2001; BELLIS et al., 2003; BOTTERO et al., 2003; BRAVI et al., 2004; HSIEH et al., 2001; IMAIZUMI et al., 2004; KAGAWA et al., 1996; MATSUNAGA et al., 1999; PARSON et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2003; SOTERIOUO et al., 1995; ZEHNER et al., 1998; WOLF et al., 1999).

Na medicina legal um dos primeiros passos que devemos seguir quanto à identificação, é a análise antropomórfica, que consiste na verificação de características específicas como espécie, raça, sexo, idade, estatura, sinais individuais, malformações, sinais profissionais, tatuagens, cicatrizes, identificação por sobreposição de fotografias e identificação pela arcada dentária (FRANÇA et al., 2001).

Nos casos em que não temos amostra de material suficiente para ser identificado por métodos tradicionais, podemos optar por exames laboratoriais mais específicos como a análise histomorfométrica e a análise do material genético. Em poucas décadas grandes avanços aconteceram dentro da área de identificação na medicina legal, e a área da análise genética foi a que mais evoluiu, deixando os métodos morfológicos em segundo plano.

O tecido ósseo é considerado um dos tecidos mais estáveis tanto morfologicamente, quanto em quantidade de material orgânico, por isso é um dos tecidos mais utilizados na

identificação (HOCHMEISTER et al., 1991). Alonso et al. (2001) fizeram esta comprovação mostrando que extratos de DNA obtidos de restos de ossos apresentavam quantidades mínimas de DNA degradado. Vários estudos utilizam o DNA como fonte de informações, mas o descobrimento de polimorfismos do ácido desoxirribonucleico (DNA) tornou-se um instrumento poderoso nos testes de identificação (JEFFREYS et al., 1985).

O estudo aqui proposto tem como base confrontar os dados da literatura em relação à identificação espécie-específica através da análise morfológica e da caracterização genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANIMAIS E SEUS PRODUTOS PERANTE A JUSTIÇA NO BRASIL

Animal – Em sentido restrito e na linguagem do direito, animal se entende vivente irracional, sobre a qual o homem tenha ou possa ter império. Tecnicamente, diz-se *semovente*.

Quando em poder do homem, o animal se constitui como bem seu, e assim dele pode dispor, vendê-lo, dá-lo, ou trocá-lo, desde que tenha qualidade e capacidade para alienar bens que lhe pertençam.

Animais – no plural o termo significa não somente o ente dotado de órgão respiratório, que executa movimento e goza da faculdade de locomoção, como designa e qualquer espécie de produto de origem de animais.

Assim, na classificação das mercadorias importadas, e sob a denominação genética de animais, incluem-se não somente os animais vivos, como também os cabelos, pêlos, penas, peles e couros, carnes, matérias oleosas, madrepérola, marfim, lã e seda. (DE PLÁCIDO E SILVA, 1998).

Animais bravios – Assim se diz dos animais que, sem dono e em liberdade, vivem nas florestas e nos campos devolutos. Animais selvagens.

Os animais bravios, apreendidos ou caçados, passam a pertencer àquele que deles se assenhorear e os domesticar, assinalando-os com a sua marca.

Animais domésticos – Assim se designam os animais já amansados ou domesticados pelo homem, e por ele assinalados com a sua marca, que lhe dá a propriedade.

Consideram-se propriamente domesticados os que, sendo anteriormente bravios, já apropriados, se acostumaram ao jugo do homem e lhe prestam serventia. Mansos, quando nascem e vivem em poder da pessoa a quem pertencem. Os animais mansos se mostram frutos

dos animais bravios domesticados e passam a pertencer ao dono do animal doméstico por efeito de acessão. (Vocabulário jurídico).

Capitulo III da Usurpação – Supressão ou alteração de marca em animais

ART. 162 (código penal) – Suprimir ou alterar, indevidamente, em gado ou rebanho alheio, marca ou sinal indicativo de propriedade (pena – detenção, de 6 meses a 3 anos, e multa)

Capitulo III dos crimes contra a saúde pública – Epidemia

ART. 267. Causar epidemia, mediante a propagação de germes patogênicos (pena – reclusão, de 10 a 15 anos – determinado pela Lei nº 8072, de 25 de Julho de 1990).

§ 1º Se o fato resulta em morte, a pena é aplicada em dobro (art. 1º, III, i, da Lei nº 7960, de 21 de Dezembro de 1989; arts. 1º e 9º da Lei nº 8072, de 25 de Julho de 1990).

§ 2º No caso de culpa, a pena é de detenção, de 1 a 2 anos, ou, se resulta morte, 2 a 4 anos.

Capitulo III dos crimes contra a saúde pública – Infração de medida sanitária preventiva

ART. 268. Infringir determinação do poder público, destinada a impedir introdução ou propagação de doença contagiosa (pena – detenção, de 1 mês a 1 ano, e multa – art. 9º da Lei nº 7649, de 25 de Janeiro de 1988). Parágrafo único. A pena é aumentada de um terço, se o agente é funcionário da saúde pública ou exerce a profissão de médico, farmacêutico, dentista ou enfermeiro.

Capitulo III dos crimes contra a saúde pública – Omissão de notificação de doença

ART. 269. Deixar o médico de denunciar à autoridade pública doença cuja notificação é compulsória (pena – detenção, de 6 meses a 15 anos, e multa).

Capitulo III dos crimes contra a saúde pública – Envenenamento de água potável ou de substância alimentícia ou medicinal

ART. 270. Envenenar água potável, de uso comum ou particular, ou substância alimentícia ou medicinal destinada a consumo (pena – reclusão, de 10 a 15 anos – determinada pela Lei nº 8072, de 25 de Julho de 1990).

§ 1º Está sujeito à mesma pena quem entrega a consumo ou tem deposito, para fim de ser distribuída, água ou a substância envenenada.

Capitulo III dos crimes contra a saúde pública – Falsificação, corrupção ou alteração de substâncias ou produtos alimentícios

ART. 272. Corromper, adulterar, falsificar ou alterar substância ou produto alimentício destinado a consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo (pena – reclusão, de 4 a 8 anos, e multa – caput com redação determinada com a Lei nº 9677, de 2 de Julho de 1998).

§ 1º A. Incorre nas penas deste artigo quem fabrica, vende, expõe à venda, importa, tem em depósito para vender ou, de qualquer forma distribui ou entrega a consumo a substância alimentícia ou o produto falsificado, corrompido ou adulterado.

§ 2º Se o crime é culposo, pena – detenção de 1 a 2 anos, e multa.

Capitulo III dos crimes contra a saúde pública – Falsificação, corrupção ou alteração de produto destinado a fins terapêuticos alimentícios

ART. 273. Falsificar, corromper, adulterar ou alterar produto destinado a fins terapêuticos ou medicinais (pena – reclusão, de 10 a 15 anos, e multa).

§ 1º Nas mesmas penas incorre quem importa, vende, expõe à venda, importa ou de qualquer forma, distribui ou entrega a consumo o produto falsificado, corrompido, adulterado ou alterado.

§ 1º A. Incluem-se entre os produtos a que se refere este artigo os medicamentos, as matérias primas, os insumos farmacêuticos, os cosméticos, os saneantes e os de uso em diagnóstico.

Capitulo V da apropriação indébita – Indução ou abandono de animais em propriedade alheia

ART. 164 (código penal) – Induzir ou deixar animais em propriedade alheia, sem consentimento de quem de direito, desde que o fato resulte em prejuízo (pena – detenção, de 15 dias a 6 meses ou multa – somente em caso de queixa)

2.2 IDENTIFICAÇÃO

Na medicina forense chama-se identificação o processo pelo qual se determina a identidade de uma pessoa, animal ou de uma coisa, ou um conjunto de características cuja finalidade é levantar uma identidade. Portanto, identificar uma pessoa, animal ou um objeto é determinar uma individualidade e estabelecer caracteres ou conjunto de qualidades que a fazem diferente de todas as outras e igual apenas a si mesma (FRANÇA, 2001).

2.2.1 Métodos de Identificação

Freqüentemente são enviados para o laboratório de medicina forense, vários tipos de materiais, desde couro, pêlos, carne, ossos, sangue, restos biológicos em decomposição e até objetos utilizados em crimes. Em várias situações é imprescindível para a resolução do caso, descobrir de que espécie ou raça animal é originária a amostra, como ocorre nas investigações de adulteração de produtos de origem animal (BRAVI et al., 2004; SOTERIOU et al., 1995).

Para fazer a identificação da espécie animal temos em mãos vários métodos que podem ser aplicados, dependendo logicamente da amostra encontrada. Quando as amostras vêm de instrumentos que foram utilizados no crime como, por exemplo, uma faca ou automóvel, podemos tentar encontrar restos de gordura. Segundo Kagawa et al. (1996) o

tecido adiposo compõe cerca de 15% do peso corpóreo do indivíduo, sendo este de difícil remoção do objeto mesmo após enxágüe com água. Para análise do tecido adiposo pode-se utilizar dois métodos como o de cromatografia gasosa capilar ou de cromatografia gasosa com espectrografia de massa que analisa a composição dos triglicerídeos e a posição dos ácidos graxos dentro destes.

As amostras de fibras ou cabelos que são encontradas na cena do crime também podem ser uma evidência importante para o estudo forense e para a resolução do caso. Há muito se sabe identificar morfologicamente os tipos de fibras que se desprendem, e muito pouco se sabe em relação aos pêlos. Entretanto a identificação de pêlos é um pouco mais complexa devido a grande quantidade de espécies animais, da variação morfológica e de coloração dentro de um mesmo indivíduo (MENOTTI-RYMOND et al., 1997; PFEIFFER et al., 2004; SALVOLAINEN et al., 1997; SALVOLAINEN et al., 1999; WETTON et al., 2003).

Alguns autores relatam a importância que a medicina forense tem na identificação de produtos de origem animal adulterados, nos quais há presença de material de qualidade inferior ou mais barata misturado com material de alta qualidade, muitas vezes com o intuito de diminuir o custo, ou melhorar o aspecto geral do produto e lesar o consumidor, sendo os produtos moídos e cozidos como patê de fígado de ganso e pato, carnes nobres e queijos os preferidos dos falsificadores (BOTTERO et al., 2003; MATSUNAGA et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2003; WOLF et al., 1999).

Bellagamba et al. (2001) também cita a importância da identificação dos componentes das rações dos ruminantes, nas quais é proibida a mistura de farinha de ossos ou qualquer tipo de proteína que tenha origem de outro ruminante, justamente para impedir a contaminação cruzada, principalmente com o advento da encefalopatia espongiforme bovina (BSE).

Como em seres humanos, em alguns casos é importante identificar de que origem é o animal ou seus produtos (sêmen, embriões, óvulos, filhotes), pois trata-se de um elemento predecessor de uma linhagem genética melhor e que vai adicionar características melhores ao rebanho, sendo assim é um dos tópicos mais importantes não só na reprodução animal como na medicina veterinária forense, por isso o estudo filogenético tem sido amplamente estudado (GABRIEL et al., 2001; MIROL; GARCIA; DUPLOUT, 2002; MIROL; GARCIA; VEJA-PLA, 2002; MURRAY et al., 1995; WETTON et al., 2003).

Alguns animais selvagens e seus produtos, devido ao seu grande valor biológico, têm proibidas sua caça e comercialização. A legislação brasileira e alguns órgãos nacionais e internacionais regulamentam a conservação de espécies raras ou ameaçadas de extinção. Porém podemos observar diariamente em jornais e noticiários da televisão que estas leis são transgredidas freqüentemente. Um caso bem estudado é dos tigres asiáticos, que pela cultura local, servem para fabricação de produtos farmacêuticos afrodisíacos, anti-reumáticos, anti-convulsivos entre outros, e este animal é protegido pela *Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES), sendo proibido a comercialização de qualquer produto que contenha partes deste animal (HSIEH et al., 2001; WAN et al., 2003; WETTON et al., 2002).

O roubo e o abate clandestino de animais também foram relatados como ponto importante na medicina veterinária forense na Argentina em especial na região dos Pampas. Bravi et al. (2004) mostraram que a utilização da análise do DNA de qualquer material biológico pode identificar a espécie animal, mesmo em amostras degradadas. Em estudos arqueológicos ou até mesmo em casos policiais nos quais se encontram ossadas, é importante saber a que espécie pertencem. Quando não se consegue identificar através da análise antropológica devido à conformação anormal óssea ou pouca quantidade de material, tenta-se a análise por exames radiográficos, características histológicas ou, mais recentemente, a

análise do DNA (CATTANEO et al., 1995; CHILVARQUER et al., 1987; IMAIZUMI et al., 2002; IMAIZUMI et al., 2005; LOCKE, 2004; METZ et al., 2003; MULHERN; UBELAKER, 2001;)

2.3 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um dos tecidos mais resistentes e rígidos dos vertebrados. Tem como função principal suporte para as partes moles e proteção para os órgãos vitais. Ele é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e um material intracelular calcificado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

2.3.1 Componentes ósseos

A matriz óssea é constituída por vários componentes orgânicos e inorgânicos, por exemplo: colágeno, açúcares, glicoproteínas, proteoglicanas, glicosaminoglicanas (GAGs), peptídeos, lipídios, íons orgânicos, íons inorgânicos e água. Muitos fatores influenciam o tipo e a quantidade dos constituintes ósseos como idade, espécie, estado de saúde, tipo de osso, organização óssea. Em uma amostra de osso compacto diafisário as análises químicas revelam conter 22% de matriz orgânica, 69% de matéria mineral (hidroxiapatita) e 9% de água. A matriz orgânica do osso, chamada osteóide, é formada pelo estroma fibroso e pela substância fundamental amorfa. O colágeno, o ingrediente predominante da matriz, constitui cerca de 90% da matriz orgânica e os 10% restantes correspondem à substância fundamental amorfa. A hidroxiapatita tem a fórmula química $Ca_5(PO_4)_3OH$. Ocorrem numerosas substituições in vivo que reduzem a esperada proporção molar de 1,66 entre o cálcio e o fosfato. Entre os

numerosos elementos e compostos substituídos estão: Na^{+}, Mg^{++}, $CO^{=}_{3}$, F^{-}, Pb^{++}, Sr^{++}, citrato, ésteres de fosfato, difosfonatos, pirofosfatos e aminoácidos (BANKS, 1991).

2.3.2 Osteoblasto

O osteoblasto é a célula que sintetiza a base orgânica da matriz óssea e é responsável pela secreção do pró-colágeno (colágeno Tipo I) e outros componentes (proteoglicanos e glicoproteínas), dispõem-se sempre na superfície óssea num arranjo que lembra um epitélio simples.

Durante os períodos inativos dos seus ciclos vitais, elas assumem aspecto fusiforme e são chamadas de osteoblastos inativos. Quando inativos apresentam citoplasma levemente basófilo, contendo um único núcleo oval ou arredondado e, quando em períodos de atividade, as células se hipertrofiam tornando-se polarizadas; assumindo assim características epitelióides definitivas. O núcleo único, com um nucléolo evidente, é deslocado para a extremidade da célula mais distante da superfície óssea. O citoplasma é levemente basófilo devido ao alto conteúdo em ácido ribonucléico ribossômico. O aparelho de Golgi é bem desenvolvido e numerosas mitocôndrias são características (BANKS, 1991).

A atividade secretora do osteoblasto é bifásica. A primeira fase da atividade envolve a síntese e a secreção de materiais orgânicos. A orientação das fibras colágenas pode se dever à influência do osteoblasto, da resposta ao estresse ou a uma combinação de ambos os fatores (LOCKE, 2004; METZ et al., 2003). A primeira fase termina na formação da camada de osteóide.

A segunda fase desta atividade é a mineralização da camada de osteóide. Os íons de cálcio que foram armazenados no osteoblasto, especialmente nas mitocôndrias, são liberados das células e reagem com o colágeno. A mineralização se dá inicialmente sobre as fibras

colágenas e, posteriormente, no interior das fibras colágenas. A mineralização inicial corresponde a aproximadamente a metade da capacidade da matriz. A adição gradual e progressiva de minerais ocorre durante vários meses, às custas da água.

A formação progressiva da camada de osteóide e sua posterior mineralização é responsável pela característica altamente ordenada e laminar do osso maduro.

À medida que os osteoblastos secretam os seus produtos e se retiram da frente de osteóide em avanço, umas poucas células (uma para cada 10) ficam enclausuradas no seu próprio produto de secreção. Neste ponto os osteoblastos passam a serem chamados de osteócitos.

2.3.3 Osteócito

A atividade dos osteoblastos sobre uma superfície óssea em formação está bem sincronizada. As células produzem cerca de 2 μm^3 de osteóide por dia. Este osteóide se acumula, camada sobre camada, até que exista uma camada de osteóide definitiva que pode variar entre 10-15 µm de espessura, dependendo da quantidade de osteócitos que estão nesta região (METZ et al., 2003). A cor da camada de osteóide que nunca foi mineralizada é rosa claro, na coloração pela técnica da hematoxilina e eosina, comparado com o osteóide mineralizado (roxo). A camada de osteóide está separada do osso restante por uma faixa reversa mais escura, a partir de onde a mineralização centrípeta da camada de osteóide progride. A camada de osteóide fica evidente nos cortes mineralizados. A camada de osteóide é matriz orgânica que, embora nunca tenha sido mineralizada, virá a ser.

Os prolongamentos dos osteócitos são características importantes destas células, sendo que o citoplasma é levemente basófilo ou acidófilo. O osteócito é uma forma menos ativa do

osteoblasto. A lacuna e a célula nela contida podem variar de arredondadas a lenticulares. Em conseqüência da fixação, os osteócitos se retraem das superfícies lacunares.

Os prolongamentos celulares dos osteócitos não são facilmente observados com o microscópio óptico. Os canalículos são facilmente observados nos cortes mineralizados. Os canalículos formam uma extensa rede de comunicação entre os osteócitos. Cada canalículo é ocupado pelo prolongamento celular de um osteócito. Os prolongamentos osteocíticos e os canais associados se estendem para as células da superfície endóstea e perióstea, fazendo contato com elas. Este contato entre os osteócitos facilita a coordenação de suas atívidades. Contatos semelhantes com as células superficiais osteoblastos - garantem a coordenação também entre estas células. Esses contatos favorecem a atividade coordenada da bomba osteocitica-osteoblástica, um mecanismo para a manutenção homeostática dos níveis de cálcio plasmático. (BANKS, 1991).

2.3.3.1 Distribuição dos osteócitos no tecido ósseo

Analisando microscopicamente o tecido ósseo podemos dividi-lo em dois subtipos: o primário sendo considerado imaturo e o secundário maduro ou lamelar. Ambos têm os mesmos constituintes da matriz, porém, enquanto no tecido ósseo primário as fibras colágenas formam conjuntos dispostos irregularmente, no tecido ósseo secundário estas fibras se organizam em lamelas que adquirem uma forma muito peculiar, muitas vezes em camadas concêntricas em torno de canais com vasos que são delimitadas por uma linha de cemento, formando assim o canal de Havers que são bem evidenciados nas diáfises ósseas (MULHERN; UBELAKER, 2001).

O osso primário é o primeiro osso que se forma nos centros de ossificação do feto no osso esponjoso primário dos ossos dos adolescentes. Também é o primeiro osso que se forma

nos locais de reparação de fratura. Alguns tipos de tumores ósseos se caracterizam pela presença deste tipo de osso. Normalmente, ele ocorre no osso alveolar associado aos dentes e aos pontos de união dos tendões ao osso.

Embora este tipo de osso possa variar quanto à forma, de osso esponjoso a compacto, raramente se encontram ósteons neste tecido. Sob circunstâncias normais, este osso sempre é substituído por osso secundário. É um tecido temporário que fornece sustentação ao organismo em desenvolvimento.

O osso secundário também pode ser chamado de osso maduro ou lamelar. A maior parte do esqueleto adulto é formada por este tipo de osso. As lacunas e, portanto, as células deste osso são mais alongadas que no osso primário. Ainda, as lacunas estão distribuídas de forma ordenada na matriz, num padrão que reflete o arranjo lamelar e ordenado do colágeno. As fibras colágenas estão dispostas num arranjo helicoidal de ângulos variados, em lamelas sucessivas; portanto, um padrão muito ordenado de birrefringência é observado ao microscópio de polarização. A matriz orgânica desmineralizada do osso secundário se cora levemente e de maneira desigual com os corantes ácidos.

O osso compacto representa a quantidade máxima de osso que pode haver num dado volume de tecido. O osso compacto pode estar organizado em lâminas (lamelas) ou ósteons (sistemas Haversianos).

A deposição de tecido ósseo num padrão de lâminas sucessivas é típica da atividade formadora de osso do periósteo e do endósteo. As lamelas ou lâminas sucessivas de osso secundário são depositadas em camadas ósseas extensas chamadas sistema circunferencial externo ou lamelas periósteas. O endósteo cortical também forma lâminas de tecido ósseo. Este osso forma o sistema circunferencial interno ou as lamelas endósteas. As lamelas internas podem se continuar como parte das trabéculas do osso da cavidade medular.

O osso do ósteon é o osso lamelar que forma os ósteons ou os sistemas Haversianos. O osso está disposto em lâminas ou camadas concêntricas em volta dos canais dos ésteons ou canais Haversianos. Os limites externos do osso do ósteon estão demarcados por uma linha reversa ou linha cimentante. Os canais Haversianos contêm vasos sangüíneos, nervos vasomotores, assim como células do endósteo dos ósteons.

Os ósteons podem ser primários ou secundários. Os ósteons primários são formados na superfície perióstea. Eles são cilindros de pequeno diâmetro, os quais são compostos por poucas lâminas ósseas concêntricas. Eles acrescentam força aos ossos, tornam lisas as superfícies nas quais eles são formados e são responsáveis pela continuidade dos vasos do periósteo com os vasos do osso compacto. A formação dessas estruturas demonstra claramente a continuidade dos envoltórios e confirma que o endósteo do ósteon se origina do periósteo.

Os ósteons secundários são laminas ósseas concêntricas que se formam no interior do osso compacto. O único pré-requisito para sua formação é a existência de um túnel no interior do osso. O túnel mais óbvio é o do ósteon primário. O túnel (canal do ósteon, canal de Havers) dessas estruturas se torna o substrato sobre o qual agem os osteoclastos. Os osteoclastos removem tecido ósseo e expandem os limites do canal de Havers. O limite desta zona de osteoclastos é definido pela linha reversa (linha cimentante). A linha cimentante, portanto, é o limite periférico da remoção do tecido ósseo e é a superfície de deposição de osso neo-formado pelos osteoblastos, depois que a atividade dos osteoclastos cessa nesta região. A deposição centrípeta de lâminas sucessivas de tecido ósseo resulta na formação de novos ósteons, os ósteons secundários. Estes termos gerais são aplicados a todas as gerações posteriores de ósteons – secundários, terciários ou quaternários. Este tipo de reabsorção óssea de atividade formadora (remodelação) resulta na destruição dos ósteons previamente formados, na formação de novos ósteons e na formação de estruturas remanescentes do osso

dos ósteons e dos sistemas circunferenciais. Esses restos dos ósteons são chamados de sistemas intermediários. Os ósteons secundários podem encostar uns nos outros ou podem estar separados pelos sistemas intermediários. Ainda, os ósteons secundários podem estar isolados no interior dos sistemas circunferenciais.

Os ósteons são as unidades estruturais do osso. Eles são cilindros longos com uma cavidade central, o canal de Havers. Os ósteons podem estar intensamente ramificados. Geralmente eles estão presentes nas regiões de grande tensão óssea. Portanto, estas entidades morfológicas também podem ser comparadas às barras de ferro do concreto armado.

Os vasos sangüíneos do osso são enclausurados durante os primeiros estágios de desenvolvimento. Esses vasos estão conectados aos vasos da superfície perióstea e endóstea através dos grandes canais de Volkmann. Os vasos dos ósteons se comunicam livremente uns com os outros através de canais comunicantes. Portanto, a rede vascular interna está intensamente anastomosada (BANKS, 1991).

As características histológicas descritas são a base da identificação morfológica das espécies por análise do tecido ósseo. A variação morfológica é muito vasta devido a complexidade de formação do tecido ósseo. Os parâmetros morfológicos apresentados são válidos em um animal adulto e hígido. Porém, há variações conforme a fase de vida do animal e sua reorganização mediante processos patológicos.

O tecido ósseo pode ser explorado para identificação da espécie pela extração do material genético.

2.4 MOLÉCULA DE DNA

A célula é a unidade fundamental da vida, com independência própria de manufaturação, processando aminoácidos, lipídeos, carboidratos e outros elementos essenciais ao processo vital. Localizados no núcleo da célula, estão os cromossomos, que são estruturas compostas de DNA e nucleoproteínas. Um cromossomo em cada par autossômico é derivado de cada célula parental na hora da concepção, formando os pares de cromossomos homólogos, que estão altamente compactados carregando as informações dos padrões de herança. Os genes estão localizados nos locos que são sítios particulares dos cromossomos. Várias versões dos genes são chamadas de alelos e o conjunto completo dos cromossomos com todos os seus genes é denominado genoma (MELSON**,** 1994).

A molécula de DNA é encontrada em todas as células que possuem núcleo como os leucócitos, espermatozóides, células epiteliais e células do tecido ósseo. Cada fita simples de DNA é constituída da alternância de um açúcar (desoxiribose) e o grupo fosfato, que se encontra ligado a uma molécula nitrogenada (Adenina, Timina, Citosina e Guanina). O conjunto de um grupo fosfato ligado ao açúcar com uma base é chamado de nucleotídeo. As repetições destes nucleotídeos formam a fita simples e conseqüentemente um polímero de nucleotídeos forma a molécula de DNA. A fita simples define como a outra fita, da mesma hélice, se constituirá. Isto se deve às fitas possuírem complementaridade "in natura". Na molécula do DNA ocorre pareamento das bases nitrogenadas, ou seja, a adenina sempre se liga a timina e a guanina sempre se liga a citosina, na qual resulta o DNA de dupla hélice, tendo a aparência de uma escada em espiral, onde os degraus são os pares de base (A-T) (C-G) e os suportes laterais são os açúcares ligados aos fosfatos (LEHNINGER, 1995). A ordem, ou seqüência destes pares de base constitui o código genético e determina o papel e função da molécula de DNA (MELSON, 1994).

2.4.1 Fundamentos teóricos do teste de DNA para identificação das espécies

2.4.1.1 A diversidade genética entre indivíduos e o polimorfismo genético

A variação hereditária entre os indivíduos é o princípio básico que torna possível os estudos moleculares ou citogenéticos. Calcula-se que a cada novo zigoto, existam 100 novas combinações de pares de bases ausentes no genoma dos dois genitores. Isto se deve as sucessivas mutações no DNA durante as divisões mitóticas e meióticas que ocorrem, relativos aos processos de ovocitogênese e espermatogênese. A maior parte desta variação não se restringe às seqüências codificadoras (exons), mas se encontram em seqüências, não codificadoras (introns). O influxo constante de novas variações de nucleotídeos garante um alto grau de diversidade genética e individualidade entre indivíduos da mesma espécie (GARDNER, 1986; THOMPSON, 1993).

As formas alternativas de informações genéticas, de um determinado loco, denominam-se alelos. Muitos *loci* caracterizam-se por vários alelos relativamente comuns, que permitem que membros de uma mesma população de ocorrência natural sejam classificados em fenótipos nitidamente distintos. Polimorfísmo genético por definição é a ocorrência de múltiplos alelos em um loco, onde pelo menos dois alelos aparecem com freqüências superiores a 1%. Por convenção loci polimórficos são aqueles nos quais pelo menos 2% da população são heterozigotos. Em razão da presença dos polimorfísmos genéticos, o DNA de todos os seres, exceto de gêmeos monozigóticos, é único (HIRATA; HIRATA, 1998: WEEDN; SWARNER, 1998;).

2.5 DNA mitocondrial

A mitocôndria é uma estrutura diferente de outras organelas pré-existentes na célula. Essas organelas contêm DNA, e os três tipos de RNA (rRNA, mRNA e tRNA) e todo o sistema molecular necessário para a síntese de algumas proteínas, com isso tem a capacidade de se replicar sem a interferência do DNA do núcleo.

A presença de DNA, dos vários tipos de RNA e de um mecanismo de auto-reprodução por fissão semelhante ao das bactérias, além de outros dados, sugerem que as mitocôndrias se originaram de bactérias aeróbias, que estabeleceram relação simbiótica com células eucariontes anaeróbias. O DNA das mitocôndrias, como o DNA das bactérias, codifica mRNAs formados apenas por éxons, sem íntrons.

O DNA mitocondrial (mtDNA), localizado na membrana interna da organela, possui aproximadamente 16.500 nucleotídeos nos mamíferos (ALBERTS et al., 1994; ANDERSON et al., 1982; LEWIN, 2001). Esta molécula codifica 13 enzimas participantes da fosforilação oxidadtiva, 22 tRNAs e 2 rRNAs (ANDERSON et al., 1981)

Cada mitocôndria possui várias cópias de DNA que se apresenta sob a forma de filamentos circulares em hélice dupla, com uma circunferência de 5 a 6 µm. Uma peculiaridade do DNA mitocondrial é sua origem exclusivamente materna. As mitocôndrias do organismo se originam das mitocôndrias do óvulo, sem participação das mitocôndrias do espermatozóide. Além destas peculiaridades podemos citar que em seu código genético, existem 4 códons cujas instruções diferem das de seus pares do DNA nuclear. São os códons AGA, AGG, AUA e UGA. No DNA nuclear, os dois primeiros correspondem ao aminoácido arginina, enquanto no DNA mitocondríal se comportam como códons de terminação. No

DNA nuclear, o códon AUA codifica a isoleucina e no DNA mitocondrial, a metionina. No DNA nuclear, o códon UGA é um códon de terminação e no DNA mitocondrial codifica o triptofano.

Evidenciar as diferenças na seqüência de bases do DNA mitocondrial é de extrema importância na caracterização da espécie. Essa diferença pode ser evidenciada com o uso de enzimas de restrição.

2.6 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E O POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição são enzimas de origem bacteriana que se ligam à molécula de DNA em seqüências específicas, cindindo-a. Nas bactérias estas enzimas desempenham um papel fundamental na proteção do seu genoma contra infecções virais externas. Também conhecida como impressão digital genética (DNA-"*fingerprint*"), as análises por RFLP baseiam-se na detecção de padrões individuais específicos de fragmentos de restrição de DNA de diferentes tamanhos, contendo diferentes números de cópias de seqüências repetidas, os minissatélites. São analisados os fragmentos de restrição que contem o DNA repetitivo, no qual o número de unidades centrais de repetição difere entre indivíduos (WALKER; RAPLEY, 1999). A seqüência de reconhecimento varia de 4 a 6 pares de bases de características palindrômicas, ou seja, a ordem de bases do sítio de reconhecimento de uma fita de DNA é exatamente o reverso daquela na fita complementar (TRENT et al., 1997).

Em 1970, na Universidade John Hopkins, foi descoberta a primeira enzima de restrição, isolada da bactéria *Haemophilus influenzae* e denominada *Hind*II. Sucessivamente, outras enzimas foram isoladas de outras bactérias como, por exemplo, a Eco RI e a HaeIII (LEHINGER, 1995; MELSON, 1994; WALKER; RAPLEY, 1999).

A molécula de DNA, em seus sítios de reconhecimento pelas enzimas de restrição, quando em contato, resultam na digestão ou segmentação de fragmentos de diferentes tamanhos. O comprimento depende do número de pares de bases entre os sítios de reconhecimento, que se apresentam de tamanho diverso, a essa variabilidade denomina-se Polimorfísmos do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP). Estes polimorfismos ocorrem entre indivíduos, quando as seqüências de DNA diferem entre os sítios de reconhecimento digeridos pela enzima de restrição (MELSON, 1994). Devido a enorme variação das características físicas entre os indivíduos, os mapas de restrições de vertebrados demonstram muitos polimorfísmos entre os genomas individuais, RFLPs diferentes. O primeiro RFLP útil a aplicação forense em identificação humana, foi descrito em 1978, quando Alec Jeffreys descreveu diferenças no número de seqüências curtas repetidas denominadas minissatélites (PENA et al., 1993). Os RFLPs surgem por quaisquer mutações que alterem as posições relativas das seqüências palindrômicas de reconhecimento pelas enzimas de restrição. Os RFLPs ocorrem tanto nos íntrons (regiões não codificantes), como nos éxons (regiões codificantes). Os RFLPs que ocorrem nos íntrons são os mais comumente utilizados para fins de identificação forense (WALKER; RAPLEY, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODO

O procedimento experimental referente à extração, amplificação e digestão enzimática de amostras de DNA, conjuntamente com a análise histológica dos fragmentos de ossos foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

3.1 OSSOS

Para manter um padrão neste estudo escolhemos retirar fragmentos da região diafisária do fêmur. Os ossos foram obtidos no período de 2000 a 2005.

3.1.1 Coleta dos ossos

Foram coletados 30 fêmures, sendo 09 gatos, 09 cães, 03 bugios, 02 cachorro do mato, 01 veado, 02 bovinos, 01 caprino, 01 sagüi e 02 gambás, o tecido ósseo foi obtido de animais que tenham vindo a óbito por qualquer processo, sendo estes obtidos na sala de necropsia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A foto-documentação e medição do tamanho dos fêmures foram realizadas antes de qualquer procedimento.

A limpeza e a obtenção dos fragmentos de osso compacto foram feitas numa sala distinta e distante do laboratório de extração e análise do DNA.

3.1.2 Obtenção dos fragmentos ósseos

Os fêmures coletados foram limpos de tecidos através de descarne e raspagem manual com a faca de magarefe e a rugina, e logo em seguida limpos com água e sabão. Os fragmentos ósseos para o estudo foram retirados de região medial da diafise femural, utilizando uma serra manual para esquadrilhas (SME-12 – Metalúrgica Caracol LTDA), que não permitia a mudança de posição, mantendo assim a regularidade dos cortes. Foram serrados dois fragmentos que apresentavam ± 7 milímetros de espessura e 1 centímetro cada lado.

Do fragmento que foi utilizado para a extração de material genético. Retiramos a medula com o auxílio de uma pinça cirúrgica e um bisturi, e a área óssea que estava em contato com a medula foi raspada com a ponta de um bisturi. Logo após este material foi lavado com álcool 70% e posto para secar sob um papel no fluxo laminar. Depois de seco este material foi colocado em sacos plásticos previamente identificados e imersos em nitrogênio líquido até o momento da pulverização.

O fragmento que foi analisado histologicamente foi lavado em água corrente e posto para secar sob um papel e posteriormente armazenado em um cassete previamente identificado. Estes ossos foram desgastados por uma lixa odontológica diamantadas, até ficar parcialmente translúcido e permitir sua fixação em lâmina de vidro.

3.2 PROCESSAMENTO DO TECIDO ÓSSEO PARA ANÁLISE DO DNA

3.2.1 Processo de limpeza e pulverização dos ossos

Em outro ambiente, distante da sala onde eram obtidos os fragmentos ósseos, a bancada, o martelo e a base de metal utilizados eram limpos com álcool 70% antes da

manipulação de cada amostra. O saquinho que continha a amostra era retirado de dentro do nitrogênio líquido, envolvido com folha de papel alumínio, colado sobre a superfície de metal e martelado até o material ficar pulverizado. Posteriormente, este pó era colocado em um microtubo de 2,0 ml.

3.2.2 Extração do DNA das amostras ósseas.

O DNA foi extraído pelo método orgânico modificado (MINIATIS et al., 1989). Todo conteúdo de ossos pulverizados foi utilizado. Cada amostra foi acrescida de 200 µL de tampão de lise (500 µL de Tris-HCL 1M pH=8,0, 200 µl de EDTA 0,5 m Ph=8,0, 500 µL SDS 10%, 8,8 ml de H2O destilada) com proteinase K (2,5 ml de Tris à 50 mM , 2,5 ml de Glicerol) (50 µL de proteinase K para 3 ml de tampão de lise).

O preparado foi incubado por 2 horas em banho-maria a 65º C, posteriormente acrescido de mais 200 µL do tampão de lise sem a proteinase K. Após homogeneização as amostras eram deixadas por mais 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas durante 20 minutos a 10.000 r.p.m. a 4º C em centrifuga Eppendorf Centrifuge 5810 R.

Foram transferidos 200 µL do sobrenadante para um novo tubo e adicionado 400 µl de etanol 100% gelado, e 10% do sobrenadante de acetato de sódio a 3M gelado, sempre homogeneizando e mantendo os tubos em gelo até o aparecimento da medusa ou botão de DNA (*pellet*). Posteriormente foram processados a centrifugação por 10 minutos a 6000 r.p.m. a 4º C e desprezado o sobrenadante por inversão antes de deixar secar.

Para remover o excesso de sal e facilitar a solubilização do pellet foram adicionados ao microtubo 400 µl de etanol 70% gelado e centrifugado por mais 10 minutos a 6000 rpm a 4ºC . O sobrenadante foi desprezado por inversão.

O sedimento foi ressuspendido com 100 µl de TE (1 ml de Tris-HCl 1 M pH=8,0, 200 µL de EDTA 0,5 M pH =8,0, H_2O MilliQ q.s.p. 100 ml pH=7,5) e guardado em geladeira a 4ºC.

3.2.3 Quantificação do DNA

A concentração e a relação A260/A280 (pureza) do DNA extraído dos ossos foram determinadas através de extinção em U.V. Efetuou-se uma diluição 1:10 do DNA reconstituído, em tampão TE, com volume final de 100 µl. As leituras realizadas utilizando comprimentos de onda 260 nm e 280 nm, em um espectrofotômetro duplo feixe (Eppendorf - Biophotometer). A concentração foi estimada em µg de DNA por osso (1 unidade de densidade ótica = 50 µg de DNA de dupla fita (MANIATIS et al., 1989) e a pureza através de relação das absorbâncias medidas em 260 e 280 nm.

3.2.4 Protocolo de Amplificação

Para amplificação de 358 fragmentos do citocromo b ósseo foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores universais, L14816 5'-CCATCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' e H15173 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'. Para cada reação foram utilizados um microtubo tipo eppendorf 0,5ml no qual foi pipetado 2 µl de tampão (Buffer) de PCR 10X (50 mM KCl, 20mM Tris, pH 8,4), 1,6 µl de $MgCl_2$, 1,6 µl de dNTP, 1,0 µl do oligonucleotídeo iniciador L14816, 1 µl do oligonucleotídeo iniciador H15173, 12,6 µl H2O e 0,2 µl de Taq polymerase (Invitrogen).

Tabela 1 – Quantidade de reagentes aplicados em cada microtubo para amplificação do DNA

Materiais	**1 tubo microtubo de 0,5ml**
DNA	2 µl
To 10 x (Buffer)	2 µl
$MgCl_2$	0,6 µl
dNTP	1,6 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Taq	0,2 µl
DMSO	1 µl
H_2O	10,6 µl
Total	**20 µl**

Os tubos com os reagentes foram homogenizados e colocados no termociclador.

Ciclo Empregado:

Para amplificação do material foi utilizado o seguinte ciclo de temperaturas:

Desnaturação inicial: 94º C por 5 minutos.

Desnaturação: 93º C por 40 segundos.

Hibridização: 52º C por 40 segundos.

Extensão: 72º C por 40 segundos.

Este ciclo se repete mais 24 vezes a partir da desnaturação.

Extensão final: 72ºC por 2 minutos.

Ao final do processo a reação é interrompida por esfriamento a 4º C

3.2.5 Análise do produto amplificado

Os produtos originados pela PCR foram dispostos em um gel de agarose a 2% em cuba horizontal com solução tampão TE (Tris-HCl 1,0M; EDTA 0,5M) conjuntamente com um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pares de base, em seguida, submetidos a eletroforese. Foram analisadas alíquotas de 20 µl de cada amostra.

Após a corrida eletroforética, o gel era corado com banho de solução de brometo de etídeo (solução a 0,5 µg/mL) por 30 minutos, lavado em água destilada e observado sob transluminação com luz ultravioleta para visualização das bandas. A documentação fotográfica foi feita com a câmera digital através de analisador de gel.

3.2.6 RFLP Enzimas de Restrição

Para realização da digestão enzimática foram utilizadas três enzimas especificas, Hinf I, AluI, Hae III. A enzima Hinf I isolada da Haemophilus influenzae Rf tem a capacidade de digerir entre as ligações 5'-G ANT C-3' e 3'C TNA G-5' do DNA, a enzima Alu I isolada do Arthrobacter luteus tem a capacidade de digerir entre as ligações 5'-AG CG-3' e 3'-TC GA-5' do DNA, a enzima Hae III isolada do Haemophilus aegypitus tem a capacidade de digerir entre as ligações 5'-GG CC-3' e 3'-CC GG-5' do DNA. Para cada 5 µl do DNA mitocondrial amplificado (amplicom) foram utilizados, 0,5 µl de enzima, 2 µl de tampão e 6,5 µl de água milliQ. Esta solução permaneceu 12 horas em estufa a 37ºC para que ocorresse a digestão completa pelas enzimas.

Tabela 2 – Quantidade de reagentes HinfI, AluI e Hae III utilizados para cada amostra

	Hinf I	*Alu* I	*Hae* III
Amplicom	5µl	5µl	5µl
Enzima	0,5µl	0,5µl	0,5µl
Buffer	2µl	2µl	2µl
H_2O	6,5µl	6,5µl	6,5µl
Total	14µl	14µl	14µl

3.2.7 Gel de Poliacrilamida a 8%

O gel de poliacrilamida foi preparado utilizando uma solução de 40% de acrilamida, 49 µl APS10, 700 µl de tampão TAE (Tris HCL 0,45mM, ácido bórico 0,45mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), 4,9 µl TEMED e 4,9 ml de água estéril. Após a polimerização do gel os produtos do PCR foram aplicados. Os amplicons digeridos pelas enzimas de restrição foram submetidos a separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 8%, utilizando o sistema de eletroforese vertical Bio Rad.

A separação eletroforética foi realizada a 100V por 1 hora, utilizando uma fonte de corrente contínua, modelo Whatman Biômetra model 250 EX.

Tabela 3 – Reagentes e suas quantidades utilizados para a formação do gel de poliacrilamida a 8%

Acril 40%	1,4 ml
TAE 10x	700 µl
H_2O	4,9 ml
APS10	49 µl
TEMED	4,9 µl

3.2.8 Coloração do gel de poliacrilamida utilizando método de Sammons et al. 1981 e Schoenle et al. 1984

Após a separação eletroforética, os géis foram transferidos para recipientes plásticos contendo solução de fixação (10% de etanol absoluto e 5% de ácido acético glacial em água), incubando 4 minutos sob agitação leve (Agitador automático). Em seguida, foi desprezada toda solução de fixação da cuba e substituída por uma solução de impregnação (0,2% de nitrato de prata em água), deixando por 4 minutos em agitação. Após remoção desta solução, foi retirado o excesso, lavando duas vezes com água destilada por 20 segundos sob agitação. Para revelação do gel, foi utilizada solução de hidróxido de sódio a 3% contendo formaldeído a 0,5%, e incubada por 5 minutos sob agitação. O gel revelado foi lavado com água destilada. Para posterior análise, o gel foi desidratado entre duas folhas de papel celofane, em suporte de plástico, tornando-os um registro permanente.

Tabela 4 – Reagentes e suas quantidades utilizados para a coloração do gel de poliacrilamida a 8%

Solução	***Tempo***	***Temperatura***
Fixadora	4 minutos	24º C
Nitrato de Prata	4 minutos	24º C
H_2O dest.	20 segundos	24º C
H_2Odestilada	20 segundos	24º C
Reveladora	10 minutos	24º C
Fixadora	5 minutos	24º C
H_2O dest.	20 segundos	24º C

3.3 Processamento do tecido ósseo para análise histológica

Os ossos cortados de diafise femural foram submetidos a técnica de desgaste preconizada por Ramalho e Daruge (1994). A primeira etapa do processo é o corte do osso utilizando um um disco adiamantado de 7/8 polegadas associada a um mandril de motor odontológico, obtendo-se amostras de 1mm de espessura. Para o desgaste foi utilizado lixa de esmeril, após isso a mostra foi seca sobre pressão e colocada em lâmina de vidro e balsamo canadá.

4 RESULTADOS

Os resultados a seguir serão apresentados em itens, de acordo com as metodologias utilizadas, para os diferentes grupos de amostras, com a intenção de facilitar o entendimento do leitor.

- Avaliação macroscópica dos ossos coletados.
- Avaliação microscópica dos fragmentos ossos colhidos em região diafisária de fêmur.
- Avaliação dos resultados obtidos pela PCR.

Tabela 5 – Animais estudados e número de amostras colhidas

Espécie	*Número de animais*	*Número de Sistemas Harvesianos*	*Número de canais Harvesianos*
Gato	**8**	**122**	**130**
Cão	**8**	**147**	**175**
Eqüino	**1**	**10**	**12**
Bovino	**2**	**37**	**41**
Suíno	**1**	**14**	**16**
Ovino	**3**	**42**	**48**
Bugio	**2**	**34**	**42**
Cachorro do Mato	**2**	**39**	**55**
Gambá	**3**	**30**	**46**
Coelho	**2**	**35**	**63**

4.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DOS OSSOS COLETADOS

4.1.1 Descrição dos ossos intactos

4.1.1.1 Gato

O corpo do fêmur é regularmente cilíndrico, exceto próximo das extremidades, onde é mais largo e comprimido crânio-caudalmente. Ele é fortemente curvado em seus dois terços distais e convexo cranialmente. A face áspera é achatada transversalmente, estreita no meio, e alargando-se no sentido de cada extremidade. Ela é limitada por duas linhas ásperas (lábios lateral e medial), que divergem no sentido das extremidades. O terceiro trocanter é pequeno. Há duas tuberosidades supracondilóides, sendo a medial pequena. O forame nutrício localiza-se no terço proximal da superfície caudal. A cabeça é pouco mais que meia esfera e possui uma fóvea rasa, caudal e lateral ao seu centro. O colo é bem definido. O trocanter maior não se estende tão alto quanto a cabeça; um ressalto espesso corre de sua superfície cranial para o colo. O trocanter menor tem o formato de uma tuberosidade rombuda. A fossa trocantérica é redonda e profunda. Os ressaltos da tróclea são praticamente sagitais na direção e quase semelhantes. A fossa intercondilóide é larga (Figura 1).

Figura 1- A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um felino doméstico

4.1.1.2 Cão

O corpo do fêmur é levemente cônico do sentido crânio-caudalmente, sendo mais evidente o alargamento próximo à epífise distal. Ele é levemente curvado em seus dois terços distais e convexo cranialmente. A face áspera é achatada transversalmente, estreita no meio, e alargando-se no sentido de cada extremidade. O terceiro trocanter é pequeno. A fossa supracondilóide é discreta. Há duas tuberosidades supracondilóides bem evidentes. O forame nutrício localiza-se no terço proximal da superfície caudal. A cabeça apresenta como uma meia esfera. O colo é bem definido. O trocanter maior não se estende tão alto quanto a cabeça e apresenta uma superfície mais arredondada dando um caracte mais arredondado a epífise proximal. A crista intertrocantérica é bem evidente e levemente curva. O trocanter menor tem o formato de uma tuberosidade rombuda. A fossa trocantérica é redonda e mais superficial que a dos gatos. Os ressaltos da tróclea são praticamente sagitais na direção e quase semelhantes. A fossa intercondilóide é mais discreta em relação a dos gatos (figura 2).

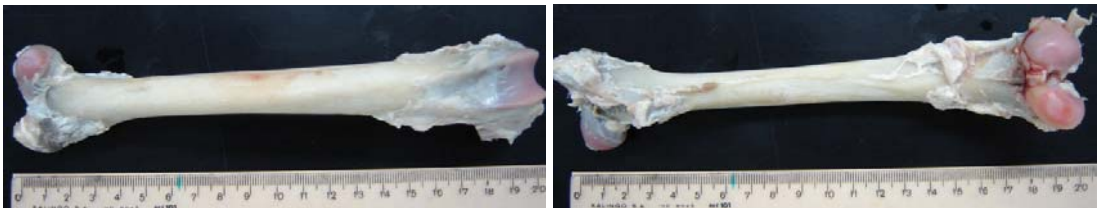

Figura 2 - A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um canídeo doméstico

4.1.1.3 Bovino

O fêmur tem um corpo relativamente pequeno, que é cilíndrico no seu meio e prismático distalmente. O trocanter menor tem a forma de uma tuberosidade rugosa, está situado mais alto do que no cavalo e invade a face caudal.

A crista intertrocantérica une o trocanter menor com o trocanter maior. Falta o terceiro trocanter. A fossa supracondílea é rasa. A extremidade proximal é muito larga. A cabeça é menor do que no cavalo, e a superfície articular estende-se consideravelmente sobre a superfície proximal do colo. A fóvea da cabeça é uma pequena depressão no meio da cabeça para inserção do ligamento da cabeça do fêmur. O colo é bem definido, exceto proximalmente. O trocanter maior é maciço e não dividido; sua face lateral é muito rugosa. A fossa trocantérica é profunda, mas não se estende tão distalmente como no cavalo. A extremidade distal não apresenta características diferenciais muito acentuadas, nas cristas da tróclea são menos oblíquas do que no cavalo e convergem muito ligeiramente em sentido distal (Figura 3).

Figura 3- A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um bovino

4.1.1.4 Suíno

O fêmur tem um corpo relativamente largo e maciço, no qual quatro superfícies podem ser reconhecidas. O forame nutrício principal está situado no terço proximal da superfície cranial. A superfície caudal é larga e está limitada lateralmente por um ressalto que se estende do trocanter maior até a grande tuberosidade supracondilar lateral. Não há nenhuma fossa supracondilar. A cabeça, acentuadamente curva, é demarcada no sentido do lado medial por uma tuberosidade um tanto grande para a inserção do ligamento da cabeça do fêmur. O colo é distinto. O trocanter, maior, embora maciço, não se estende acima do nível da cabeça. A crista intertrocantérica e a fossa trocantérica são semelhantes às do bovino. O terceiro trocanter está ausente. Os ressaltos da tróclea são semelhantes e quase sagitais. As extremidades unem-se ao corpo, aproximadamente, aos três anos e meio de idade (Figura 4).

Figura 4 - A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um suíno

4.1.1.5 Ovino

O corpo do fêmur é ligeiramente encurvado, sendo a convexidade dirigida cranialmente. Uma linha distinta separa as faces lateral e caudal. A fossa supracondílea é muito rasa. A cabeça apresenta uma fóvea rasa e o colo é distinto. O trocanter maior é um pouco mais alto do que a cabeça. As cristas da tróclea são similares e paralelas, mas ligeiramente oblíquas (Figura 5).

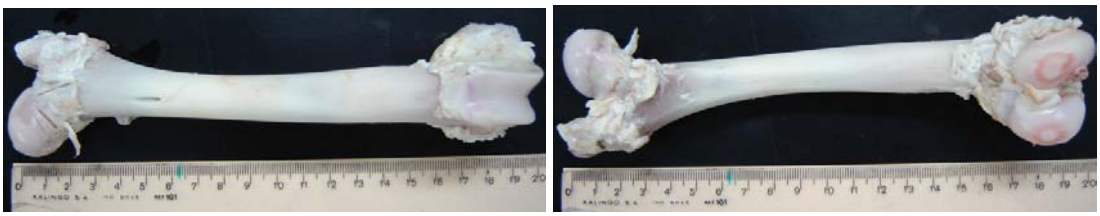

Figura 5 - A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um ovino

4.1.1.6 Bugio

O corpo do fêmur é relativamente longo, com as faces cranial e caudal achatadas em toda a sua extensão, sendo as outras faces convexas.A crista intertrocantérica e discreta e une o trocanter menor com o trocanter maior . Falta o terceiro trocanter. A fossa trocantérica é

rasa. O trocanter maior não se estende tão alto quanto a cabeça; um ressalto espesso corre de sua superfície cranial para o colo. A cabeça é pouco mais que meia esfera. O colo é bem defenido e curto.Os côndilos são bem evidenciados devido ao acinturamento da região proximal a epífise distal. A fossa intercondilar rasa e não se prolonga muito para a face cranial (Figura 6).

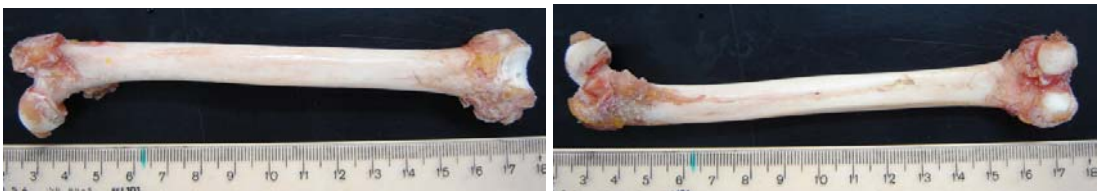

Figura 6 - A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um bugio

4.1.1.7 Cachorro do Mato

O corpo do fêmur é relativamente longo, cilíndrico, exceto nas extremidades, onde é mais longo. Ele é discretamente curvado em seus dois terços distais. A fossa supracondilóide é evidente. Há duas tuberosidades supracondilóides bem evidentes. O forame nutrício localiza-se no terço proximal da superfície caudal. A cabeça apresenta como uma meia esfera pouco evidente. O colo é bem definido e longo em relação ao cão. O trocanter maior fica abaixo da cabeça e apresenta uma superfície mais arredondada. A crista intertrocantérica é discteta. O trocanter menor tem o formato de uma tuberosidade rombuda. A fossa trocantérica é redonda e mais superficial que a dos gatos. Os ressaltos da tróclea são praticamente sagitais na direção e quase semelhantes. A fossa intercondilóide é mais evidente que a dos cães (Figura 7).

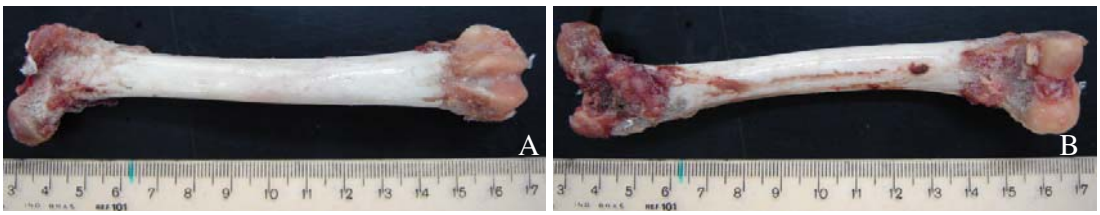

Figura 7 - A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um canídeo silvestre

4.1.1.8 Gambá

O corpo do fêmur é regularmente cilíndrico, exceto próximo a extremidade distal, onde é mais largo e de conformação quadrangular. A face áspera é achatada transversalmente. O forame nutrício localiza-se no terço proximal da superfície caudal. A cabeça é uma meia esfera. O colo é bem definido. O trocanter maior não se encontra acima da cabeça do fêmur, esta estrutura é romba e rugosa e se liga ao trocanter menor. A fossa trocantérica é redonda e profunda. Os côndilos são bem evidenciados devido ao acinturamento da região proximal a epífise distal. A fossa intercondilar rasa (Figura 8).

Figura 8 - A - Vista cranial B - Vista caudal do fêmur de um gambá

4.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DOS OSSOS COLETADOS

4.2.1 Cortes histológicos de fragmentos de osso de diáfise femoral.

4.2.1.1 Gato

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral dos gatos adultos (Figura 9), verifica-se a presença de 5 (±0,6) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do sistema tende a ser mais ovalado do que arredondado e em alguns sistemas observamos uma conformação triangular. Apresenta mais lamelas que no cão porém mais quantidade de osso trabecular entre os osteons. O canal de Havers em proporção ao Sistema Haversiano mantém a harmonia.

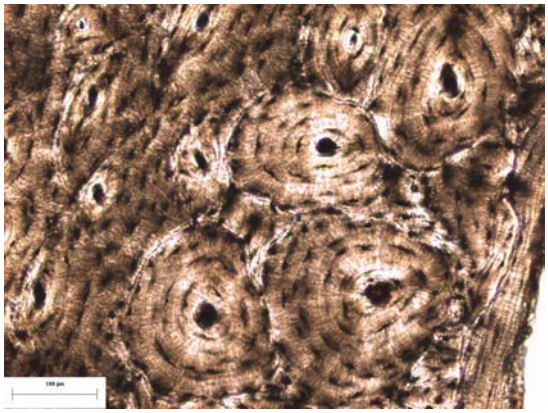

Figura 9 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de felinos, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.2 Cão

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral dos cães adultos (Figura 10), verifica-se a presença de 7 (±0,3) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano, este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao seu redor. A conformação do sistema tende a ser mais arredondado do que ovalado e apresenta poucas lamelas e discreta distribuição de osso trabecular entre os osteons. O canal de Havers em proporção ao Sistema Haversiano é grande.

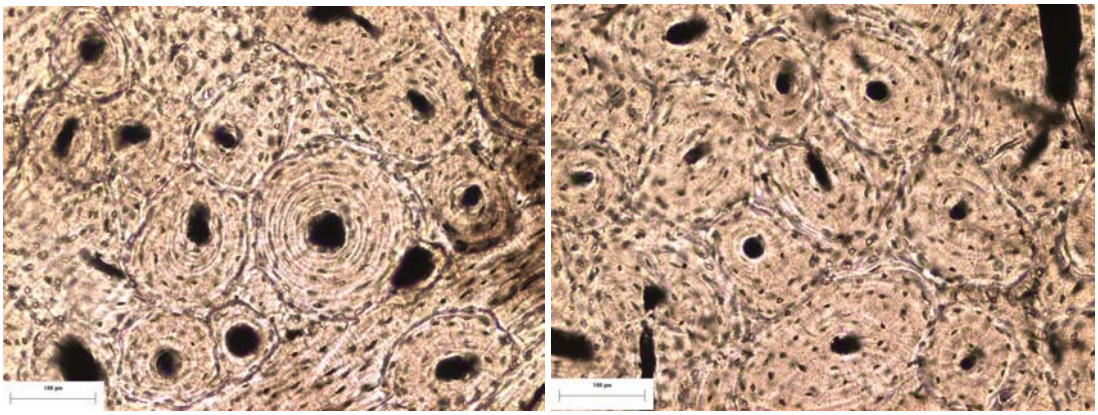

Figura 10 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de cães, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.3 Bovino

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral de bovinos adultos (Figura 11), verifica-se a presença de 6 (±0,8) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do sistema tende a ser mais arredondado do que ovalado, apresenta-se com lamelas mais delgadas que nos eqüinos e o tamanho do sistema menor, porém tem menos quantidade de osso trabecular entre os osteons. O canal de Havers em proporção ao Sistema Haversiano mantém a harmonia.

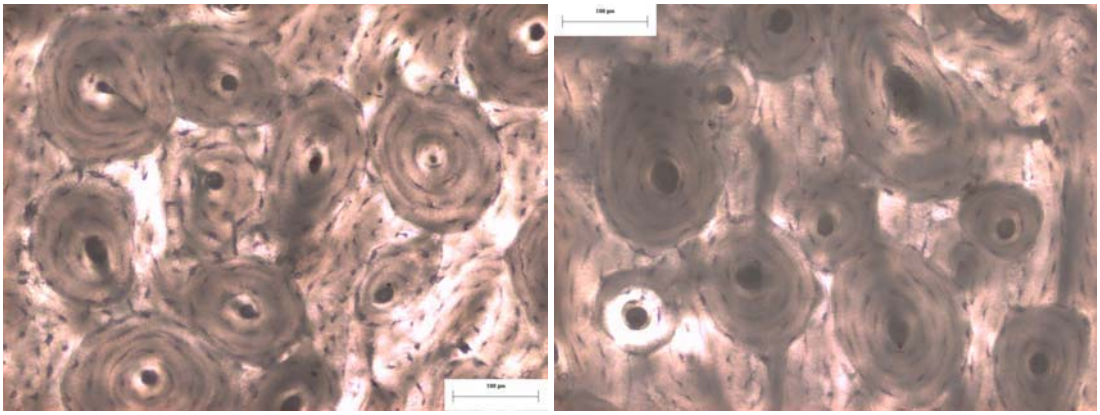

Figura 11 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de bovino, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.4 Suíno

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral do suíno adulto (Figura 12), verifica-se a presença de 5 (±0,3) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de

lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do sistema tende a ser mais arredondado. Há grande presença de canais de Volkmann entre os canais Harvesianos, dificultado a individualização dos sistemas e caracterizar a quantidade de tecido ósseo trabecular.

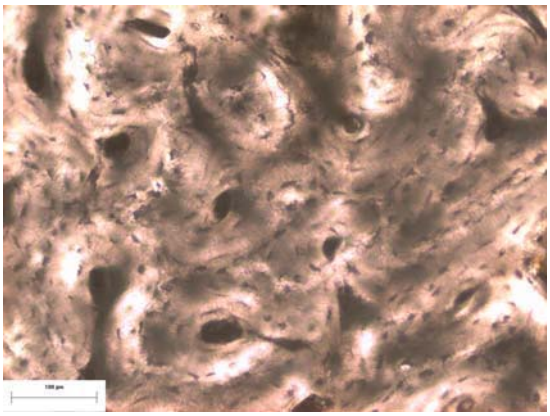

Figura 12 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de suíno, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.5 Ovino

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral de ovinos adultos (Figura 13), verifica-se a presença de 5 (±0,3) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do sistema tende a ser arredondado, apresenta-se com lamelas delgadas como nos bovinos, porém com presença de grande quantidade de canais de Volkmann, o tecido ósseo trabecular é bem evidende. O canal de Havers mantém a harmonia em relação ao Sistema Haversiano.

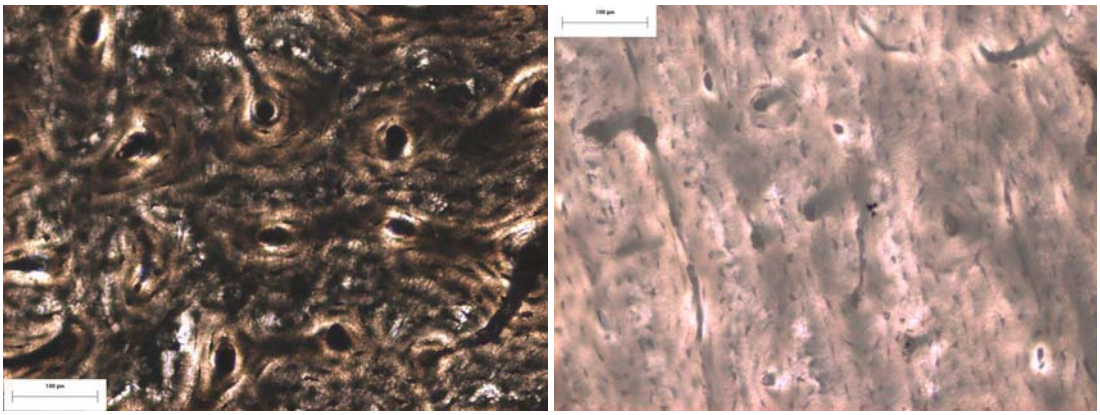

Figura 13 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de ovino, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.6 Bugio

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral dos bugios adultos (Figura 14), verifica-se a presença de 7 canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do sistema tende a ser arredondado, apresenta pouca quantidade de lamelas e discreta quantidade de osso trabecular entre os ósteons. O canal de Havers em proporção ao Sistema Haversiano apresenta relativamente maior.

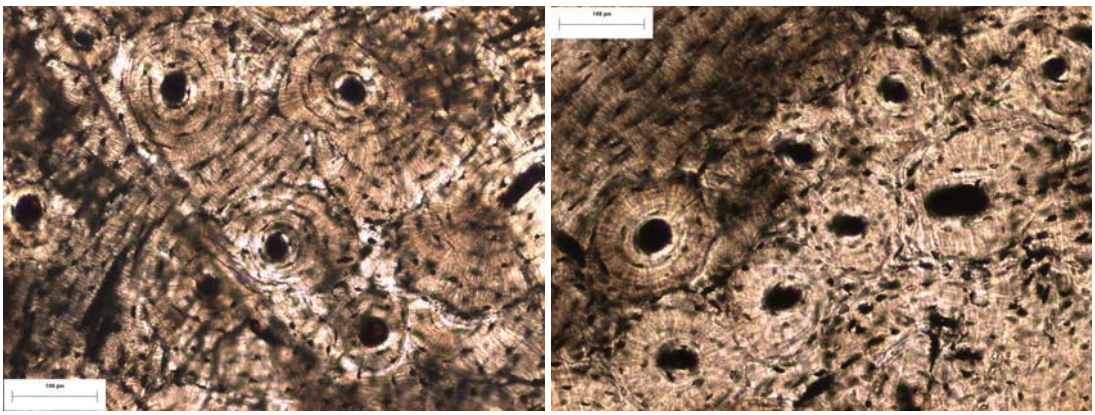

Figura 14 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de bugio, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.7 Cachorro do Mato

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral dos cachorros do mato adultos (Figura 15), verifica-se a presença de 9 (±0,2) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano, este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao seu redor. A conformação do sistema tende a ser mais arredondado do que ovalado porém encontramos sistemas de características poligonais a distribuição de osso trabecular entre os ósteons é moderada. O canal de Havers mantém a harmonia em relação ao Sistema Haversiano.

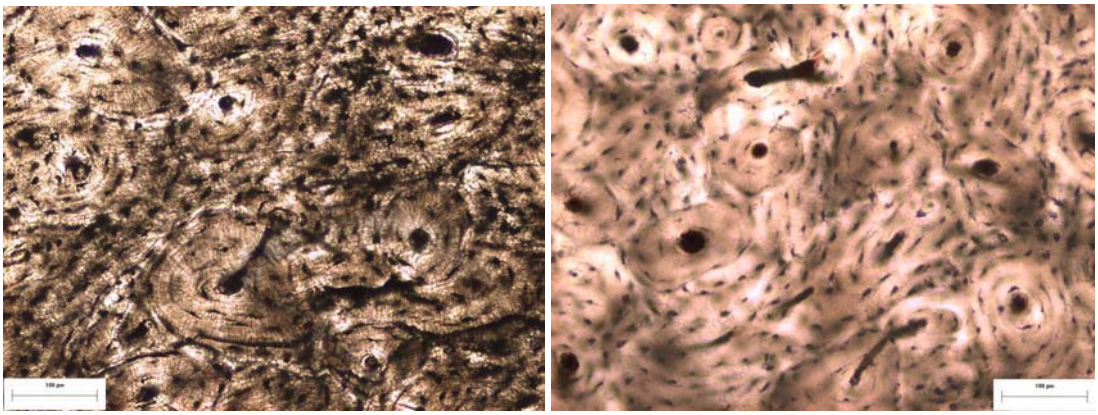

Figura 15 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de cachorro do mato, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.8 Gambá

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral de gambás adultos (Figura 16), verifica-se a presença de 6 (±0,6) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do sistema tende a ser mais arredondado do que ovalado, apresenta-se com poucas lamelas e difícil individualização do sistema, porém temos mais quantidade de osso trabecular entre os osteons. O canal de Havers em proporção ao Sistema Haversiano mantém a harmonia.

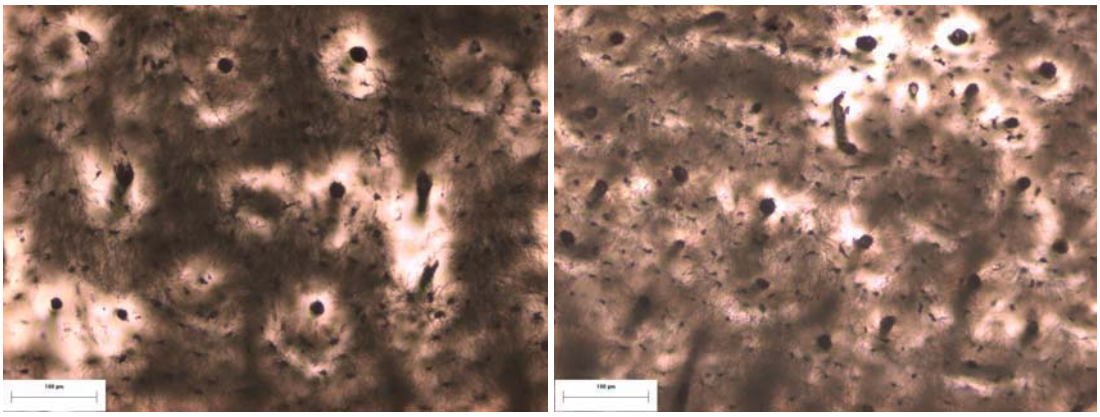

Figura 16 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de gambá, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.1.9 Coelho

Ao corte histológico do tecido ósseo da diáfise femoral de coelhos adultos (Figura 17), verifica-se a presença de 10 (±0,5) canais de Havers em cada campo estudado, sendo estes arranjados na região central do sistema Haversiano. Este sistema apresenta um conjunto de lamelas distribuídas concentricamente ao redor do canal de Havers. A conformação do

sistema tende a ser ovalado, apresenta as mesmas características das lamelas do gambá, porém conseguimos mais facilmente identificar o sistema Haversiano, a quantidade de tecido ósseo trabecular é discreta entre os ósteons. O canal de Havers em proporção ao Sistema Haversiano mantém a harmonia.

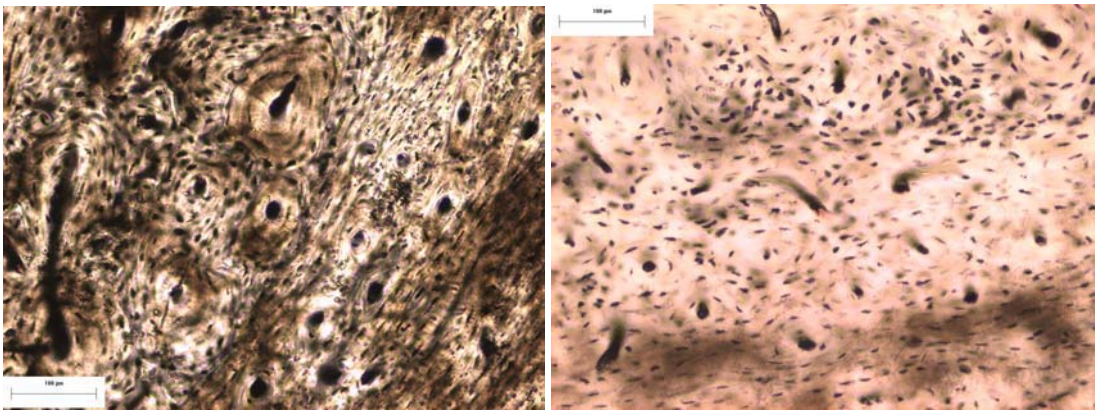

Figura 17 - Corte histológico de fragmento de diáfise femoral de coelho, onde empregamos a técnica de desgaste. Este corte mostrando algumas características dos canais e dos sistemas harvesianos (100 m)

4.2.2 Registros das características histomorfométricas dos ossos

A análise estatistica revelou diferença significante no diâmetro dos sistemas ravesianos entre cães e gatos sendo df=129, r =0,9596 e P<0,001. Em relação a área do canal de Havers observamos df 117, r=0,9956 e P<0,001.

Tabela 6 – Dados estatísticos da área a do canal de Havers e diâmetro do Sistema Haversiano apresentados em forma de tabela

Mensuração	Espécie Animal	
	Gatos	Cães
Área do Sistema Harvesiano	342.35 ± 142.11 (118)	451.29 ± 182.59 (145)*
Diâmetro dos canais de Harvers	155.16 ± 38.67 (132)	155.88 ± 30.10 (143)*

* estatisticamente significante

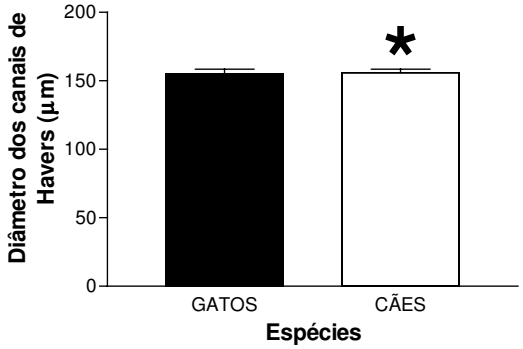

Figura 18 – Diâmetros dos sistemas Haversianos de cães e gatos
* Difere significativamente (P<0,001). Teste t de Student

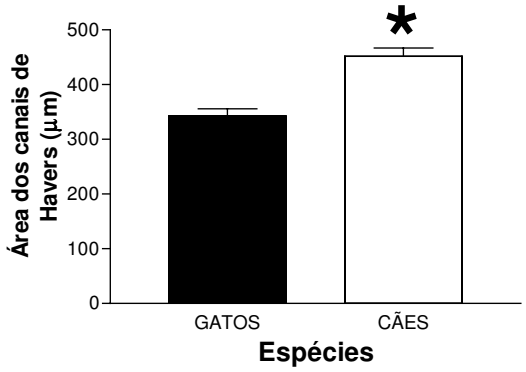

Figura 19 –Área dos canais de Havers de cães e gatos
* Difere significativamente (P<0,001). Teste t de Student

4.3 ANÁLISE DE DNA MITOCONDRIAL

A trituração do material congelado em nitrogênio líquido por um martelo em superfície rígida se apresentou como um método eficiente para a extração de DNA. Isso fica bem ilustrado na tabela 7 que mostra as concentrações e purezas obtidas no DNA usado neste estudo, sendo portando o DNA com características adequadas e em quantidade suficiente para reação de PCR.

Tabela 7 - Quantificação do DNA extraído de osso das diferentes espécies e respectiva avaliação da pureza do DNA obtido

Quantificação do DNA		
Amostra	quantidade	pureza
Gato 01	116 ng/µl	1,5
Gato 02	98 ng/µl	1,5
Gato 03	209 ng/µl	1,7
Gato 04	148 ng/µl	1,6
Gato 05	90 ng/µl	1,5
Gato 06	111 ng/µl	1,6
Gato 07	93 ng/µl	1,5
Gato 08	77 ng/µl	1,5
Cão 01	56 ng/µl	2,0
Cão 02	29 ng/µl	2,0
Cão 03	87 ng/µl	2,0
Cão 04	78 ng/µl	1,96
Cão 05	188 ng/µl	1,85
Cão 06	343 ng/µl	1,85
Cão 07	262 ng/µl	1,83
Cão 08	132 ng/µl	1,85
Veado 01	291 ng/µl	1,68
Veado 02	38 ng/µl	2,25
Veado 03	122 ng/µl	1,52
Cachorro do Mato 01	51 ng/µl	1,91
Cachorro do Mato 02	142 ng/µl	1,8
Bugio 01	131 ng/µl	1,94
Bugio 02	193 ng/µl	1,83
Bovino 01	94	1,93
Bovino 02	40	2,11
Equino	41	2,02
Suíno	259	1,70
Gambá 01	109	1,9
Gambá 02	170	1,87
Gambá 03	127	2,11
Coelho 01	114	1,81
Coelho 02	207	1,73

4.3.1 Produto da amplificação do citocromo B

O DNA dos animais teve o gene mitocondrial do citocromo B amplificado com sucesso conforme ilustra a figura 20.

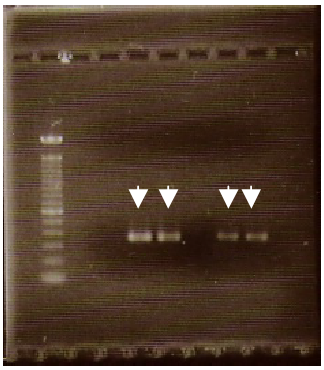

Figura 20 – Produto da amplificação do gene do citocromo B com 358 pb (seta) linha 5, 6, 8 e 9, linha 2 leader de 100 pb

4.3.2 Produtos da Reação enzimática em DNA do citocromo B amplificado

O produto da amplificação do gene do citocromo B foi tratado com 3 enzimas de restrição exibindo um padrão diferente de bandas para cada espécie (Tabela 8).

Tabela 8 – Exibe o tamanho dos fragmentos (em pares de base) gerados pela lise enzimática com as enzimas HinfI, AluI e HaeIII no produto de amplificação do citocromo B

	Hinf I			Alu I			HaeIII		
Gato	45	79	117	48	120	190	74	273	
Cão	55	294		30	85	243	233	125	
Bovino	45	117	196	168	190		74	284	
Suíno	358			115	243		74	131	153
Ovino	55	294		358			74	125	159
Bugio	131	227		358			358		
Cachorro do Mato	54	278		85			358		
Gambá	358			358			152	235	
Coelho	234			358			44	131	153

Na espécie felina (**gato**), foram gerados 3 fragmentos para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 45, 79 e 117 bp, 3 fragmentos para enzima *Alu I*, com peso molecular 48, 120 e 190 pb, 2 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 74 e 273 pb (Figura 21).

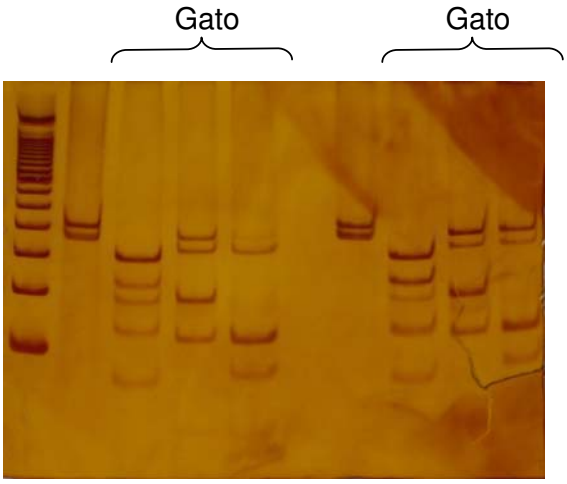

Figura 21 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie felina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

Na espécie canina (**cão**), foram gerados 2 fragmentos para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 55 bp e 294 pb, 3 fragmentos para enzima *Alu I*, com peso molecular 30, 85 e 243 pb, 2 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 233 e 125 pb (Figura 22).

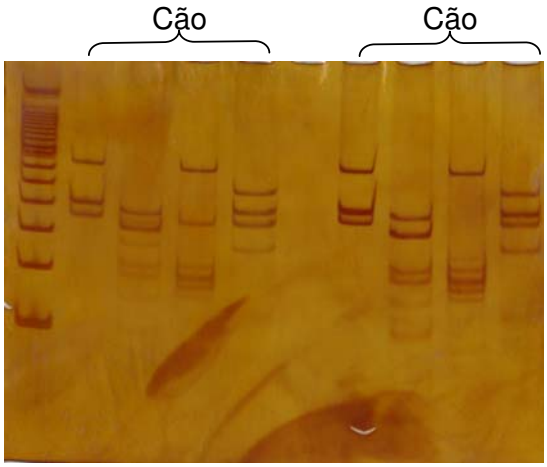

Figura 22 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie canina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

Na espécie bovina (**bovino**), foram gerados 3 fragmentos para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 45, 117 e 196, 2 fragmentos para enzima *Alu I*, com peso molecular 168 e 190 pb, 2 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 74 e 284 pb (Figura 23).

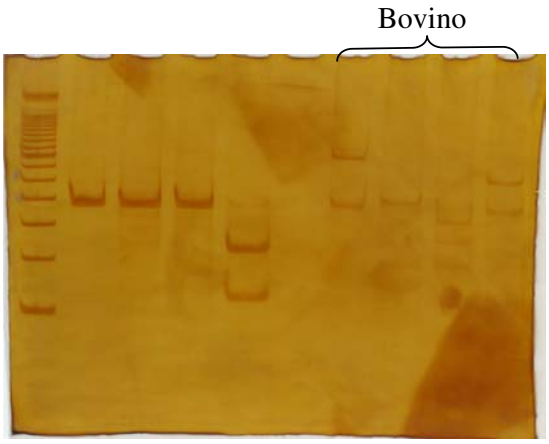

Figura 23 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie bovina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

Na espécie suina (**suíno**), foi gerado 1 fragmento para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 358 pb, 2 fragmentos para enzima *Alu I*, com peso molecular 115 e 243 pb, 3 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 74, 131 e 153 pb (Figura 24).

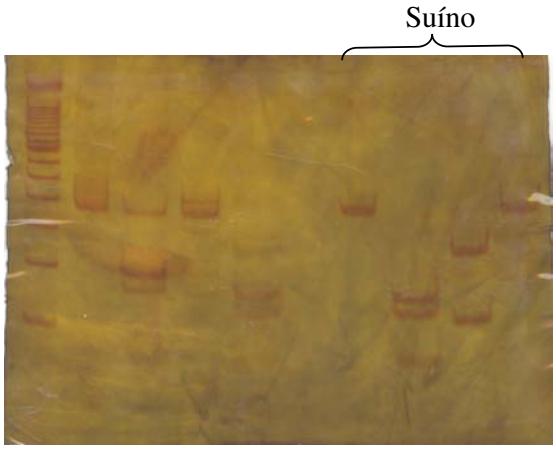

Figura 24 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie suína. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

Na espécie ovina (**ovino**), foram gerados 2 fragmentos para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 64 e 294 pb, 1 fragmento para enzima *Alu I*, com peso molecular 358 pb, 3 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 74, 125 e 159 pb (Figura 25).

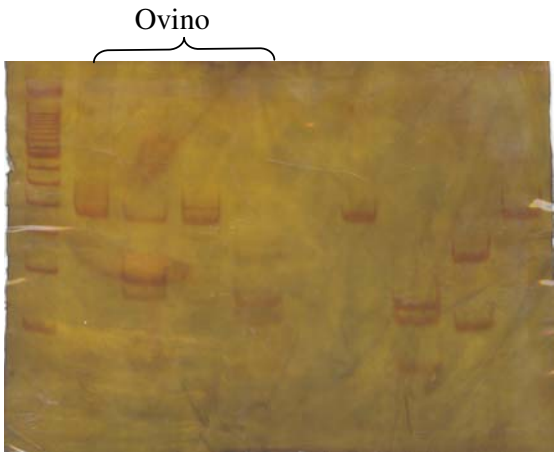

Figura 25 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie ovina. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

Na espécie primata (**bugio**), foram gerados 2 fragmentos para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 131 e 227 pb, 1 fragmento para enzima *Alu I*, com peso molecular 358 pb, 1 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 358pb (Figura 26).

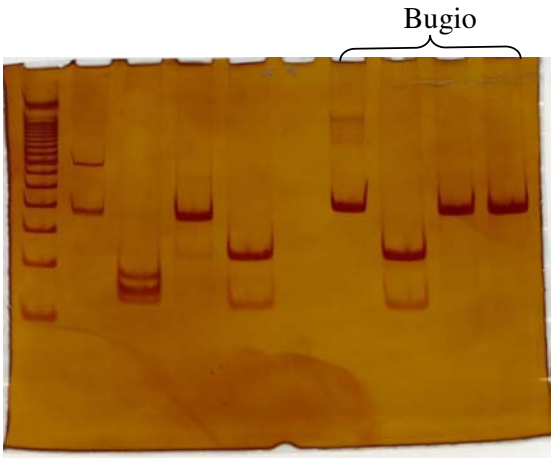

Figura 26 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie primata. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

Na espécie canina (**cachorro do mato**), foram gerados 2 fragmentos para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 54 bp e 278 pb, 1 fragmento para enzima *Alu I*, com peso molecular 85 pb, 1 fragmento para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 358 pb (figura 27).

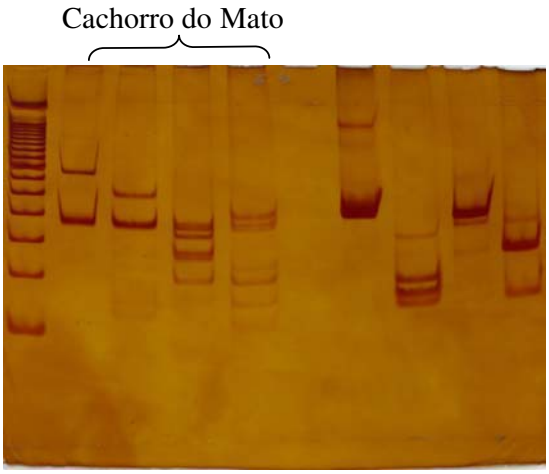

Figura 27 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III no cachorro do mato. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

No gambá foram gerados 1 fragmento para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 358, bp, 1 fragmento para enzima *Alu I*, com peso molecular 358 pb, 2 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 152 e 235 pb (Figura 28).

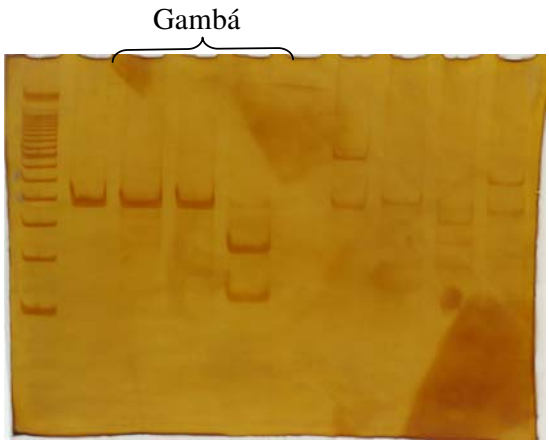

Figura 28 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie gambá. Linha 1, leader 100 pb e nas linhas 2 e 7 produto amplificado sem adição de enzimas de restrição

No leprina (coelho) foram gerados 1 fragmento para enzima *Hinf I*, com peso molecular de 234, bp, 1 fragmento para enzima *Alu I*, com peso molecular 358 pb, 3 fragmentos para a enzima *Hae III*, com o peso molecular 44, 131 e 153 pb (Figura 29).

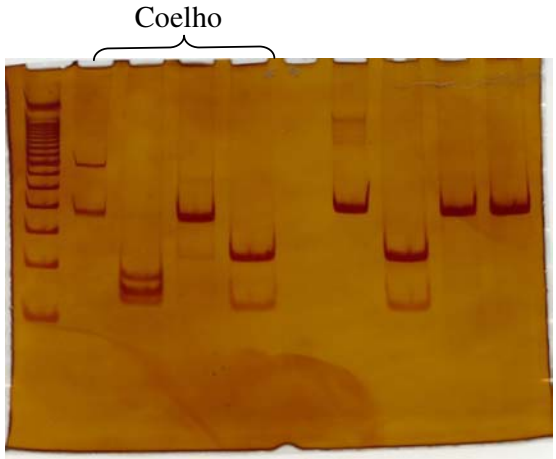

Figura 29 - Gel de Poliacrilamida mostrando o padrão de bandas da digestão do produto do gene do citocromo B na seqüência com as enzimas Hinf I, Alu I, Hae III na espécie leporina

5 DISCUSSÃO

Na medicina legal a identificação de restos humanos tem grande importância para a resolução de casos de desaparecimentos e de acidentes trágicos envolvendo muitas vítimas (CATTANEO et al., 1995; CHILVARQUER, et al., 1987; CORACH et al., 1997; IMAIZUMI; NOGUCHI et al., 2002; IMAIZUMI; SAITOH et al., 2002; LORENTE et al., 2001; MELKI et al., 2001; OLAISEN et al., 1997; PRIMORAC et al., 1996; SOTERIOU, B. et al., 1995; ZEHNER, R. et al., 1998;). Em outras ocasiões só a identificação em humano ou não humano, não é suficiente, como nos casos de adulteração de alimentos de origem animal, identificação da origem, bem como na identificação de animais roubados, raros ou em extinção. Portanto, muitos estudos, tanto de análise filogenética, quanto de aspecto médico legal foram realizados (BRAVI, C.M. et al., 2004; MATSUNAGA, T. et al., 1998; MIROL, P.M. et al., 2002; MURRAY, B.W. et al., 1995; RODRIGUEZ, M.A., et al 2003; SUN,YU-LING; LIN, CHICH-SHENG, 2003; WAN, QIU-HONG; FANG, SHENG-GUO, 2002; WETTON et al., 2002; WOLF; RENTSCH; HÜBNER, 1999).

Nos trabalhos encontrados na literatura a respeito da identificação de animais, a maior parte mostra bons resultados quanto à diferenciação de espécies. A qualidade e a quantidade de material encontrado na cena do crime é um fator limitante para as técnicas de identificação. Nesse sentido, embora existam trabalhos avaliando as características macroscópicas, microscópicas e genéticas, não encontramos em um mesmo trabalho, uma descrição morfológica macroscópica, da microestrutura ou mesmo das diferenciações genéticas. Assim, o presente trabalho visou comprovar, obter e compilar em um só estudo mais informações a respeito da identificação das espécies animais utilizando o tecido ósseo como matéria de pesquisa, uma vez que a maioria dos estudos utiliza amostras de sangue ou

pêlos. Além disso, são raros os dados e relatos dentro da comunidade cientifica brasileira a este respeito.

A escolha do tecido ósseo como matéria de estudo deste trabalho deu-se pela capacidade do tecido manter sua integridade e suas características, por milhares de anos (HAGELBERG; CLEGG, 1991; HOSS et al., 1996; HUMMEL et al., 1999). Uma das justificativas mais relatadas é de que a matriz do tecido ósseo é composta por duas porções, uma orgânica outra inorgânica, o que contribui tanto para conservação da estrutura quanto na preservação de certa quantidade de DNA. Entretanto, faltam estudos mais apurados para se comprovar como a estrutura genética se mantém viável por tanto tempo (CATTANEO et al., 1995; HOCHMEISTER et al., 1991).

A análise antropológica é uma das primeiras ferramentas utilizadas na medicina forense. Quando se encontra um animal, vivo ou morto, com estruturação física normal, a identificação é facilitada. Mas quando encontramos apenas uma peça óssea integra como num caso criminal, devemos ter em mente as características morfológicas e anatômicas.

Conforme a função e o tamanho dos animais, o fêmur apresenta características próprias, sendo possível utilizá-lo para a diferenciação entre espécies. Como primeiro objetivo deste estudo, comparamos a estrutura íntegra do fêmur de 10 animais; gato, cão, cavalo, boi, suíno, ovino, bugio, cachorro do mato, gambá e coelho. As espécies se diferenciam principalmente pela variação de comprimento, espessura e conformação do corpo do fêmur; variação da inserção da cabeça como também variação na sua conformação e posicionamento em relação à tuberosidade maior; tamanho e espessura do colo da cabeça do fêmur; formato e protuberância das cristas intertrocantéricas; presença ou ausência do 3º trocanter; variação da posição do forame nutrício; variação da conformação e posicionamento da fossa intertrocantérica; forma dos trocanters. Somente irão variar

dentro da mesma espécie quando houver alguma alteração patológica local ou sistêmica que comprometa a composição óssea ou vício de trabalho (posicionamento). As características morfológicas de algumas espécies domésticas já foram bem estudadas por Getty, R. et al. (1986) e corroboram com os dados encontrados, porém alguns animais como o bugio, cachorro do mato, gambá e coelho não foram citados em sua obra. Apesar de não encontrarmos relatos anatômicos na literatura sobre estas espécies elas se diferenciam entre si, possibilitando a diferenciação morfológica destes.

Frequentemente, o material a ser analisado não está íntegro ou se encontra modificado por agentes físicos, biológicos ou químicos. Portanto, para identificá-lo faz-se necessário uma avaliação histomorfológica diferencial para cada espécie animal. As referências sobre este assunto são extremamente limitadas e contraditórias, o que mostra a necessidade de realizar um estudo mais amplo e profundo sobre a análise comparativa histomorfológica dos tecidos ósseos (RAMALHO et al., 2003).

Arbenz (1988), Fávero (1993), França (2001) e Calabuig (1998) estudaram características diferenciais entre humanos e não humanos, ressaltando desta forma sua importância nas investigações criminais. O estudo de Owsley et al. (1985) permitiu a diferenciação entre o osso humano e de um veado, enquanto Imaizumi et al. (2002) estudaram os ósteons e os canais de Havers e diferenciaram o tecido ósseo humano de suíno. Porém Remaggi, F. et al. em 1999 conclui em seus estudos que a medição dos sistemas Harvesianos não são bons parâmetros para análise, no que se relaciona a diferenciação entre espécie, pois durante o desenvolvimento, prenhes e lactação as taxas de absorção e remodelação óssea são altas, embora segundo Jowsey[1] (1965 apud IMAIZUMI

[1] JOWSEY, J.; PHIL, D.; KELLY, P.J.; et al. Quantitative microradiographic studies of normal and osteoporotic bone. **J Bone Joint Surg Am**., v. **47, p.** 785–806, 1965.

et al., 2002) a absorção e remodelação são os principais responsável pela diferenciação morfológica dos ossos entre as espécies. Ramalho et al. em 2003 utilizou os osteócitos como parâmetros para a diferenciação entre espécies, mostrando variação quanto a distribuição, quantidade, forma e disposição dentro do ósteon, afirmando ainda que o osteócito não varia sua característica no tecido ósseo lamelar para o trabecular.

Estes dados corroboraram para a segunda parte do estudo onde foi utilizado um fragmento de diáfise femoral de cada espécie, cortado transversalmente e depois submetido à técnica de desgaste, para confecção da lâmina histológica, e a partir daí avaliado o diâmetro do ósteon, a área do canal de Havers e as características morfológicas.

Os dados estatísticos dos diâmetros dos ósteons e a área dos canais de Havers são suficientes para a distinção sem dificuldades entre as espécies cães e gatos, porém por falta de número estatístico suficiente nas outras espécies, não foi possível avaliá-las. As variações morfológicas concordam com as do estudo de Ramalho et al. (2003), confirmando a capacidade de se reproduzir o experimento. Apesar de dados na literatura mostrarem certo grau de dubiedade quanto à utilização da análise morfológica e morfométrica para caracterização das espécies, o presente trabalho vem mostrar que podemos utilizar esta metodologia em diáfise de ossos longos com certa segurança.

Em medicina legal qualquer amostra óssea disponível pode ser utilizada para extração de DNA mitocondrial. Optou-se em trabalhar com ossos compactos (fêmur), pois estes conservam mais o DNA da célula, devido à proteção pela matriz óssea calcificada, presente em maior quantidade neste tipo ósseo (HOCHMEISTER et al., 1991; HOCHMEISTER et al., 1998).

Um cuidado especial foi direcionado para o problema potencial da contaminação, durante o estudo da análise de DNA a partir de osso. Um procedimento de limpeza

macroscópica das amostras de fragmentos ósseos é fundamental para se evitar contaminações mais grosseiras, como por exemplo, terra, tecidos liquefeitos contendo fungos e bactérias em grande proporção (HOCHMEISTER et al., 1991; HOCHMEISTER et al, 1998). Vários outros procedimentos são citados na literatura (HOCHMEISTER et al., 1998). Neste trabalho, foi utilizado o álcool 70% para limpeza externa dos fragmentos ósseos, por ser este, o degermante de menor custo, de fácil obtenção, não caotrópico, baixa toxicidade e o mais recomendado para esta finalidade (FISHER et al., 1993).

Além desses cuidados de prevenção às contaminações, para o controle de qualidade e critérios de autenticidade do DNA, foram seguidas as recomendações de Alonso et al. (2001), Crouse et al. (2001), Kalmar et al. (2000) e Hanidt et al. (1994), e. Esses incluem a separação física obrigatória entre o laboratório onde o DNA é extraído e a amplificação é preparada do restante dos laboratórios, além de medidas de precaução para se evitar a contaminação, como a limpeza de equipamentos, luvas, etc.

Para pulverização dos ossos elegeu-se o método de pulverização por impacto criogênico, utilizando nitrogênio líquido que utiliza um martelo e uma estrutura rígida de impacto. Este método apresenta um menor custo, fácil execução e não precisa de instrumentos especiais, apenas o recobrimento da amostra por um papel alumínio.

O método de extração do material genético utilizado no estudo foi o Orgânico segundo Miniatis et al. (1989) que utiliza o detergente SDS para desestabilizar as membranas plasmáticas, proporcionando a liberação do material contido no núcleo e a ação enzimática inespecífica da proteinase K nas proteínas. Possui uma etapa específica de purificação, a qual se utiliza uma solução de fenoiclorofórmio-álcool isoamílico, capaz de remover as impurezas contidas no extrato, como proteínas, restos celulares e lípides. Além do procedimento específico de purificação, este método contribui ainda mais para

purificação do DNA com a precipitação e lavagem alcoólica. É um método de extração de DNA robusto, amplamente utilizado pela comunidade científica e que tem aplicações para extração de DNA em outros tipos de amostras como sangue total e tecidos moles (COMEY, et al., 1994). Segundo Alves et al. (2000) o método de extração orgânica mostrou excelente eficiência para as amostras de tecido ósseo de corpos carbonizados e esqueletizados e putrefeitos, por isso sendo o método de primeira escolha. Esta afirmação pode ser comprovada através de tabela 7 que nos mostra a quantidade de DNA mitocondrial extraído e o seu grau de pureza.

Nos trabalhos encontrados na literatura sobre estudos filogenéticos e conservacionistas, o citocromo B é utilizado em grande escala (HSIEH et al., 2000). Esta grande utilização é justificada pela grande variação genética do DNA mitocondrial se comparada com o material genético do núcleo, além de serem transmitidos apenas pela linhagem genética materna e está presente em cada mitocôndria dentro da célula. Para amplificação do fragmento de DNA mitocondrial que estamos estudando foi utilizado dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, L14816 5'-CCATCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' e H15173 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' que selecionou um fragmento de 358 pb.

O processo de amplificação aconteceu com grande sucesso em todas as amostras. Foi observado grande especificidade na seleção e amplificação do DNAmt conforme podemos observar na figura 20. A amplificação foi feito como preconizado por Bravi et al., porém com algumas mudanças. Os resultados de amplificação e digestão do DNA obtidos foram iguais ao estudo citado.

A utilização de enzimas de restrição na identificação de espécies é uma técnica nova que está sendo utilizada no esclarecimento da origem filogenética do animal como no caso

de Bos tauros e Bos indicus (RIPAMONTE et al., 2002), raças de eqüinos (MIROL; GARCIA; DULOUT, 2002; MIROL; GARCIA; VEJA-PLA, 2002), e na caracterização de amostras humanas ou não humanas (IMAIZUMI et al., 2004). Muitos trabalhos utilizam o citocromo b como base de pesquisa, porém a maioria deles utiliza micro satélites de DNA ou seqüenciamento para a identificação de espécies (BELLIS et al., 2001; IAMIZUMI et al., 2002; PARSON et al., 1999). Apenas alguns autores relatarem a utilização de um par de primers para amplificação de DNA do citocromo b mitocondrial para identificação da falsificação dos produtos de origem animal ou na identificação de espécies com a utilização de enzimas de restrição (BRAVI et al., 2004; WOLF; RENTSCH; HÜBNER, 1999). Wolf, Rentsch e Hübner (1999) apresentaram pela primeira vez um estudo no qual foi utilizada uma seqüência de 464 pb do DNA do citocromo b mitocondrial e 11 enzimas de restrição (Alu I, AseI, BamHI, HaeIII, HincII, HinfI, MseI, NlaIII, RsaI, SspI e TaqI). Os autores obtiveram uma seqüência muito vasta de fragmentos possibilitando a individualização de 25 espécies. Bravi et al. em 2004 utilizou uma seqüência de 358 pb DNA do citocromo b mitocondrial e utilizou 3 enzimas (HinfI, AluI e HaeIII), conseguindo individualizar as 13 espécies estudadas.

A identificação das espécies através do RFLP teve com base os estudos realizados por Bravi et al., em 2004 e foi possível reproduzir o seu experimento, incluindo ainda algumas espécies não estudadas por ele.

O PCR-RFLP se mostrou extremamente confiável devido a grande variação na altura de quebra das enzimas dentro do DNA mitocondrial, a utilização de mais de uma enzima aumenta a especificidade em relação à determinação da espécie, porém o aumento do número de enzimas de restrição na metodologia deixa o procedimento mais oneroso.

Foram encontradas, em algumas espécies, bandas extras acima do limite de 358 pb. O aparecimento destas bandas pode ser explicado por uma digestão parcial do primer por algumas enzimas. Outra explicação que podemos ter é a co-amplificação de pseudogenes, que são encontrados comumente no DNA mitocondrial (WOISCHNIK; MORAES, 2002).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia celular na área da reprodução e a criação de clones a partir de DNA de célula de um indivíduo adulto, utilizando como substrato um oócito enucleado, podemos ter indivíduos que apresentem o DNA nuclear do ser clonado, porém apresentam o DNA mitocondrial do ser que doou o oócito, podendo assim alterar a característica genética desse ser e interferir na identificação da espécie, prejudicando a analise forense.

6 CONCLUSÕES

Ao avaliar os três métodos de identificação médico-legal para as espécies animais, pôde-se concluir que:

1 – A técnica antropomorfológica pode ser utilizada com grande sucesso quando encontramos o osso femoral intacto.

2 – A utilização de métodos histomorfométricos de ósteons e canais de Havers são de grande valia quando temos fragmentos ósseos que não sabemos a espécie.

3 – O tecido ósseo é uma grande fonte de reserva de material genético viável.

4 – A utilização do PCR-RFLP é um método de grande valia não só para identificação das espécies domésticas, como também para algumas espécies selvagens.

5 – O PCR-RFLP é o método mais rápido e confiável para a identificação de espécies animais

6 – Cada técnica tem sua importância quanto a diferenciação entre as espécies, porém o uso concomitante de duas ou mais técnicas garantem maior segurança e maior confiabilidade no resultado.

REFERÊNCIAS

ALONSO, A.; MARTIN, P.; ALBARRAN, C.; GARCIA, P.; GARCIA, O.; SIMON, L. F.; GARCIA-HIRSCHFELD, J.; SANCHO, M.; RUA, C.; FERNADEZ-PIQUERAS, J. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. **Forensic Science International**, v. 139, p. 141-149, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEUS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3th ed. New York: Gariand publishing, 1994. 1294 p.

ARBENZ, G. O. **Medicina legal e antropologia forense**. Rio de Janeiro: Ateneu. 1988. p. 199-206.

ANDERSON, S.; BANKIER, A. T.; BARRELL, B. G.; BRUIJN, M. H. L.; COULSON, A. R.; DROUIN, J.; EPERON, I. C.; NIERLICH, D. P.; ROE, B. A.; SANGER, F; SCHREIER, P. H.; SMITH, A. J. H.; STADEN, R.; YOLING, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457-465, 1981.

BANKS, W.J. ***Histologia Veterinária Aplicada.*** Editora Manole 2ª Ed. 1991.

BELLAGAMBA, F.; MORETTI, V. M.; COMINCINI, S.; VLAFRÈ, F. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorfhism analysis of mitochondrial DNA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3775-3781, 2001.

BELLIS, C.; ASHTON, K. J.; FRENEY, L.; BLAIR, B.; GRIFFITHS, L. R. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. **Forensic Science International**, v. 134, p. 99-108, 2003.

BOTTERO, M. T.; CIVERA, T.; NUCERA, D.; ROSATI, S.; SACCHI, P.; TURI, R. M. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats` and sheep's milk in dairy products**.** **International Dairy Journal**, v. 13, p. 277-282, 2003.

BRAVI, C. M.; LIRON, J. P.; MIROL, P. M.; RIPOLI, M. V.; PERAL-GARCIA, P.; GIOVAMBATTISTA, G. A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. **Legal Medicine**, v. 6, p. 246-251, 2004.

CALABUIG, J. A. G. **Medicina legal y toxicología**. 4. ed. Masson: Ediciones Científicas y Técnicas, 1998. p. 1016.

CATTANEO, C.; SMILLIE, D. M.; GELSTHORPE, K.; PICCININI, A.; GELSTHORPE, A. R.; SOKOL, R. J. A simple method for extracting DNA old skeletal material. **Forensic Sciences International**, v. 74, p. 167-174, 1995.

CHILVARQUER, I.; KATZ, J. O.; GLASSMAN, D. M.; PRIHODA, T. J.; COTTONE, J. A. Comparative radiographic study of human and animal long bone patterns. **Journal of Forensic Sciences**, v. 32, n. 6, p. 1645-1654, 1987.

CORACH, D.; SALA, A.; PENACINO, G.; IANNUCI, N.; BERNARDI, P.; DORETTI, M.; FONDEBRIDER, L.; GINARTE, A.; INCHAURREGUI, A.; SOMIGUANA, C.; TURNER, S.; HAGELBERG, E. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: the search for "missing" persons killed during the last dictatorship in Argentina. **Eletrophoresis**, v. 18, p. 1608-1612, 1997.

CROUSE, C. A. Implementation of forensic DNA analysis on casework evidence at the Paim Beach County Sheriff's office crime laboratory: Hístorical Perspective**. Croat. Med. J**., v. 42, p. 247-251, 2001.

FAVERO, F. **Medicina Legal: introdução ao estudo da medicina legal, identidade, traumatologia, infortunística, tanatologia**. 9. ed. São Paulo: Martins Fontes, 1993. p. 63-67.

FRANÇA, G. V. **Medicina legal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. [416] p.

FREDHOM, M.; WINTER, A. K. Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the Canidae family. **Mammalian Genome**, n. 6, p. 11-18, 1995.

GABRIEL, M. N.; HUFFINE, E. F.; RYAN, J. H.; HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Improved MtDNA Sequence analysis of forensic remains using a “mini-primer set” amplification strategy. **Journal Forensic Science**, v. 46, n. 2, p. 247-253, 2001.

GETTY, R. **Sisson/Grossman: anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2 v.

HAGELBERG, E.; CLEGG, J. B. Isolation and characterization of DNA from archaelogical bone. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 244, p. 45-50, 1991.

HSIEH, H.; CHIANG, H.; TSAI, L.; LAI, S.; HUANG, N.; LINACRE, A.; LEE, J. C. Cytichrome b gene for species identification of the conservation animals. **Forensic Sciences International**, v. 122, p. 7-18, 2001.

HOCHMEISTER, M. N.; BUDOWLE, B.; BORER, U. V.; EGGMANN, U.; COMEY, C. T.; DIRNHOFER, R. Typing of deoxyribonucieic acid (DNA) extracted form compact bone from human remains. **Journal Forensic Science**, v. 36, p. 1649-661, 1991.

HOCHMEISTER, M. N.; BUDOWLE, B.; BORER, U. V.; RUDIN, O.; BOHNERT, M.; DIRNHOFER, R. Confirmation of the identify of human skeletal remains using multiplex PCR amplification and typing kits. **Journal Forensic Science**, v. 40, p. 701-705, 1994.

HOSS, M.; JARUGA, P.; ZASTAWNY, T. H.; DIZDAROGLU, M.; PAABO, S. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. **Nucleic Acids Res**., v. 24, p. 1304-1307, 1996.

HUMMEL, S.; SCHULTES, T.; BRAMANTI, B.; HERRMANN, B. Ancient DNA profiling by megaplex amplications. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1717-1721, 1999.

IMAIZUMI, K.; NOGUCHI, K.; SHIRAISHI, T.; SEKIGUCHI, K.; SENJU, H.; FUJII, K.; YOSHIDA, K.; KASAI, K.; YOSHINO, M. DNA typing of bone specimens-the potential use of the profiler test as a tool for bone identification. **Legal Medicine**, v. 4, p. 251-256, 2002.

IMAIZUMI, K.; SAITOH, K.; SEKIGUCHI, K.; YOSHINO, M. Identification of fragmented bones based on anthropological and DNA analyses: case report. **Legal Medicine**, v. 4, p. 251-256, 2002.

JEFFREYS, A. J.; BROOKFIELD, J. F. Y.; SEMEONOFF, R. Positive identification of immigration test-case using human DNA fingerprints. **Nature**, v. 317, p. 818-819, 1985.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:_____,_____. **Histologia básica.** 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1990, p. 101-109.

KAGAWA, M.; MATSUBARA, K.; KIMURA, K.; SHIONO, H.; FUKUI, Y. Species identification by the positional analysis of fatty acid composition in triacylglyceride of adipose and bone tissue. **Forensic Sciences International**, v. 79, p. 215-226, 1996.

KALMAR, T.; BACHIRATI, C. Z.; RASCO, I. A simple and efficient methods for amplifiabie DNA extraction from ancient bones. **Nucieic Acids Res**., v. 28, p. 1-4, 2000.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proc. Natl. Acad. Sciences**, v. 86, p. 6196-6200, 1989.

LOCKE, M. Structure of long bones in mammals. **Journal of Morphology**, v. 262, p. 546-565, 2004.

LORENTE, J. A.; ENTRADA, C.; ALVAREZ, C.; ARCE, B.; HEINRICHS, B.; LORENTE, M.; CARRASCO, F.; BUDOWLE, B.; VILLANUEVA, E. Identification of missing persons: the Spanish "Phoenix" Program. **Croat. Med. J**, v. 42, p. 26770, 2001.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular clonning**: a laboratory mannual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: SOLÉ-CAVA, A. M. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto-SP: Holos, 2001. p. 153-161.

MATSUNAGA, T.; CHIKUNI, K.; TANABE, R.; MUROYA, S.; SHIBATA, K.; YAMADA, J.; SHINMURA, Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. **Meat Science**, v. 51, p. 143-148, 1999.

MELKI, J. A. D.; MARTIN, C. C. S.; SIMÕES, A. L. Procedimentos em exumações para investigação de vínculo genético em ossos. **Revista de Saúde Públíca**, v. 35, p. 368-374, 2001.

MENOTTI-RAYMOND, M.; DAVID, V. A.; STEPHENS, J. C.; LYONS, L. A.; O´BRIENE, S. J. Genetic individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic applications. **Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 6, p. 1039-1051, 1997.

MENOTTI-RAYMOND, M.; DAIVID, V. A.; STEPHENS, J. C.; LYONS, L. A.; O`BRIEN, S. J. Genetic Individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic applications. **Journal of Forensic Sciences**, v, 42, n. 6, p. 1039-1051, 1997;

METZ, L. N.; MARTIN, B.; TURNER, A. S. Histomorphometric analysis of the effects of osteocyte density on osteonal morphology and remodeling. **Bone**, v. 33, p. 753-759, 2003.

MIROL, P. M.; GARCIA, P. P.; DULOUT, F. N. Mitochondrial variability in D-loop of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis. **Genetic and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 25-28, 2002.

MIROL, P. M.; GARCIA, P. P.; VEGA-PLA, J. L. Phylogenetic relationships of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. **Animal Genetics**, v. 33, p. 356-363, 2002.

MULHERN, D. M.; UBELAKER, D. H. Differences in osteon banding between human an nohuman bone. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 2, p. 220-222, 2001.

MULHERN, D. M.; UMBELAKER, D. H. Differences in osteon banding between human and nohuman bone. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 2, p. 220-222, 2001.

MURRAY, B. W.; MCCLYMONT, R. A.; STROBECK, C. Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA. **Journal of Forensic Sciences,** v. 40, n. 6, p. 943-951, 1995.

OLAISEN, B.; BAR, W.; BRINMANN, B.; BUDOWLE, B.; CARRACEDO, A.; LINCOI-N, P.; MAYR, W.R.; RAND, S. DNA recommendations 1997 of the International Society for Forensic Genetics**. Vox Sang**., v. 74, p. 61-63, 1998.

OWSLEY, D. W.; MIRES, A. M.; KEITH, M. S. Case involving differentiation of deer and human bone fragment**. Journal of Forensic Science**, v. 30, n. 2, p. 572-578, 1985.

PARSON, W.; PEGORARO, K.; NEIDERSTÄTTER, H.; FÖGER, M.; STEINLECHNER, Species identification by means of the cytochrome b gene. **International Journal of Legal Medicine**, v. 114, p. 23-28, 2000.

PFEIFFER, I.; VOLKEL, I.; TÄUBERT, H.; BRENIG, B. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. **Forensic Science International**, v. 141, p. 149-151, 2004.

PRIMORAC, D.; ANDELINOVIC, S.; DEFINI-GOJANOVIC, M.; DIRMIC, L.; REZIC, B.; BADEN, M. M.; KENNEDY, M. A.; SCHANFIELD, M. S.; SKAKEL, S. B.; LEE, H. C. Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia, and Herzegovina by the use of standard forensic methods and DNA typing. **Journal of Forensic Science**, v. 41, p. 8911-8914, 1996.

RAMALHO, S. A.; DARUGE, E. A. **Importância pericial do estudo comparativo histomorfológico do esmalte, dentina e cemento de dentes humanos e de outros animais.** 1994. [82] p. Dissertação (Mestrado em Odontologia legal e Deontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 1994.

REMAGGI, F.; CANÈ, V.; PALUMBO, C.; FERRETTI, M. Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species. I. Woven-fibered and parallel-fibered bones**. Italian Journal Anatomy Embryology**, v.103, n. 4, p. 145-155, 1998.

RODRIGUEZ, M. A.; GARCIA, T.; GONZALEZ, I.; ASENSIO, L.; MAYORAL, B.; LOPEZ-CALLEJA, I.; HERNANDEZ, P. E.; MARTIN, R. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1524-1529, 2003.

SALVOLAINEN, P.; LUNDEBERG, J. Foresic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs. **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, n. 1, p. 77-81, 1999.

SALVOLAINEN, P.; ROSEN, B.; HOLMBERG, A.; LEITNER, T.; UHLEN, M.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use. **Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 4, p. 593-600, 1997.

SAVOLAINEN, P.; ROSÉN, B.; HOLMBERG, A.; LEITNER, T.; UHLÉN, M.; LUMDEBERG, J. Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forencic use. **Journal of Forensic Sciences**, p. 42, n. 4, p. 593-600, 1997.

SILVA, P. **Vocabulário jurídico**. Rio de Janeiro: Editora Forense, 1998. 1498 p.

SOTERIOU, B.; FISHER, R. A.; KHAN, I. M.; KESSLING, A. M.; ACHARD, L. C.; BULUWELA, L. Conserved gene sequences for species identification: PCR analysis of 3`UTR of the SON gene distinguishes human and other mammalian DNAs. **Forensic Sciences International**, v. 73, p. 171-181, 1995.

SUN, Y.; LIN, C. Establishment and application of fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)method for identifying porcine, caprine and bovine meats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1771-1776, 2003.

WAN, Q.; FANG, S. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification. **Forensic Science International**, v. 131, p. 75-78, 2003.

WETTON, J. H.; HIGGS, J. E.; SPRIGGS, A. C.; RONEY, C. A.; TSANG, C. S. F.; FOSTER, A. P. Mitochondrial profiling of dog hairs. **Forensic Science International**, v. 133, p. 235-241, 2004.

WETTON, J. H.; TSANG, C. S. F.; RONEY, C. A.; SPRIGGS, A. C. An extremely sensitive species-specific ARMS PCR test for the presence of tiger bone DNA. **Forensic Science International**, v. 126, p. 137-144, 2002.

WOLF, C.; RENTSCH, J.; HÜBNER, P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1350-1355, 1999.

WURMB-SCHWARK, N.; HARBECK, M.; WIESBROCK, U.; SCHROEDER, I.; RITZ-TIMME, S.; OEHMICHEN, M. Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially age bones. **Legal Medicine**, v. 5, p. S169-S172, 2003.

YAO, Y.; BRAVI, C. M.; BANDELT, H. A call for mtDNA data quality control in forensic science. **Forensic Science International**, v. 141, p. 1-6, 2004.

ZEHNER, R.; ZIMMERMENN, S.; MEBS, D. RFLP and sequence analysis of the cytocrhome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. **International Journal of Legal Medicine**, v. 111, p. 323-327, 1998.