

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA
SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL

TÁLIA MISSEN TREMORI

Botucatu – SP

Julho 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA
SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL

TÁLIA MISSEN TREMORI

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e ao Programa de “Salud em Desarrollo en los Trópicos” para obtenção do título de Doutor em regime de cotutela com a Universidad de Salamanca, España.

Orientadora: Prof^a Dr^a Noeme Sousa Rocha
FMVZ – UNESP – Botucatu

Orientador: Prof. Dr. Julio López-Abán
Facultad de Farmácia – USAL - Salamanca

Coorientadora: Prof^a Dr^a Cintia Fridman

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Fernández Soto

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Tremori, Tália Missen.

Identificação criminal de espécies da fauna silvestre
por DNA mitocondrial / Tália Missen Tremori. - Botucatu,
2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Noeme Sousa Rocha
Coorientador: Cintia Fridman
Coorientador: Pedro Fernández Soto
Capes: 50502000

1. Medicina legal. 2. Zoonoses. 3. Animais silvestres.

Palavras-chave: Ciências forenses; Crimes contra a fauna;
Saúde única; Zoonoses.

Nome do Autor: Tália Missen Tremori

Título: IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE POR
DNA MITOCONDRIAL

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Noeme Sousa Rocha

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -
Unesp – Botucatu/SP

Prof. Dr. Julio López Abán

Orientador

Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola
- Facultad de Farmacia – Universidad de Salamanca – Salamanca/Espanha

Prof. Dr. Eduardo Massad

Membro Titular

Departamento de Medicina Legal - Faculdade de Medicina - USP – São Paulo/SP

Dra. Angela Maria Branco

Membro Titular

Diretoria de Defesa e Vigilância Ambiental da Secretaria Municipal de Segurança Urbana
- Prefeitura Municipal de São Paulo – São Paulo/SP

Prof. Dr. Antonio Juan García Fernández

Membro Titular

Ciencias Sociosanitarias - Área de Toxicología - Facultad de Veterinaria - Universidad de
Murcia /Espanha

Profa. Dra. Ana Cristina Tasaka

Membro Suplente

Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Paulista – São José dos Campos/SP

Profa. Dra. Selene Daniela Babboni

Membro Suplente

Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Paulista – São José dos Campos/SP

Dra. María Belén Vicente

Membro Suplente

Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología, Edafología y Química Agrícola

- Facultad de Farmacia – Universidad de Salamanca – Salamanca/Espanha

Data de Defesa da Tese: 19 de julho de 2018.

Dedico esta tese a minha mãe Fátima, por me ensinar a nunca desistir dos objetivos.

Dedico a obtenção da cotutela à minha avó Carmen, filha de imigrantes espanhóis.

Aos animais.

Agradeço por toda a motivação para seguir essa jornada de estudos ininterrupta, que embora tenha muitos coautores não poderia deixar de agradecer toda espiritualidade que me acompanhou nestes anos, sendo fortalecida em momentos como a realização do “Camino de Santiago de Compostela”.

Agradeço pela oportunidade de estudar, de ensinar e aprender continuamente, de ao longo do doutorado ter a oportunidade de conhecer novas culturas, países, idiomas, povos e civilizações, acima de tudo, aprender mais sobre a humanidade.

Aos meus pais Denis e Fátima, que não mediram esforços pela educação dos filhos. Ao meu irmão Flávio, por ser um companheiro, fiel, melhor amigo e acima de tudo bom ouvinte e excelente conselheiro. Amo vocês. Aos cães que fizeram parte da jornada do doutoramento Jaci (*in memoriam*), Joe e Godo, por me permitirem a realização da medicina veterinária.

À Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha, que me orientou durante a pós-graduação, por transmitir seu conhecimento constantemente e confiar no meu trabalho, minha admiração por sua trajetória e dedicação ao ensino da Medicina Veterinária.

Agradeço ao Prof. Dr. Julio López Abán por me orientar na Universidad de Salamanca, USAL, me introduzir na equipe do CIETUS e confiar no meu trabalho. Agradeço ao Prof. Dr. Pedro Fernández Soto, pela coorientação, por me ensinar a técnica do LAMP e todo o apoio na pesquisa. Ao Prof. Dr. Antonio Muro, como chefe do grupo de pesquisa por me aceitar para realizar o doutorado na USAL.

Agradeço a Prof. Dra. Cintia Fridman, pela coorientação, por me receber no laboratório de genética forense da FMUSP e todo o auxílio no trabalho e Dra. Mari Maki Síria Godoy Cardena, por todos os ensinamentos de genética e paciência. E aos funcionários Elisângela e Marco do Laboratório de Endocrinologia Genética da FMUSP, pelo auxílio no sequenciamento genético.

Aos professores doutores Adriano Sakai Okamoto e José Carlos de Figueiredo Pantoja, pela participação e contribuições na banca de qualificação.

À CAPES em virtude da concessão do edital Pró-Forenses 25/2014, permitindo o auxílio para pesquisa, bolsa de doutorado e doutorado sanduíche. E ao grupo de pesquisa em parceria com a UFRPE (Profa. Andrea Alice), UFPR (Profa. Carla Molento), Polícia Federal (Dr. Sérgio Reis), FMVZ – USP (Profa. Ana Carolina Fonseca), FMUSP e Polícia Militar do Estado de São Paulo e todos os colegas do projeto que lutam para evolução da Medicina Veterinária Legal.

Aos funcionários da Reitoria da UNESP de Botucatu, principalmente ao Prof. Dr. Maurício Bacci Jr. por me auxiliar a conseguir o vínculo de Cotutela entre a UNESP e a Universidad de Salamanca.

Aos funcionários do Setor de Pós-graduação, do Serviço de Patologia Veterinária – FMVZ – Botucatu, da “escuela de doctorado” da Universidad de Salamanca, funcionários do Departamento de Clínica Veterinária – FMVZ – Botucatu e ao Prof. Dr. Helio Langoni, coordenador do programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Aos colegas do Departamento de Patologia Veterinária – FMVZ - UNESP, aos colegas do Laboratório de Genética Forense – FMUSP, aos colegas do CIETUS – USAL.

Aos alunos que tive oportunidade de coorientar durante o doutorado, por me despertarem ainda mais o desejo por ensinar: Barbara Camargo, Fernanda Garcia, Fernando Nardy, Isabela Kamiguchi e Mariel Adan.

Aos residentes, alunos e funcionários do CEMPAS – FMVZ – UNESP e aos docentes Prof. Carlos Roberto Teixeira e Profa. Sheila Canavese Rahal; Dra. Cristina – ONG Mata Ciliar – Jundiaí-SP, por contribuírem com animais para o estudo.

Profa. Dra. Claire Gwinnett, University of Staffordshire, UK, pelos ensinamentos sobre análises de pelos em animais.

Ao edital Be a Doc, Grupo Coimbra, por permitir o meu primeiro contato com a Universidad de Salamanca, Espanha, em 2016. Ao técnico da CAPES - DRI Pedro Barbosa e a Renata, do Edital Pró Forenses – CAPES.

Aos docentes Dr. Eduardo Massad - FMUSP, Dra. Angela Branco – Prefeitura Municipal de São Paulo, Dr. Antonio Juan García– Universidad de Múrcia – Espanha, por despenderem seu tempo e conhecimentos com a banca de defesa de tese. E aos suplentes Dra. Ana Cristina Tasaka, Dra. Selene Daniela Babboni e Dra. Belén Vicente, pelo pronto aceite e colaboração.

Aos colegas e amigos que fizeram parte desta etapa e essenciais em muitos momentos, Lía Carolina, Sergio Galache, Julia Cury, Simony Guerra, Lais Melicio, Jeanne Lecallard, Alba Torres, Victor Toledo, Pedro Costa, Mauricio Montoya, Isamery Machado, Maria Claudida Lopes, Mara Massad, Laila Ribas, Laiza Gavioli, Luana Raposo, Clifton Davis, Catherine Manqui, Federico Baudino, Anabel Lucy, Zhee Zhang, Florian Onutu, Noemí Friedrich, Anna Barbaro, Laura Gualter, Tatianny Silveira, Rita de Cássia, Carla Maria, Talita Batista e em especial ao Alejandro Morales.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com esta jornada. Minha eterna gratidão.

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído”

Confúcio

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT.....	02
RESÚMEN.....	03
CAPÍTULO I	
1. Introdução.....	04
2. Revisão de literatura.....	06
3. Objetivos gerais.....	19
3.1. Objetivos específicos.....	19
CAPÍTULO II	
<i>Trypanosoma cruzi</i> in Brazilian wildlife trafficking reservoir competence by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay.....	20
CAPÍTULO III	
Avaliação da qualidade de material genético obtido de amostras forenses e identificação de espécies da fauna silvestre brasileira por DNA mitocondrial.....	30
CAPÍTULO IV	
<i>Hair analysis of mammals of Brazilian wildlife for forensic purposes.....</i>	47
CAPÍTULO V	
<i>Forensic genetic and hair analysis as a tool for Jaguar (<i>Panthera onca</i>) identification.....</i>	59
CAPÍTULO VI	
1. Discussão geral	68
2. Conclusões gerais.....	71
3. Conclusiones.....	72
4. Referências bibliográficas.....	73

TREMORI, T. M. **Identificação criminal de espécies da fauna silvestre por DNA mitocondrial**. Botucatu, 2018. 82 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O tráfico, contrabando e comércio ilegal de animais é a quarta atividade ilícita mais comum no mundo, colocando em risco a extinção de diversas espécies. Além disso, o comércio ilegal de animais silvestres pode ser meio de veiculação de enfermidades, principalmente de caráter zoonótico, ao serem transportadas por animais. O trabalho tem por objetivo identificar espécies de animais da fauna silvestre através do DNA mitocondrial (mtDNA), tricológia e determinar a prevalência de *Trypanosoma cruzi* agente etiológico da enfermidade de Chagas, uma Enfermidade Tropical Negligenciada (NTD), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Foram coletadas amostras de tecido muscular, pele, sangue e pelos em animais oriundos de apreensões no território brasileiro. Para a identificação genética, foi sequenciada uma região conservada do mtDNA de aproximadamente 600 pares de bases e comparados com o banco de dados genético *Barcode of Life Database* (BOLD). A identificação por pelos foi realizada através de análise comparada e o diagnóstico *T. cruzi* através da técnica *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP), uma técnica rápida, barata e sensível. Foram identificados animais das espécies *Dasypus sp.*, *Mazama gouazoubira*, *Panthera onca*, *Cerdocyon thous*, *Tamandua tetradactyla*, *Didelphis aurita*, *Puma concolor*, *Myoprocta sp.*, *Cavia sp.*, *Galictis cuja*; através do sequenciamento genético do mtDNA e as espécies *Alouatta sp.*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Sylvilagus brasiliensis*, *Didelphis albiventris*, *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Leopardus tigrinus*, *Dasyprocta sp.*; por meio da morfologia dos pelos, verificou-se que a associação das técnicas é uma potencial ferramenta para a identificação de espécies. Com relação ao diagnóstico por meio de LAMP, verificou-se positividade de 50% (25/50) das amostras, sendo potenciais reservatórios do parasita *T. cruzi*.

Palavras-chave: Patologia Veterinária; Saúde Pública Veterinária; Medicina Legal; Zoonoses; Legislação Veterinária.

TREMORI, T. M. **Wildlife forensic identification by mitochondrial DNA.** Botucatu, 2018. 82 pages. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Animal trafficking, smuggling and illegal trade is the fourth most common illegal activity in the world, increases the risk of extinction of several endangered species. An important point concerning illegal animal trade and the increasing globalization is that represents a possible vehicle for illness spreading, including zoonosis, creating a health public issue. The aim of this research is to identify species from the wildlife by mitochondrial DNA (mtDNA), hair and determines the prevalence of the zoonotic agent *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas' disease, a Neglected Tropical Disease (NTD) according to World Health Organization (WHO). Samples were collected from blood, muscle and skin from trafficking animals in Brazilian territory. A preserved region from mtDNA (600 base pair) was sequenced and compared to the *Barcode of Life Database* (BOLD) in order to do the genetic identification. Hair identification was complete by compared analysis. The diagnosis of *T. cruzi* were made using the *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) assay, a rapid, cheap and sensible technique. Have been identified the following species: *Dasyurus sp.*, *Mazama gouazoubira*, *Panthera onca*, *Cerdocyon thous*, *Tamandua tetradactyla*, *Didelphis aurita*, *Puma concolor*, *Myoprocta sp.*, *Cavia sp.*, *Galictis cuja*; using mtDNA sequencing and these species: *Alouatta sp.*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Sylvilagus brasiliensis*, *Didelphis albiventris*, *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Leopardus tigrinus*, *Dasyprocta sp.*; by hair morphology analysis. The identification could be effective because of its association between forensic genetic and trichology techniques. In our research 50% (25/50) of animals were positive in LAMP assay to *T. cruzi*. This analysis could be important to identify reservoirs and the risk of animal trafficking to human health.

Keywords: Veterinary Pathology; Public Health; Legal Medicine; Zoonosis; Veterinary Law.

TREMORI, T. M. **Identificación criminal de especies de la fauna silvestre por DNA mitocondrial**. Botucatu, 2018. 82 páginas. Tesis (Doctorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMÉN

El tráfico, contrabando y comercialización ilegal de animales es la tercera actividad ilícita que más ocurre en el mundo, poniendo en riesgo la extinción de muchas especies. Además el comercio ilegal puede ser un vehículo de transmisión de enfermedades, principalmente las zoonosis, que pueden ser llevadas por los animales. La investigación tiene por objetivo identificar especies de animales de la fauna silvestre a través de ADN mitocondrial (mtDNA), tricológia y la determinación de prevalencia del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, una Enfermedad Tropical Desatendidas (NTD) de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se recogieron muestras de tejido muscular, piel, sangre y pelos de animales procedentes de aprensión en el territorio nacional de Brasil. Para la identificación genética, fue realizado secuenciación de una región conservada del mtDNA con aproximadamente 600 pares de bases y luego fueron comparados con el banco de datos genético *Barcode of Life Database* (BOLD). La identificación por pelos ha sido llevada a cabo por análisis comparado y el diagnóstico de los agentes infecciosos con carácter zoonosis fue determinado con la técnica *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP), que es sensible, barata y rápida. Los animales identificados fueron *Dasypus sp.*, *Mazama gouazoubira*, *Panthera onca*, *Cercopithecus thous*, *Tamandua tetradactyla*, *Didelphis aurita*, *Puma concolor*, *Myoprocta sp.*, *Cavia sp.*, *Galictis cuja*; por medio de secuenciación del mtDNA y los especies: *Alouatta sp.*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Sylvilagus brasiliensis*, *Didelphis albiventris*, *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Leopardus tigrinus*, *Dasyprocta sp.*; por medio de la morfología de pelos. La asociación de la genética forense y morfología de pelos es una buena herramienta para obtener la identificación. En el LAMP, hubo una positividad de un 50% (25/50) de las muestras, sin embargo, pueden ser potenciales reservorios para el parásito *T. cruzi*.

Palabras-chave: Patología Veterinaria; Salud Pública Veterinaria; Medicina Forense; Zoonosis; Legislación Veterinaria.

1. INTRODUÇÃO

O comércio internacional de animais silvestres cresce a cada ano e a *International Policing Organization* (INTERPOL), organização de policiamento internacional, que conta com 190 países membros, do qual faz parte o Brasil, verifica que o tráfico de animais ocupa uma posição preocupante, estando apenas atrás do tráfico drogas, armas e pessoas. Os principais financiadores deste comércio ilegal são países da União Europeia (EU), Estados Unidos, Emirados Árabes e Japão.

O comércio ilegal, tráfico e descaminho são atividades ilícitas que afetam direta e indiretamente a fauna silvestre brasileira. É possível perceber o efeito deletério desta atividade e o acréscimo significativo do número de espécies na lista oficial de fauna silvestre ameaçada de extinção. A conservação destas espécies também está relacionada com a síndrome da “floresta vazia”, já que os grandes vertebrados frugívoros atuam como dispersores de sementes em uma interação denominada planta-dispersor que contribui indiretamente para a manutenção, regeneração e preservação das florestas nacionais.

Para a verificação do nível de ameaça de extinção de determinada espécie, pode-se consultar a Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, Ministério do Meio Ambiente (MMA), os Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES “*Convention on the International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora*”) e a Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN *Red List “International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*”).

A vasta extensão, sua exploração desordenada, bem como a falta de fiscalização nas fronteiras do território brasileiro é uma das principais causas de extinção das espécies. Uma forma de se perceber o efeito deletério desta atividade é o acréscimo significativo do número de espécies na lista oficial de fauna silvestre ameaçada de extinção, que aumentou 75% no Brasil nos últimos dez anos.

Os casos suspeitos de animais vítimas de tráfico devem ser investigados. Nos casos de contrabando e tráfico de animais silvestres a

identificação é de extrema importância. A identificação taxonômica da fauna silvestre é uma atividade comum e rotineira do perito criminal da área de medicina veterinária. As técnicas atualmente disponíveis incluem uso da fotodocumentação, zoobiologia, genética forense e também a identificação por meio de pelos. O tráfico animal também pode ser um importante meio de veiculação de doenças zoonóticas. A detecção rápida de doenças exige a participação de todos os profissionais envolvidos direta ou indiretamente com a saúde pública e ciências forenses aplicadas à fauna.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biodiversidade

O Brasil é um país de grande importância para a biodiversidade mundial, possui 658 espécies de mamíferos das quais aproximadamente 10% são consideradas ameaçadas de extinção (REIS et al., 2016). A perda da biodiversidade é um dos maiores perigos enfrentados pela sociedade atual, sendo citado na Constituição Federal de 1988 em seu artigo 225 que o meio ambiente ecologicamente equilibrado é direito de todos. Aproximadamente 82 espécies de mamíferos se encontram em perigo de extinção no Brasil (INTERPOL, 2017).

O Brasil abriga mais de 13% da biota mundial, sendo reconhecido mundialmente como um país megadiverso, apresentando distintos biomas por toda sua extensão geográfica. Possui a maior parte do bioma Amazônico, região responsável por manter a estabilidade ambiental do planeta, através da fixação de 1 bilhão de toneladas de carbono por ano, amplitude de recursos naturais e diversidade biológica (DASZAK, 2008; GALETTI et al., 2017).

As ameaças causadas pelo efeito da atividade humana decorrentes de atividades agropecuárias, desmatamento, caça e pesca predatória, tráfico e contrabando de animais, invasões biológicas e atividades de mineração geram uma preocupação adicional para a conservação e manutenção da biodiversidade brasileira (AN et al., 2007; OGDEN; LINACRE, 2015).

Órgãos como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), foram criados com o objetivo de realizar operações de fiscalização, já que as atividades de degradação do meio ambiente são crimes de acordo com a Lei 9.605/98 – Lei de Crimes Ambientais – que estabelece penas para aqueles que cometerem infrações relacionadas à fauna e flora do Brasil (GALETTI et al., 2017).

2.2. Saúde Pública

A saúde humana e animal estão inter-relacionadas e as doenças infecciosas sejam elas emergentes ou reemergentes, apresentam vários fatores contributivos para esta interação como, por exemplo, distribuição geográfica, meio ambiente, exposições ou modificações genéticas, política, economia, adaptação dos microrganismos, entre outros (VALLAT et al., 2013; GALETTI et al., 2017).

Estudos mostram que 75% das enfermidades em seres humanos são zoonóticas, o que torna um cenário complexo, já que muitas delas podem ter sua fisiopatogenia e epidemiologia desconhecidas, principalmente quando estamos tratando de enfermidades em que animais selvagens participam do ciclo da doença (MEAD et al., 1999; GÜRTLER; CARDINAL, 2015). Podemos citar como exemplo a doença de Chagas (causada pelo *Trypanossoma cruzi*), onde pequenos roedores, tatus, gambás, capivaras, quatis, entre outros animais são importantes hospedeiros do protozoário (LOURENÇO et al., 2018). Estas mesmas espécies também podem ser reservatório do agente causador da Leishmaniose (*Leishmania spp.*), importante zoonose que possui ciclo silvestre e urbano. Outra situação refere-se aos tatus infectados por *Mycobacterium leprae*, sendo portanto um fator de risco para a hanseníase em humanos, os macacos também representam um importante hospedeiro para a febre amarela, indicando inclusive a aproximação do ciclo da doença silvestre e urbana (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013; DANDRIEUX et al., 2017).

Através de técnicas moleculares pode ser realizado o diagnóstico de enfermidades zoonóticas em animais silvestres, algo relevante, considerando que grande parte destes animais podem servir como reservatórios de doenças de importância para a saúde pública. A saúde humana e animal estão intimamente ligadas, as doenças infecciosas sejam elas emergentes ou reemergentes apresentam vários fatores contributivos, por exemplo, distribuição geográfica, meio ambiente, exposições ou modificações genéticas, política, economia, adaptação dos microrganismos, entre outros (ASHFORD, 2003; DASZAK, 2008; FAO; WHO, 2014; PESAVENTO; MURPHY, 2014; DE SOUZA GODOI et al., 2017).

Os vetores de doenças humanas e reservatórios representam uma ameaça constante, já que tornam as zoonoses enfermidades cada vez mais difíceis de serem controladas. As doenças infecciosas são ameaças não somente para o ser humano, mas também à fauna e flora que compõem a biodiversidade mundial. A detecção rápida de doenças exige a participação de todos os profissionais envolvidos direta ou indiretamente com a saúde pública (BOUTSINI et al., 2017; TOMASSONE et al., 2018).

2.3. Legislação

A Constituição Federal de 1988, no seu Artigo 225, § 1º, inciso VII, tutela a fauna quando proíbe práticas que coloquem em risco a sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam animais à crueldade. Como consequência desse artigo, foi promulgada a Lei dos Crimes Ambientais, Lei nº 9.605, de fevereiro de 1998. Essa Lei dispõe sobre as especificações das sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente.

A Lei de Crimes Ambientais 9.605/98 que sanciona penas e medidas administrativas para aqueles que praticam atividades lesivas contra o meio ambiente consta na Seção primeira, "Crimes Contra a Fauna", em seu artigo 29; *matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rota migratória, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente, ou em desacordo com a obtida é considerado crime e tem como pena detenção de seis meses a um ano, além de multa.*

Na mesma Seção, no artigo 32, praticar ato de abuso, maus tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos, tendo como pena detenção de três meses a um ano e multa. Sendo assim, a legislação brasileira visa coibir o comércio ilegal, caça ilegal e maus-tratos, entre outros crimes que afetem a biodiversidade nacional.

O artigo 5º da Lei 5.517, de 23 de outubro de 1968 que trata do exercício da profissão do Médico Veterinário, relata que "é competência privativa legal a peritagem sobre animais, identificação, defeitos, vícios, doenças, acidentes e exames técnicos em questões judiciais; perícias, exames e pesquisas

reveladoras de fraudes ou operações dolosas em animais inscritos em competições desportivas e em exposições agropecuárias; perícias para fins administrativos, de crédito e seguro; e exames toxicológicos e sanitários em produtos industriais de origem animal”.

2.4. Perícia Veterinária

Elucidação de crimes envolvendo animais é um assunto relevante para a sociedade, tanto do ponto de vista ético como também perante a justiça (TREMORI; ROCHA, 2013).

As perícias nos animais visam identificar a espécie, diagnosticar lesões, verificar substâncias encontradas em determinadas regiões como esperma, sangue, saliva (POLLANEN, 2016). As apreensões de tráfico e contrabando de animais são frequentes no Brasil e a identificação das espécies envolvidas nestes crimes deve ser realizada por perito. Estas práticas criminosas implicam em diversas formas de maus-tratos aos animais, desde a sua captura, transporte, comercialização até a manutenção em cativeiro, provocando lesões que em muitos casos são fatais, desta forma, 90% dos animais vítimas de tráfico não sobrevivem (FERNANDA; HERNANDEZ, ; TÚLIO et al., 2016).

A perícia é consolidada por meio de laudos constituídos de uma peça escrita, tendo por base o material examinado. Ao culminar um laudo é integral responsabilidade dos peritos que o assinam. Em todas as etapas da perícia é essencial garantir a cadeia de custódia, ou seja, preservar a cronologia das evidências de forma que possam ser rastreadas para assegurar o valor probatório da prova pericial (GARCIA DA COSTA FILHO, 2011).

O perito pode ser oficial, designado pelo juiz (perito judicial), louvado ou ainda com a denominação de assistente técnico (quando presta serviços para uma das partes envolvidas no processo) (GARCIA DA COSTA FILHO, 2011). Pode ser feita de maneira direta ou indireta e, segundo o artigo 158 do Código de Processo Penal (CPP), quando a infração deixar vestígios é indispensável a realização do exame de corpo de delito, não podendo supri-lo a confissão do acusado. Um profissional capacitado pode atuar em diferentes áreas dentro da perícia veterinária, sendo: evolução e avaliação de rebanhos, avaliação de animais e seus rendimentos, arbitragem de valores, diagnóstico de lesões,

identificação de animais, identificação de fraudes, custos de produção pecuária, determinação de sexo, idade, raça, espécie, inventário, necropsia de animais segurados, identificação de produtos e subprodutos de origem animal, exames médico veterinário legal, determinação de imperícia, verificação de parentesco, revelação de fraudes dolosas, bestialismo e zoofilia, intoxicação e envenenamentos, avaliação no valor econômico em animais exóticos, trânsito nacional e internacional de animais, produtos de origem animal e medicamentos de uso animal (COOPER, 1998; MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; NEWBERY; COOKE; MARTINEAU, 2016).

O histórico é fundamental para levantar suspeitas da causa das lesões ou as circunstâncias do caso, situações como transporte, tratamento podem ter grande influência, portanto o cuidado deve ser ainda maior em casos que o histórico é insuficiente. A polícia judiciária, o veterinário, o proprietário, sociedades protetoras ou ainda testemunhas podem auxiliar no fornecimento do histórico do animal, bem como contribuir para a realização do exame de corpo de delito indireto, onde utiliza-se a prova testemunhal (MUNRO; MUNRO, 2013).

A finalidade do perito ao local de crime é levantar os vestígios componentes do corpo de delito, fazendo assim estudo sistemático. Avaliar o período decorrido desde o óbito através das alterações *post mortem*; observar, descrever, colher e materializar vestígios, fotografar e desenhar; são bases da investigação criminal que irão culminar na conclusão do laudo pericial após comprovação científica (MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; TREMORI et al., 2017).

2.5. Medicina Legal Comparada

A Medicina Legal constitui do uso dos conhecimentos médicos para cumprimento das leis, sendo portanto considerada uma interssecção entre os conhecimentos do direito e da medicina (BONACCORSO, 2005; GARCIA DA COSTA FILHO, 2011). Para o conceito de Medicina Legal Comparada extrapola-se muitos conceitos, métodos e padrões usados na Medicina Legal Humana. A aplicação de métodos semelhantes, com adaptações podem se adequar ao contexto da Medicina Veterinária e ser extremamente contributiva

para a elucidação de crimes com envolvimento de animais, por exemplo o uso dos conceitos de traumatologia forense, entomologia, toxicologia, entre outros (MORAITIS; SPILIOPOULOU, 2010; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; KAFADAR; KAFADAR, 2015).

O uso de semelhantes terminologias e nomenclaturas, facilita a compreensão de laudos, já que esses serão posteriormente enviados a autoridades que estão habituados com uma rotina de casos de crimes envolvendo seres humanos e os casos judiciais envolvendo animais embora crescentes são menos comuns de serem abordados perante a justiça (TREMORI; ROCHA, 2013).

O aumento da notificação de casos onde há envolvimento criminal de animais tem tornado a Medicina Veterinária Legal uma especialidade crescente, para isso é fundamental a existência de profissionais capacitados para atuarem nesta área. Na Medicina Veterinária, é um ramo que vem ganhando espaço desde o final do século XX quando houve a introdução da disciplina de Medicina Veterinária Legal nos cursos, sendo a UNESP – Campus de Botucatu, a primeira instituição a ministrar a disciplina para os alunos da graduação, a partir de então é verificado a crescente incidência de perícias em crimes envolvendo animais (RIBAS et al., 2016; L. B. L. TEZZA, S. T. J. REIS, C. F. M. MOLENTO, 2017).

A Medicina Veterinária Legal atua em diversas áreas, como por exemplo: proteção animal, áreas com conservação do meio ambiente, combate ao contrabando, tráfico ilegal de animais, verificação de valor econômico, bestialismo, trânsito de animais, identidade e identificação, bem-estar animal e também produtos de origem animal (COOPER, 1998; MUNRO; MUNRO, 2013).

Ressalva-se que muitos crimes contra os animais não são notificados, todavia a casuística de maus-tratos tende a ser bem maior que a incidência geralmente descrita em delegacias policial e clínicas veterinárias, e a maioria dos casos relatados são oriundos de regiões menos favorecidas e proprietários de baixa classe social (TREMORI; ROCHA, 2013).

O médico veterinário deve estar preparado para lidar com casos que se enquadram em diferentes categorias: crimes de crueldade contra animais, bem estar animal, comércio ilegal de animais silvestres e exóticos, ou casos cíves

em que, por exemplo, busca-se uma recompensa, os quesitos podem variar entre o tipo de caso e ocorrer diferenças conforme a autoridade que solicitou o exame. Verificar se uma morte suspeita trata-se de um processo criminoso ou não é uma grande responsabilidade do legista que irá realizar a necropsia do cadáver (MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; KARSTEN et al., 2017).

A realização do exame necroscópico é muito importante e tem papel fundamental na conclusão do processo principal na determinação da *causa mortis* do animal. Deve-se aproveitar para coletar amostras para exame histológico e toxicológico. Sempre analisar com atenção o conteúdo estomacal e intestinal, observando a coloração e a presença de plantas, cápsulas, comprimidos, corpos estranhos (COOPER, 1998; MUNRO; MUNRO, 2013).

Uma descrição detalhada das lesões macroscópicas e o registro fotográfico são obrigatórios. A necropsia deve ser infografada sendo um documento de interesse médico legal que irá acompanhar todo o processo judicial e que serve como respaldo para o profissional, tendo assim argumentos perante o laudo final (GERDIN; MCDONOUGH, 2013).

Ainda assim, atualmente existem aproximadamente três milhões de animais abandonados no Brasil, de modo que os crimes de maus-tratos continuam acontecendo. Porém a conscientização sobre os direitos dos animais cresce devido ao conceito globalizado de bem estar animal, conservação do meio ambiente, combate a crimes, legislação e sanidade em relação aos produtos de origem animal, tornando cada vez mais evidente a necessidade da ciência forense veterinária (REIS et al., 2016; CARDOSO et al., 2017; L. B. L. TEZZA, S. T. J. REIS, C. F. M. MOLENTO, 2017).

2.6. Tráfico e Contrabando

Tendo em vista o artigo 334 do Código Penal (CP) e os artigos 29, 30 e 31 da Lei 9505/1995, se faz necessário conceituar e diferenciar essas entidades. Dessa maneira, entende-se por tráfico a prática habitual de entrada e saída de algo, via comércio ilegal de produtos, pessoas e animais. Já o contrabando se refere à entrada de um produto proibido pelas leis de determinado país (REIS et al., 2016).

Com o aumento de espécies em extinção, o efeito é adverso: ao invés de reduzir o tráfico, a procura pelas espécies o amplia devido a sua raridade, aumentando conseqüentemente o lucro com essa prática (IYENGAR, 2014; TÚLIO et al., 2017).

Quanto às instituições internacionais, é definido através da *IUCN Red List* critérios para avaliar o risco de extinção de todas as espécies do mundo, para fornecer informações com base científica sobre o estado das espécies e subespécies em um nível global, utilizando a zoobiologia para estabelecer critérios que possam identificar uma espécie, de forma a dizer com segurança que se trata de determinado animal e todos de sua classe a influenciar a política nacional e internacional sobre tomadas de decisão para conservar a diversidade biológica (MIRANDA; RODRIGUES; PAGLIA, 2014; STAATS et al., 2016; GALETTI et al., 2017).

A exploração desordenada de espécies em seu meio natural tem graves conseqüências, culminando na pior delas, que seria a extinção de espécies nativas, ocasionando assim desequilíbrio ambiental que atinge inclusive todo o ecossistema terrestre. O que representa ameaça para a conservação da natureza (ALACS et al., 2010; MUNRO; MUNRO, 2013).

2.7. Identificação

Identidade é o conjunto de caracteres que individualiza uma pessoa, animal ou objeto, tornando-a distinta das demais. Identificação é o processo através do qual se estabelece a identidade de algo. Esta é uma etapa fundamental e constitui-se em um dos principais exames periciais em casos de crimes cometidos contra a fauna. É importante que a identificação siga os critérios de unicidade, imutabilidade, perenidade, praticabilidade e classificabilidade para ser simples, confiável e econômica (SATO et al., 2010; GARCIA DA COSTA FILHO, 2011).

As técnicas atualmente disponíveis incluem o uso da fotodocumentação, morfologia, genética forense e também a identificação por meio de pelos. A

maneira mais utilizada ao longo dos anos foi através da morfologia, utilizando-se a anatomia comparada (BOSMALI et al., 2012).

No entanto é comum a obtenção de apenas fragmentos não identificados. Nestes casos a identificação só se torna possível por técnicas moleculares, sendo este um modo seguro de determinar a identificação do material (ALACS et al., 2010; KHEDKAR et al., 2014). Um método simples e rápido é a identificação através da tricologia (exame dos pelos), pois estudos comparativos mostram ser essa uma técnica bastante viável (SATO, 2003; POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

A realização do exame nem sempre é facilitada, levando-se em consideração que as amostras encontradas podem ser insuficientes para determinados tipos de exames. Com o investimento em novas técnicas de identificação de espécies e crescimento de estudos na área de taxonomia esse número tende a aumentar (AN et al., 2007; FERRI et al., 2009).

2.8. Genética Forense

Através da genética forense, considerado o “padrão ouro” para se evidenciar produtos e subprodutos da fauna silvestre, é possível determinar os materiais suspeitos, origem, além da epidemiologia a respeito de acontecimentos envolvendo crimes nesses animais. Análise de DNA (ácido desoxirribonucleico) aplicadas à fauna vem se desenvolvendo em paralelo com a genética forense humana e tem se beneficiado da extrapolação de técnicas moleculares e estatísticas. Entretanto, essa permanece uma área altamente especializada com os seus próprios desafios e avanços, devido à necessidade de recursos tanto pessoal como estrutural (BELLIS et al., 2003; JOHNSON; WILSON-WILDE; LINACRE, 2014).

Tecnologias de genética molecular são adequadas para detectar e fornecer evidências em investigações criminais e estas técnicas são de grande utilidade para casos de comércio ilegal de espécies selvagens. Dentre todos os métodos disponíveis, muitos ainda não possuem aplicação forense, porém as pesquisas visam avançar e sustentar a utilização nestes casos. Para a realização de testes genéticos confiáveis é necessário estabelecer dentro do

laboratório rígidos padrões de qualidade, como a calibração periódica dos equipamentos, coleta adequada do material, e procedimentos que minimizem as chances de troca acidental, ou proposital de amostras (ALACS et al., 2010; MWALE et al., 2017).

A colaboração de cientistas forenses com geneticistas de conservação e médicos veterinários para o desenvolvimento de programas de investigação em filogenética, filogeografia e genética de populações conjuntamente contribuem para a conservação e gestão das espécies comercializadas e podem fornecer base científica para o desenvolvimento de métodos forenses para a regulamentação e policiamento de comércio de espécies selvagens. Por exemplo, a determinação da origem taxonômica de animais pode ser alcançada usando métodos moleculares, algo pouco viável quando é realizada a identificação somente através da morfologia (BELLIS et al., 2003; ALACS et al., 2010; OGDEN; LINACRE, 2015).

Análises de DNA estão relacionadas à identificação das evidências para determinar a espécie (taxonomia molecular), população, relacionamento ou identificação individual de uma amostra. Esse tema vem se desenvolvendo em paralelo com a genética forense humana e tem se beneficiado da extrapolação de técnicas moleculares e estatísticas. Essa entretanto permanece uma área altamente especializada, com os seus próprios desafios e avanços (JOHNSON et al., 2014).

Uma das etapas fundamentais da genética forense é a colheita de amostras, que podem consistir em qualquer fragmento de tecido, como sangue, pelos, cornos, penas, musculatura, ossos, fezes, carcaças, entre outros. Produtos industrializados, resultantes do processamento de partes de animais, também podem ser objetos de análises. Através delas podem ser respondidas questões relacionadas à determinação da espécie, origem do espécime, se o espécime é silvestre ou doméstico, entre outras (COOPER, 1998; WOODALL et al., 2015).

Das técnicas de genética molecular para o uso forense podemos utilizar DNA ou ácido ribonucleico (RNA). Quanto ao DNA podemos subdividir em DNA nuclear e DNA mitocondrial, na maioria dos casos podem ser utilizados nestes dois tipos de material genético, como é o caso do sequenciamento de nucleotídeos. Nesta técnica é realizada identificação de cada nucleotídeo

(base) em uma específica região alvo do DNA (o marcador genético). Identificações de espécies usualmente envolvem o sequenciamento de aproximadamente 500 pares de bases (*bp*) de DNA para prover uma sequência espécie-específica (BELLIS et al., 2003; WAN; FANG, 2003; AN et al., 2007; JOHNSON; WILSON-WILDE; LINACRE, 2014).

Outra técnica conhecida são os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Estes permitem o estudo de regiões específicas do DNA, permitindo assim, o desenvolvimento de testes mais rápidos e baratos, que não requerem fragmentos longos de DNA de alta qualidade. Entretanto, menos informações são obtidas em comparação com o sequenciamento de DNA completo (SATO et al., 2010).

Marcadores moleculares denominados microssatélites também possuem ampla aplicação forense para identificação. São diferenças entre sequências de DNA devido a uma variação no número de unidades repetitivas de DNA em uma região específica. Mudanças nesse número levam a diferentes tamanhos de fragmentos de DNA que podem ser separados por eletroforese e comparados posteriormente (BOSMALI et al., 2012).

2.9. Identificação por DNA mitocondrial

Muitas vezes o mtDNA pode ser preferível em relação ao nDNA para identificação de espécies. Dentre as vantagens podemos citar a facilidade de obtenção a partir de tecidos processados e degradados, devido ao seu formato circular e por ser menor, o que o torna mais resistente à degradação que é muito comum nos casos forenses (HAJIBABAEI et al., 2006). Isso ocorre pois o mtDNA está presente em multiplicidade dentro de uma única célula, em comparação com uma cópia de cada um, oriundo dos pais, por célula como é o caso do nDNA (CARMO, 2011; KHEDKAR et al., 2014; MUHAMMAD TAHIR; AKHTAR, 2015)

A região do mtDNA denominada, Citocromo b, tem sido utilizado há bastante tempo em estudos sobre a biologia evolutiva dos animais. Além do mais essa técnica se aplica para diagnosticar doenças genéticas que podem estar expressas nas mitocôndrias (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; DAWNAY et al., 2007).

No caso da identificação os marcadores universais são simples, pois os iniciadores (*primers*) são menores, e o sequenciamento de uma região do gene codificador podem ser suficientes para a identificação. Com base nestes princípios foi que surgiu no início do século XXI o projeto DNA *barcoding*, onde através do sequenciamento de uma determinada região da proteína citocromo oxidase I (COI) do mtDNA, de aproximadamente 650 bp, é criado o banco de dados online denominado *Barcode of Life Database* (BOLD). A identificação das espécies ocorre através de confrontos diretos, sendo uma técnica rápida e acessível (HEBERT et al., 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008; YANCY et al., 2009).

Em vista disso o DNA *barcoding* tornou a proposta algo eficiente, barato e rápido para identificação de espécies. Tem como objetivo catalogar a biodiversidade do planeta. Como desvantagens pode-se dizer que é um método com sensibilidade reduzida para identificação de espécies muito próximas geneticamente, onde neste caso seria necessário o sequenciamento de um fragmento maior. Outro detalhe é o fato de o mtDNA apresentar linhagem matrilinear, podendo assim ocorrer a presença de mais de um genoma em uma mesma célula (heteroplasmia) e comprometer casos onde é necessário também a investigação de paternidade (BRANICKI; KUPIEC; PAWLOWSKI, 2003; ALACS et al., 2010; GOLDSTEIN; DESALLE, 2011; KHEDKAR et al., 2014; MUHAMMAD TAHIR; AKHTAR, 2015).

2.11. Loop-mediated isothermal amplification

A amplificação do DNA é considerada uma das principais técnicas para o diagnóstico de doenças infecciosas e exames como PCR (*polimerase chain reaction*) tem sido amplamente utilizado como auxílio no reconhecimento dessas doenças (DA COSTA LIMA et al., 2018).

O diagnóstico de enfermidades zoonóticas em animais silvestres é essencial, considerando que grande parte destes animais podem ser reservatórios de doenças de importância para a saúde pública (REPORT, 2010; VALLAT et al., 2013).

A técnica *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) foi desenvolvida como um método molecular que possui alta sensibilidade, sendo

capaz de amplificar várias cópias de DNA em até uma hora a uma concentração mínima de 0,5ng/μl, em condições isotermas (BESUSCHIO et al., 2017; CEVALLOS et al., 2017).

Diferente de outras técnicas moleculares, LAMP não implica em uma estrutura específica que impede que sejam realizados na rotina em clínicas ou a campo, não sendo restritos a laboratórios (NZELU et al., 2014; CEVALLOS et al., 2017; VERMA et al., 2017).

A técnica LAMP utiliza sequências iniciadoras (*primers*) e é realizada em duas etapas, o que o torna bastante específico e mais seletivo em relação ao alvo. Por esse motivo é menos influenciado pela presença de DNA não relevante ao diagnóstico. O resultado são estruturas que possuem repetições invertidas do DNA alvo na mesma fita possibilitando uma identificação rápida e simples. Outro benefício do teste de LAMP é o fato de não se limitar ao DNA, mas poder ser utilizado também em fitas de RNA juntamente com transcriptase reversa e DNA polimerase. O método mostra-se sensível, além de ser rentável e prático podendo ser aplicado às amostras oriundas de tráfico animal (MORI; NOTOMI, 2009; BESUSCHIO et al., 2017; IMAI et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Testar as técnicas de biologia molecular na identificação animal da fauna silvestre e suas possibilidade de reservatório de enfermidades zoonóticas

3.2. Objetivos específicos

O objetivo deste trabalho utilizando treze espécies de mamíferos diferentes da fauna silvestre brasileira foi:

- determinar a prevalência de *Trypanossoma cruzi* através da técnica de LAMP;
- avaliar a significância da técnica de identificação de espécies por meio de pelos e desta maneira validar a técnica de identificação de animais oriundos tráfico através dos pelos;
- identificar as espécies através da técnica de DNA barcoding.

CAPÍTULO 2

Trabalho científico a ser enviado para a revista **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES**

Normas aos autores disponível em:

<http://journals.plos.org/plosntds/s/submission-guidelines>

ISSN 1935-2727

TRYPANOSOMA CRUZI IN BRAZILIAN WILDLIFE TRAFFICKING RESERVOIR COMPETENCE BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) ASSAY

Tália M Tremori^{1,2*}, Pedro Fernández-Soto², Belén Vicente², Antonio Muro Alvarez², Cintia Fridman³, Julio López-Abán², Noeme S Rocha¹

¹ Department of Veterinary Clinics, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University, UNESP, Distrito de Rubião Jr. s/n, Botucatu – SP, 18618-970, Brazil.

² Faculty of Pharmacy, Salamanca University, Campus Miguel de Unamuno, Av. Lco. Mendéz Nieto, s/n, 37007, Salamanca, Spain.

³ Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, USP, Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 01246-903, Brazil

*email: talia_missen@hotmail.com

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, an important protozoan parasite for humans and animals, causes Chagas disease, a Neglected Tropical Disease (NTD) that could affect roughly 6-7 million people in the world, mainly on underdeveloped countries. The vector is a blood-sucking insect and so many mammals could be reservoirs. Animal trafficking, smuggling and illegal trade is the fourth most common illegal activity in the world. An important point concerning illegal animal trade and the increasing globalization is that represents a possible vehicle for illness spreading, including zoonosis, creating a health public issue. Hence the diagnosis in endemic regions and limited resources is very important, an alternative is a molecular technique named loop-mediated isothermal amplification (LAMP), and this assay is a one-step amplification reaction that amplifies a target DNA with high specificity, efficiency and rapid under isothermal conditions. The aim of this study is verify the prevalence of the zoonotic agent *T. cruzi* in 50 mammals from animal trafficking using muscle, blood and skin samples, the molecular diagnosis of *T. cruzi* were made using the LAMP assay. In our work 50% of animals were positive in LAMP assay to *T. cruzi*. This analysis could be important to identify reservoirs and the risk about animal trafficking to human health and the use of LAMP assay in fast and trial diagnosis.

INTRODUCTION

Animal trafficking, smuggling and illegal trade comprise as the fourth most common illegal activity in the world which promote an environmental imbalance and increase the risk of extinction of several endangered species(1,2). Due to major environmental disasters and a decrease in the number of species, this environmental issue has been highlighted in the scientific community, drawing the attention of the Health authorities and the community about environmental protection (3). Can be reservoirs and to carry zoonotic pathogens and a special attention in public health concern.

Currently the challenges to species conservation are very complicated because the threatened from zoonotic diseases. Small rodents, opossums, quati, capybaras and others wild animals are important hosts of *T. cruzi* (4,5).

The presence of multiple reservoirs is a critical obstacle to the sustained elimination of any infectious agent observed in neglected tropical diseases. In the context of gambiense- human African trypanosomiasis (HAT) elimination cryptic parasitic animal reservoirs add another challenge (6).

Bats could be a potential reservoirs for Trypanosoma and Leishmania-like species in the enzootic cycle of these parasites in gallery forest of a Neotropical savanna, and swab samples are useful for the molecular diagnosis of trypanosomatids. Non-detection or low occurrence of trypanosomatids diagnosis in blood smears and blood culture in bats indicates that them had low parasitaemia (7).

Chagas disease (American trypanosomiasis) is a neglected tropical disease endemic in 21 Latin American countries. Is caused by protozoa named *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae), is a relevant vector-borne multihost pathogen and a serious cause of morbidity and mortality affecting 6-7 million people. Besides the vector transmission, congenital and foodborne are ways of transmission. The ingestion of contaminated food was related in different countries (5,8,9).

T. cruzi is composed of highly heterogeneous populations classified into six Discrete Typing Units (DTUs): TcI – TcVI and all can cause infections in humans, the course of infection largely depends in the host-patient. TcIII and TcIV is widespread through the Americas mainly circulate in sylvatic transmission cycles areas. All mammals are considered susceptible to *T. cruzi* infection. Opossums, armadillos and rodents are major sylvatic reservoir hosts (4,10).

The importance to consider the triad made by animal, human and environment, called “one health”, is that it shows a multidisciplinary topic and go beyond the national territory limits and its represents a emerging area. Zoonotic diseases represents 60% of the human diseases and 75% of the news infections in emerging diseases cases (11–14).

The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a molecular technique and an alternative to Polymerase Chain Reaction (PCR). This assay is a one-step amplification reaction, which amplifies a target DNA with highly specificity, efficiency and fast under isothermal conditions. Even the LAMP assay does not require a high skill level, can be made on field on inexpensive structure and allows simple visual detection of products with colorimetric reaction. It has been applied successfully to detect several zoonotic pathogens, including parasites from neglected tropical diseases(15–18).

The objective of this work is to introduce LAMP analysis in animal samples from animal trafficking in Brazil and assess the presence of *T. cruzi*, ethiological agent of American trypanosomiasis.

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ) at the Sao Paulo State University (CEUA 86/2015) and the Brazilian Institute Chico Mendes of Biodiversity (ICMBio 49607-1).

Animal sampling and DNA extraction

DNA from muscle and skin was extracted with the Universal Quick-DNA Miniprep (Zymo Research®) and from blood samples was extracted using the Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare®), following the manufacturers' instructions. After were measured the concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), reason 260/280 and reason 260/230 by spectrophotometer using Nanovue®. DNA extracted was frozen at -20°C .

Trypanosoma cruzi specific LAMP oligonucleotide design

A species-specific repetitive 231bp DNA sequence from *T. cruzi* was retrieved from bioinformatics analysis using GenBank and TriTrypDB and was used for the design of specific primers with Primer Explorer V4 software (Eiken Chemical®, Japan; <http://primerexplorer.jp/e/>). Specific LAMP primer set selected was developed and tested by Fernández-Martín (2017) are shown in table 1. Also, LAMP F3 and B3 primer specificity was tested by PCR, for the same author.

Table 01: Sequences of LAMP *primers* for the amplification of *Trypanosoma cruzi* (19).

Primers	Length (bp)
F3 AACTATCCGCTGCTTGGA	18
B3 AAGAGCTCGCGAAATTCC	18
FIP^a CCCACCATTCAACAATCGGAAACCACTCGGCT-GATCGTTTT	41
BIP^b AGTCAGAGGCACTCTCTGTCAACCAA-GCAGCGGATAGTT	41
LF TTGGACCACAACGTGTGAT	19
LB TTCACACACTGGACACCAA	20

^a (F1c-F2); ^b (B1c-B2).

Positive control to LAMP assay

The positive control was *Trypanosoma cruzi* DNA from CL Brener and Dm28, the concentration was measured two times by spectrophotometry using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies®) to obtain an average concentration and then diluted with ultrapure water to a final concentration of $0,5\text{ng}/\mu\text{l}$.

LAMP assay

The LAMP reaction was carried out with a total of 25µl reaction mixture containing 7,7µl ultrapure water, 1M betaine, 1,5µl MgSO₄ (0,8 mM), 3,5µl dNTPs (2,5mM), 2,5µl buffer 10x, 40pmol of each FIP and BIP primers, 5pmol of each F3, B3, LB and LF primers, 1µl of *Bst*-DNA polymerase, along with 2µl of DNA tamplate. The reaction mixture was incubated in a conventional heating block or in a thermocycler at 65°C for 60 min to optimize the reaction conditions and then heated at 80°C for 10 min to stop the reaction. Because of the highly sensitivity of LAMP reaction, DNA contamination and carry-over of amplified products were prevented by using sterile tools at all times, performing each step of the analysis in separate work areas, minimizing manipulation of the reaction tubes. Negative controls (ultrapure water) were included in each LAMP reaction.

Detection of LAMP product

Amplified DNA in the LAMP reaction causes turbidity due to accumulation of magnesium pyrophosphate, a by-product of the reaction. Sometimes high skill level people can see it by the naked eye. Also the LAMP reaction amplification can be visually detected by adding 2µl of 1:10 diluted 10,000X concentration fluorescent dye SYBR Green I (Invitrogen®) to each reaction tubes. A successful amplification would turn to green, otherwise, it would remain orange. Additionally, the LAMP products were checked using 1,5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide, visualizes under ultraviolet (UV) light.

RESULTS

This study determines the prevalence of the zoonotic agent *Trypanosoma cruzi* in Brazilian wildlife mammals' blood, muscle and skin samples from animal trafficking using LAMP assay. In our research 50% of animals were positive in LAMP assay to *T. cruzi*. Were analyzed 50 samples, 17 muscle, 16 skin and 17 blood according to the table 2.

Table 2: Samples and species identification from LAMP analysis.

Sample n.	Muscle (A)	Skin (B)	Blood (C)	Specie
1	1	0	0	<i>Dasyus sp.</i>
2	1	1	0	NI
3	1	0	1	<i>Mazama gouzoupira</i>
4	0	0	1	NI
5	1	1	0	<i>Panthera onca</i>
6	1	1	1	<i>Cerdocyon thous</i>
7	ns	1	0	<i>Tamandua tetradactyla</i>
8	0	ns	ns	<i>Didelphis aurita</i>
9	0	ns	0	<i>Didelphis aurita</i>
10	0	0	1	<i>Puma concolor</i>
11	1	0	0	<i>Puma concolor</i>
12	1	0	0	<i>Myoprocta sp.</i>
13	1	0	0	<i>Cavia porcellus</i>
14	1	0	1	NI
15	1	0	1	NI
16	0	0	0	NI

17	0	1	ns	NI
18	1	ns	ns	NI
LN 03	ns	ns	1	<i>Galictis cuja</i>
LN 04	ns	ns	1	<i>Mazama gouazoupira</i>
SI	ns	1	ns	NI
Total	17	16	17	

ns: no sample; NI: no identification.

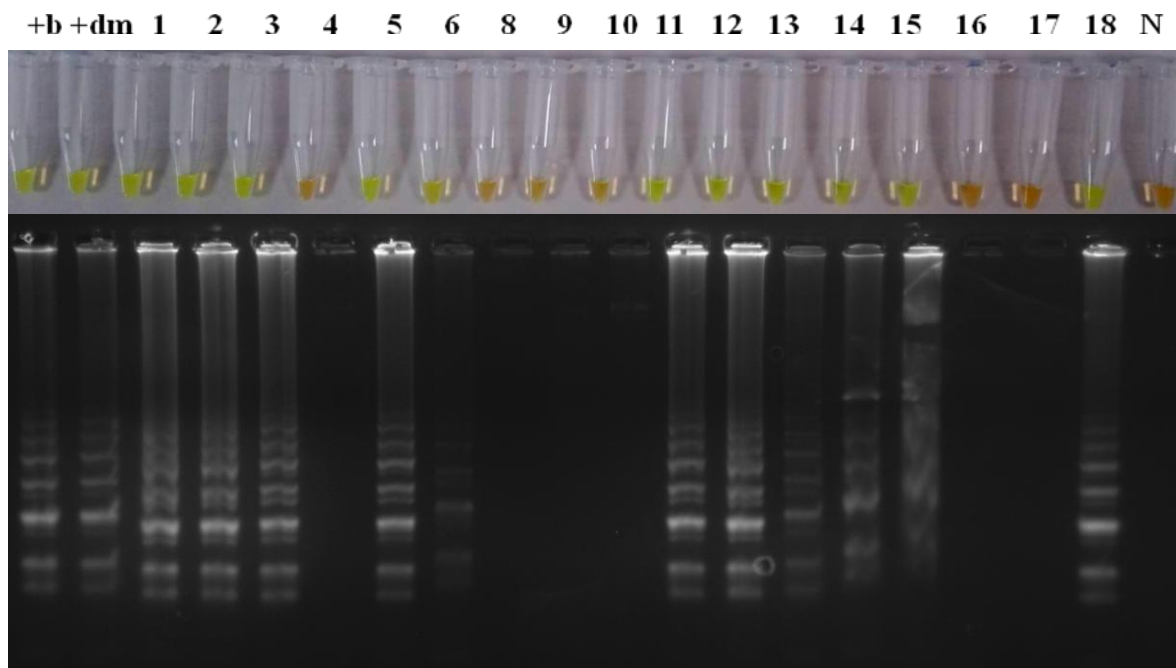


Figure 01: LAMP assay for *T. cruzi* using DNA extracted from muscle samples (n=17) by the addition of SYBR Green I and by visualization on agarose gel stained with ethidium bromide. +b: positive control *T. cruzi* cepa brener 0,5ng/μl. +dm: positive control *T. cruzi* cepa DM28 0,5ng/μl. N: negative control (no DNA template).

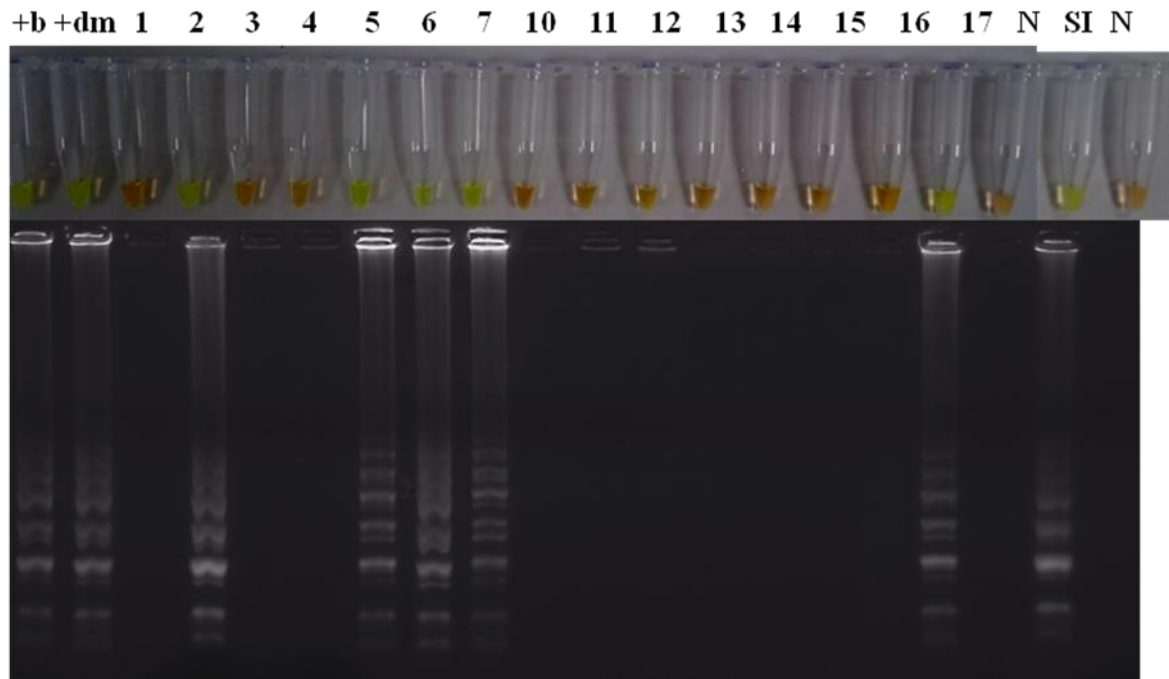


Figure 02: LAMP assay for *T. cruzi* using DNA extracted from skin samples (n=16) by the addition of SYBR Green I and by visualization on agarose gel stained with ethidium bromide. +b: positive control *T. cruzi* cepa brener 0,5ng/ μ l. +dm: positive control *T. cruzi* cepa DM28 0,5ng/ μ l. N: negative control (no DNA template).

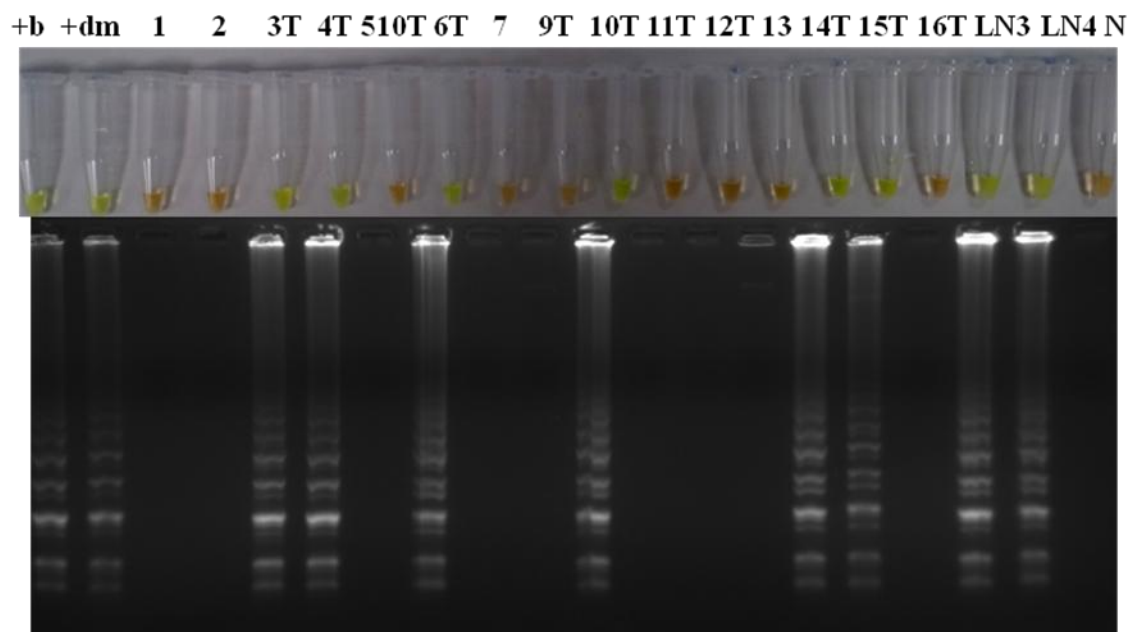


Figure 03: LAMP assay for *T. cruzi* using DNA extracted from blood samples (n=17) by the addition of SYBR Green I and by visualization on agarose gel stained with ethidium bromide. +b: positive control *T. cruzi* cepa brener 0,5ng/ μ l. +dm: positive control *T. cruzi* cepa DM28 0,5ng/ μ l. N: negative control (no DNA template).

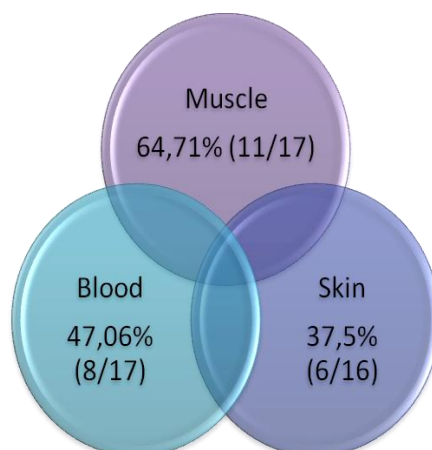


Figure 04: Frequency distribution of LAMP positivity on animal trafficking samples. N=50.

DISCUSSION

The vectors of human diseases and the respective reservoirs represent continuous hazard as important point concerning that the zoonotic diseases are increasingly difficult to control. Zoonosis is a problem not only for human but also to animals and environment(11,13). The rapid detection and diagnostic request participation of so many professionals engaged. In case of animal trafficking the forensic experts also may be ready to work in this context(1,6).

The diseases dissemination caused by illegal trade and smuggling of species can represent an important environmental implication. Across to the analysis and forensic genetic traces in animal identification and the molecular techniques are better because can be used in degraded material, meat, eggs, bones, hairs and others widespread forensic samples(20).

For the international context in borders control is necessary to identify animals and the potential reservoirs of zoonotic diseases in order to prevent human and animals infections by the transmission mainly in case of animal trafficking between endemic to non-endemic countries(9,21).

Thought the LAMP assay, were observed the presence of *T. cruzi* parasite, it causing the Chagas' disease whom is endemic in Brazil, origin of samples of this study(8,9). The muscle samples have a higher positivity, therefore, are necessary to understand this process and the sequencing of amplified samples to identify the strains and determine pathogenicity in wildlife(16).

Animal trafficking can to carry pathogens across animals with reservoir competence to different zoonosis, and take along from endemic to non-endemic zones. Increasing the risk to animal-human transmission or even an outbreak, if have a natural or accidental vector(6).

Hence the diagnosis in endemic regions and limited resources is very important, an alternative is LAMP, and this assay is a one-step amplification reaction that amplifies a target DNA with high specificity, efficiency and speed under isothermal conditions(22,23). This technique is cheaper than other molecular techniques, can be applied on poor infrastructure, does not require a high skill level and could be made on field(16,18).

CONCLUSION

This analysis shows that animal samples from Brazilian trafficking have a global positivity of 50% in LAMP assay to detect the prevalence of the *T. cruzi* DNA. Demonstrate that this study is important to identify reservoirs and the risk of animal trafficking to human health, and the use of LAMP assay in fast and trial diagnosis. Not only the Chagas' diseases, but other potential pathogens that cause multiples neglected tropical diseases. An important point concerning illegal animal trade and the increasing globalization is that it represents a possible vehicle for illness spreading, including zoonosis, creating one public issue, linked animal health, human health and environment.

REFERENCES

1. Túlio S, Reis J, Said De Lavor LM, Sant 'ana LV, Tremori TM, Gonzalez AT, et al. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in Investigations of Wildlife Crimes. Brazilian J Forensic Sci Med Law Bioeth [Internet]. 2016;5(52). Available from: www.ipebj.com.br/forensicjournal
2. Hilton-taylor C, Stuart SN. Wildlife in a changing world [Internet]. 2009. Available from: <http://www.iucn.org/dbtw-wpd/html/RL-2009-001/cover.html>
3. Galetti M, Moleón M, Jordano P, Pires MM, Guimarães PR, Pape T, et al. Ecological and evolutionary legacy of megafauna extinctions. Biol Rev Camb Philos Soc. 2018 May;93(2):845-862. doi: 10.1111/brv.12374. Epub 2017 Oct 9.
4. Gürtler RE, Cardinal M V. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 2015;151(1):32–50.
5. Hodo CL, Wilkerson GK, Birkner EC, Gray SB, Hamer SA. *Trypanosoma cruzi* Transmission Among Captive Nonhuman Primates, Wildlife, and Vectors. Ecohealth [Internet]. 2018; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10393-018-1318-5>
6. Büscher P, Bart JM, Boelaert M, Bucheton B, Cecchi G, Chitnis N, et al. Do Cryptic Reservoirs Threaten Gambiense-Sleeping Sickness Elimination? Trends Parasitol. 2018; Mar;34(3):197-207. doi: 10.1016/j.pt.2017.11.008. Epub 2018 Jan 23.
7. Lourenço JLM, Minuzzi-Souza TTC, Silva LR, Oliveira AC, Mendonça VJ, Nitz N, et al. High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savanna. Acta Trop [Internet]. 2018;177(August 2017):200–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.012>
8. Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. Trends Parasitol [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2018 Jan 24];27(10):459–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492211001218?via%3Dihub>
9. Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. Clin Microbiol Rev. 2013;26(1):58–85.

10. Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. 2015;
11. Tomassone L, Berriatua E, De Sousa R, Duscher GG, Mihalca AD, Silaghi C, et al. Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild. *Vet Parasitol* [Internet]. 2018;251(December 2017):17–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401717305307>
12. Merigueti YFFB, Santarém VA, Ramires LM, da Silveira Batista A, da Costa Beserra LV, Nuci AL, et al. Protective and risk factors associated with the presence of *Toxocara* spp. eggs in dog hair. *Vet Parasitol* [Internet]. 2017;244(April):39–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.020>
13. Holt HR, Inthavong P, Khamlome B, Blaszak K, Keokamphe C, Somoulay V, et al. Endemicity of Zoonotic Diseases in Pigs and Humans in Lowland and Upland Lao PDR: Identification of Socio-cultural Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016;10(4):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003913>
14. Daszak P. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* (80-) [Internet]. 2008;287(5452):443–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5452.443>
15. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, El Safi S, Schallig HDFH. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(4):591–6.
16. Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz Mata I, Picado de Puig A, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–18.
17. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* [Internet]. 2009;15(2):62–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
18. Cevallos W, Fernández-Soto P, Calvopiña M, Fontecha-Cuenca C, Sugiyama H, Sato M, et al. LAMP_{himerus}: A novel LAMP assay for detecting *Amphimerus* sp. DNA in human stool samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):1–16.
19. Ana María Fernández Martín. “ Desarrollo y puesta a punto de un método LAMP para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* .” Universidad de Salamanca; 2017.
20. Mwale M, Dalton DL, Jansen R, De Bruyn M, Pietersen D, Mokgokong PS, et al. Forensic application of DNA barcoding for identification of illegally traded African pangolin scales. *Genome*. 2017;60(3).
21. Kaabi B, Zhioua E. Modeling and comparative study of the spread of zoonotic visceral leishmaniasis from Northern to Central Tunisia. *Acta Trop* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2018 Jan 11];178:19–26. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X1730709X?_rdoc=1&_fmt=high&_origin=gateway&_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb&dgcid=raven_sd_via_email

22. Verma S, Singh R, Sharma V, Bumb RA, Negi NS, Ramesh V, et al. Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of Leishmania infection. BMC Infect Dis [Internet]. 2017;17(1):223. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2318-8>
23. Rivero R, Bisio M, Velázquez EB, Esteva MI, Scollo K, González NL, et al. Rapid detection of Trypanosoma cruzi by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of congenital Chagas infection. Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]. 2017;89(1):26–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.012>

Acknowledgement

Coordination Improvement Higher Education Personnel (CAPES). Pró Forenses 25/2014. Process: 23038.006841/2014-11

CAPÍTULO 3

Trabalho a ser enviado para a revista **THE JOURNAL FOR NATURE CONSERVATION**

Normas aos autores disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/journal-for-nature-conservation>

ISSN 1617-1381

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE MATERIAL GENÉTICO OBTIDO DE AMOSTRAS FORENSES E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE BRASILEIRA POR DNA MITOCONDRIAL

Tália M Tremori, *PhD student*, FMVZ, UNESP, Brazil

Mari Maki S G Cardena, *PhD*, FMUSP, Brazil

Mara RR Massad, *PhD*, FMVZ, UNESP, Brazil

Laila M Ribas, *PhD*, FMVZ, UNESP, Brazil

Luiz Mauricio M Flórez, *PhD, FMVZ, UNESP, Brazil*

Julio López Abán, *Prof Tit. Dr*, Universidad de Salamanca, Spain

Cintia Fridman, *Prof Ass. Dr*, FMUSP, Brazil

Noeme S Rocha, *Prof Ass Dr*, FMVZ, UNESP, Brazil

Abstract

Animal trafficking, smuggling and illegal trade comprise as the third most common illegal activity in the world. Biodiversity and environmental imbalance affect and increase the risk of extinction of several endangered species. The taxonomic identification of wildlife is a routine process of forensics experts. The aim of this research is to identify species from the wild fauna by mitochondrial DNA. 17 samples were analyzed from muscle and skin. A preserved region

from mtDNA (600 base pair) was sequenced and compared to the Barcode of Life Database (BOLD) and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in order to do the specie identification. The identification could be effective in most cases. Sometimes the quality of genetic samples affect the analysis and can make it difficult. This is one of the attributions of the veterinarian on animal expertise to help justice to reduce environmental crimes.

Keywords: forensic genetics, animal trafficking, mitochondrial DNA, animal crime.

Introdução

A genética forense possui grande contribuição no processo de investigação criminal. Em sua maioria, as amostras biológicas encontram-se degradadas devido ao fato de tratar-se de uma cena de crime; do material ser encontrado após muito tempo ou ainda a coleta em um cadáver que pode estar em diferentes estágios de decomposição(HAJIBABAEI et al., 2006). Devemos considerar que hoje existem técnicas que são capazes de identificar os traços de DNA (trace DNA), ainda assim é importante ressaltar que quanto melhor a qualidade da amostra, mais técnicas podem ser realizadas e conseqüentemente mais fidedignos serão os resultados das análises (BELLIS et al., 2003; MWALE et al., 2017).

O tráfico, contrabando e comércio ilegal de animais é a quarta atividade ilícita mais comum no mundo. Crimes ambientais afetam a biodiversidade e o equilíbrio do planeta colocando em risco a extinção de diversas espécies (IYENGAR, 2014; TÚLIO et al., 2016; INTERPOL, 2017).

Verifica-se que a identidade e identificação nos crimes envolvendo animais silvestres possuem diversas implicações jurídicas, inclusive pelo fato de algumas espécies estarem protegidas de forma diferenciada em função do risco de extinção de acordo o *IUCN Red List*. Sendo, portanto, etapa fundamental para o julgamento de um ato infracional de acordo com a legislação vigente no país em que o animal vítima encontrava-se, para desta forma ocorrer punição adequada do infrator (HILTON-TAYLOR; STUART, 2009; SUSANA; GANÇO, 2009; WANG et al., 2010).

Análises de DNA (ácido desoxirribonucleico) são as análises mais utilizadas para identificação de vestígios quando é requerida a determinação de espécie (taxonomia molecular)(AN et al., 2007; MWALE et al., 2017).

Estudos recentes envolvendo a técnica de identificação molecular utilizando DNA mitocondrial (mtDNA), tem mostrado eficácia na distinção de espécies geneticamente semelhantes, além de contribuir positivamente para os estudos da biodiversidade da fauna e flora(HEBERT et al., 2003; MITANI et al., 2009). O DNA barcode utiliza um ou mais marcadores genéticos padronizados no DNA dos organismos para identificar espécies particulares às quais as amostras pertencem. Assim, uma vez sequenciadas, as amostras de DNA podem ser identificadas comparando-as com uma biblioteca de referência online. Esse método pode tornar-se uma poderosa vertente nos casos de tráfico, comércio ilegal e descaminho de animais no Brasil, por ser uma técnica precisa e eficaz que pode complementar os métodos de identificação tradicionais (como os conhecimentos morfológicos das espécies) (HEBERT et al., 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; CARMO, 2011; GOLDSTEIN; DESALLE, 2011; STAATS et al., 2016).

Na técnica do mtDNA algumas regiões são mais exploradas, e pesquisadores propuseram que um segmento curto, de aproximadamente 650 pares de bases seria suficiente. Pode ser feito o sequenciamento da região citocromo b, citocromo c oxidase (COI) extraído de diversas espécies, para então serem depositados em bancos de dados. Um método bastante crescente é em evidência é o DNA barcode, que utiliza mtDNA e é um método recente, criado no início do século XXI, e visa facilitar a identificação das espécies com uma técnica mais rápida e acessível (KHEDKAR et al., 2014).

O gene mitocondrial do Citocromo b tem sido utilizado há bastante tempo em estudos sobre a biologia evolutiva dos animais, o que gerou um rico banco de dados, apesar de o material genético de muitas espécies que não estarem depositadas (YANCY et al., 2009; CARMO, 2011).

Objetivos

Avaliar a qualidade das amostras de DNA de animais que vieram a óbito de dois tipos diferentes de tecidos (pele e músculo) e identificar espécies de animais da fauna silvestre em rota de tráfico através do DNA mitocondrial (mtDNA).

Metodologia

Dos Animais, Grupos Experimentais e Critérios de Inclusão

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), com o protocolo número 86/2015 e SISBIO número 49607-1 e 49607-2. Os critérios de inclusão das amostras coletadas foram serem animais oriundos do Centro de Medicina e Pesquisa de Animais Silvestres - CEMPAS e amostras questionadas apreendidas por autoridades policiais encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Legal – FMVZ –UNESP - Botucatu para a identificação da espécie, em ambas as situações cadáveres de animais. Foram excluídos do estudos cadáveres de animais criados em cativeiro.

As amostras foram divididas em dois grupos: A – tecido muscular, B – pele. A coleta foi realizada através de incisão com bisturi nos músculos semitendinoso e semimembranoso e da pele da região dorso lombar obtendo um fragmento de aproximadamente 1cm³ de cada tecido. As amostras de tecido foram armazenadas em tubos livres de DNA e RNA, cada amostra foi repicada em triplicata, congeladas à temperatura de -20°C e, após 24h, duas amostras foram congeladas a -80°C para formação de um banco de tecidos forense.

Extração de DNA e Quantificação

Após a colheita das amostras realizou-se a extração do DNA, de pele e/ou tecido muscular das espécies utilizando o kit Universal Quick-DNA Miniprep (Zymo Research®) de acordo com as informações do fabricante.O

DNA extraído foi analisado através de espectrofotometria utilizando o equipamento Nanovue®, onde foi mensurada a concentração, relação 260/280 e 260/230.

Avaliação da qualidade das amostras de DNA

Os resultados obtidos da quantificação de DNA das amostras de tecido muscular e pele (A e B) foram submetidas à análise estatística descritiva e comparação através do teste Mean Whitney para amostras não paramétricas com significância de 5% utilizou-se o programa GraphPad Prism® (VIEIRA, 1998).

Amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para identificação das espécies foi realizada a amplificação do gene mitocondrial das regiões COI com as sequências iniciadoras universais utilizadas por Hebert et al. (2003) denominadas de H15149 (*forward*), L14841 (*reverse*) e para fornecer um controle positivo da extração os *primers* do gene ribossomal 16S utilizados por Palumbi et al. (1996) com as sequências iniciadoras 16Sar 5' (*forward*), 16Sbr 3' (*reverse*), e utilizada a técnica Reação em cadeia da polimerase, ou do inglês, *Polimerase Chain Reaction* (PCR).

A reação de PCR seguiu o protocolo de Barbosa et al. (2009) adaptado. A amostra de 2 µl de DNA extraído acrescido 23µl da solução de mix (4µl dnTP 1,25mM, 2,5µl tampão 10x, 1µl MgCl₂ 50 mM, 5µl cada primer a 10pmol/ml, 0,5µl Taq polimerase (5u/µl), 5µl água ultrapura), totalizando 25µl cada reação. Em seguida, submetido ao termociclador com ciclo nas seguintes condições: 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 40 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e finalizando com 72°C por 7 minutos, após a reação foi mantida a temperatura de armazenamento de 4°C. Foi utilizado amostra controle positiva e negativa.

Após PCR foi realizada corrida de eletrofose em gel de agarose 2% em cuba horizontal, sob 200V(volt) e 400A (âmpere) durante 20 minutos, visualizado em luz ultravioleta para verificação de bandas de amplificação.

Sequenciamento de DNA mitocondrial

A purificação do produto do PCR foi realizado em cada tubo contendo 10µl de produto de PCR, 0,5µl de Exo 4000u e 1µl de FAST 1000u/µl, com ciclagem térmica de 15 minutos a 37 °C e 15 minutos a 85 °C. A reação de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Genética Forense, Departamento de Medicina Legal, FMUSP, para cada primer (forward e reverse) utilizada foi: 5µl mix (2µl Big Dye tampão, 2µl Primer (2,5µM), 1µl Big Dye) e 5µl produto de PCR purificado. Colocado no termociclador com utilizando-se o seguinte ciclo 96°C por 1 minuto, 96 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, com trinta e cinco repetições desse ciclo, em seguida 4°C por 7 minutos. Em seguida a reação foi realizado no equipamento de sequenciamento da Applied Biosystems 3130 de eletroforese capilar (4 capilares), obtendo-se assim os eletroferogramas para posterior análise.

Identificação comparada através de banco de dados genéticos

Os resultados obtidos do sequenciamento do mtDNA serão analisados no software BioEdit® e comparados com o banco de dados já existente Barcode of Life Database (BOLD) por meio da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando o software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST- GenBank).

Resultados e Discussões

Foram coletadas amostras pareadas de 17 espécies de animais em diferentes estágios de decomposição, os animais identificados e suas respectivas sequencias genéticas utilizadas para a identificação comparada constam na tabela 1 e no quadro 1.

Os resultados obtidos da quantificação das amostras de DNA após analisados estatisticamente demonstraram que a mediana da concentração (µg/µL) de DNA nas amostras de músculo foram $0,18 \pm 0,01$ e pele $0,10 \pm 0,02$.

Segundo o teste de Mean-Whitney, não houve diferença significativa ($P > 0,05$). Já os resultados da relação 260/280, que verifica a pureza do DNA já que é o resultado da concentração do material genético sobre a quantidade de proteínas, nas amostras de tecido muscular a mediana obtida foi $2,00 \pm 0,01$ e

nas amostras de tecido epitelial foram $1,95 \pm 0,02$. Ao fazer a comparação entre as medianas das amostras foram significativamente distintas ($P < 0,05$).

E por fim, a análise da relação 260/230, que demonstra a concentração em relação à metabólitos secundários e componentes do tampão, foi $2,34 \pm 0,11$ nas amostras de músculo e $2,26 \pm 0,16$ nas amostra de pele. A análise de comparação não houve diferença significativa ($P > 0,05$). As variáveis comparadas estão visualmente demonstradas no diagrama de caixa (boxplot), gráfico 1.

Distribuição das análises das amostras de DNA

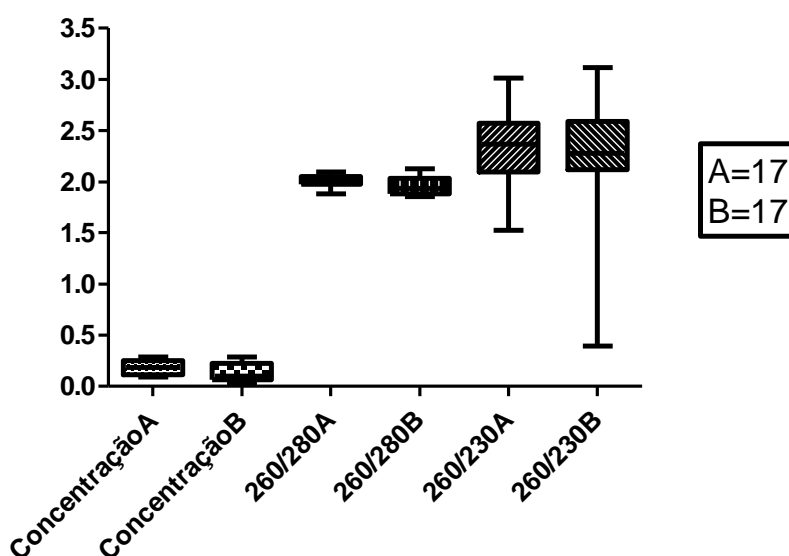


Gráfico 1: *Boxplot* das variáveis analisadas entre os diferentes grupos de amostras coletadas de animais para identificação através de DNA mitocondrial. A (músculo) e B (pele).

O valor ideal de concentração em uma amostra de DNA é de $2,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, para que possam ser realizadas técnicas moleculares como PCR e sequenciamento, bastante utilizadas na rotina forense. Constam na literatura os valores entre 1,8 à 2,2 para a relação 260/280 e 2,0 à 2,2 para a relação 260/230. Embora os animais estivessem em sua maioria em câmara fria até a realização do procedimento necroscópico, o período de morte era variado, porém não foi estabelecido nenhum parâmetro para comparar este tempo de morte e a qualidade do DNA, já que todas as amostras foram consideravelmente ideais.

As amostras foram submetidas ao sequenciamento genético, onde pode-se verificar que houve dificuldade em relação a identificação de algumas amostras, além de em alguns casos a identificação não ser totalmente confiável (99%). Isso deve-se ao fato de as amostras forenses requererem um tratamento diferenciado, desde a sua coleta até a manipulação laboratorial. Por esta razão em algumas situações torna-se bastante complicado transformar um vestígio em uma evidência.

Tabela 1: Relação entre o número da amostra, espécie, origem e estado de conservação

N.	Espécie	Nome Científico	Origem	Conservação
1	Tatu galinha	<i>Dasypus sp.</i>	Pol. Ambiental	Congelado
2	NI	NI	CEMPAS	Refrigerado
3	Veado catingueiro	<i>Mazama gouazoubira</i>	CEMPAS	Refrigerado
4	NI	NI	CEMPAS	Congelado
5	Onça Pintada	<i>Pantera onca</i>	Mata Ciliar	Sem conservação
6	Cachorro do Mato	<i>Cerdocyon thous</i>	CEMPAS	Sem conservação
7	Tamanduá Mirim	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Mata Ciliar	Refrigerado
8	Gambá	<i>Didelphis aurita</i>	Patologia	Sem conservação
9	Gambá	<i>Didelphis aurita</i>	CEMPAS	Congelado
10	Onça parda	<i>Puma concolor</i>	CEMPAS	Sem conservação
11	Onça parda	<i>Puma concolor</i>	CEMPAS	Refrigerado
12	Cutia	<i>Myoprocta sp.</i>	Pol. Ambiental	Congelado
13	Prea	<i>Cavia sp.</i>	CEMPAS	Congelado
14	NI	NI	CEMPAS	Congelado
15	NI	NI	CEMPAS	Sem conservação
LN3	Furão pequeno	<i>Galictis cuja</i>	HV	Congelado
LN4	Veado catingueiro	<i>Mazama gouazoupira</i>	Pol. Ambiental	Sem conservação

NI: Não identificado.(no match)

Quadro 01: Sequências nucleotídicas amplificadas com primers universais LCO (forward) e HCO (reverse) da região COI, DNA mitocondrial, das amostras analisadas após montagem análise no BioEdit® e comparação com banco de dados (BOLD e Genbank).

(1B) *Dasypus septemcinctus*

CGTCTACTAATTCGTGCCGAAGCTGGGCTATAGGCCTCACTAGGAGACGATCAAAT
TTATAACGTAATGAAAGCCCCCATTTCATCATAACTTTCTTTATAGTAATACCAATC

ATGATCGGAGGTTTTCGGAACTGATTAGTCCCAAATAATTGGTGCGCCCGATATA
GCCTTCCCACGAATAACAACATAAGTTTCTGACTATTACCCCCTTCATTCTACTC
CTACTAGCCTCCTCCATAGTAGAAGCTGTTTTTCCGAACAGGCTGAACAGTCTACC
CGCCACTAGCAGGAAACCTAGCCCACGCGGGAGCATCCGTAGACCTAACAACTCT
CTCCCTCCACCTTGACAGGAATCTCATCCATCTTAGG **372bp**

(3B) Mazama gouazoupira

TAGGAACTGCCCTAAGCCTACTAATCCGTGCTGAACTGGGTCAACCCGGTACTCT
ACTCGGAGATGACCAAATTTATAATGAAAATGTAACCGCACATGCATTTGTGATAA
TTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATCGGAGGATTTGGTAATTGATTTGTCCCCT
AATAATTGGTGCTCCAGATATAGCATTTCCTCGAATAAAT
AACATAAGCTTTTTGACTTCTACCCCCTTCATTTTTACTACTTCTAGCAACATCTATA
GTTGAAGCCGGAGCAGGGACAGGTTGAACTGTCTATCCCCCTTTAGCTGGCAATC
TAGCTCACGCAGGAGCCTCAGTTGACTTAACTATCTTTTCCCTACATTTAGCAGGC
ATTTCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTTATTACAACAATTATCAATATAAAACCCC
CTGCCATATCACAATATCAGACTCCCTTATTCGTCTGATCCGTACTAATTACTGCA
GTACTACTGCTCCTTTCACTTCTGTATTAGCAGCCGGAATTACAATACTATTAACA
GACCGAAATCTAAATAACAACCTTTTCGACCCAGC **582bp**

(5B) Panthera onca

TATTAGAGGCACTGCCTGCCAGTGACATCAGTTAAACGGCCGCGGTATCCTGAC
CGTGCAAAGGTAGCATAATCATTTGTTCTTAAATAGGGACTTGTATGAATGGCCA
CACGAGGGCTTTACTGTCTCTTACTTCCAATCCGTGAAATTGACCTTCCCGTGAAG
AGGCGGGAATATGACAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAACCGAC
CCAAAGAGATCTTGATAATCAACCGACAGGGATAACATACCTCTACCATGGGCCG
ACAATTTAGGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAACAACCTCCGAGTGATTTAAATC
TAGACTAACTAGTCGAAAGTACTACATCACTTATTGATCCAAAACCTTGATCAACG
GAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTTTAGAGTCCATATCGACAA
TAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCGATGGTGCAGCAGCTATC
AAAGGTTTCGTTTGTCAACGATTAAGTCCTACGTGATCT **540bp**

(6B) Cerdocyon thous

TGCCTTAAGCCTTCTAATTCGAGCCGAAGTAAGAAAAAGGGTACCCTATTAGGAG
ATGACCAGATCTACAATTTAATAAGAAACAGCCCATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTT
ATAGTTATGCCATTATAATTGGGGGGCTTCGGAAATCTTCTCAATAACACTAATA
ATTGGCGCCCCAGACATGGCATTCCCCCGGATAAAAAATAATTGAGTTGGGGCTC
CTCCCTTCTTTTTTCTTCTCCAAGTATCCTCTTTTATGGTAGAAGCAGGGCTGCAA
CTTATGAATTGTATTTTCCCCTTAGCCAGCATTTCCCCAGCAGGGGCTCAGTTACC
TGACAATTTCCCTTACTTTAGCAGGATTTCTCTCTTAGGGGCAATCAACTTTATC
ACTACTATTATTATATAAACCCCTCCTGCAATGTCCAATACCAAACCCCTTTATTGG
TATGGTCCGTAATAATTACAGCAGTCCTATTTAAATTTGTCATTACCTGTATTAGCT
GCTGGAATTACAATACTTTTATCAGACCGAAATCTAACTCAAC **550 bp**

(7B) Tamandua tetradactyla

CGTTTTTTTTGGGTCTCTTGACAGGTCTAAAGCAAGTTTAGTTGGTACAGGCCTAAG

CATCCTTATCCGCGCAGAGATTGGAAAACTGGCACCCCTATTAGGAGACGACCAA
 ATTTACTTAGATATTGAAACCGCACACGCATTTGTAATAATCTTCTTTATAGTTATAC
 CTATCATAATTGGAGGGTTTCGGCAACTGACTTGTTCTCTAATAATTGGGGGCC
 CAGAAATAGCCTTTCCACGTATAAACAATATAAGTTTTTACTCCTACCACCATCAT
 TTCTCCCGCCACTGGGATCTTCTATAGTAAAGCAGGGGGCGGTACAGGTTGAAATG
 TCTATCCCCCTTGGTGGAAAATTACCCATTGCGGGGCATCCGAGAACTACCCTC
 TTCGCACCAACACCAGGGGGAGTCTTTCATTTTTGTGGTCTATTCAACTCCCCC
 CCATTAATAAAATAATATTCGCGCGGGGATAAACAATATAAAGCCCGTTATTCTTT
 TATTAA **509 bp**

(8B) Didelphis aurita

TTTTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGGTTAGGTAATTGACTTGTTCTACCT
 CTCCAAAAGAGCTCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACAATATAAGCTTCTGA
 CTTCTTCTCCGTCATTCTATTACTATTAGCATCTTCTACTATTGAAGCAGGAGCC
 GGAACAGGATGAACAGTGTATCCACCACTTGCTGGCAACTTAGCTCATGCAGGTG
 CTTCAGTTGACCTAGCCATCTTCTCCCTTCATCTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAG
 GAGCCAT **289 bp**

(9B) Didelphis aurita

TGGTACTGCCCTAAGTATTCTAATTCGAGGAGAGTTGAACAACCGGGTACTTTAAT
 TGGTGATGATCAAATTTATAATGTGAACGTAACCGCCCATGCTTTCATTATAATCTT
 TTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGGTTTTGGTAATTGTTCTGTTCCACTTAT
 AATTGGAGCTCCTGATATAGCATTTCACGAATAAACAATATAAGCTTCTGACTTCT
 TCCTCCGTCATTCTATTACTATTAGCATCTTCTACTATTGAAGCAGGAGCCGGAA
 CAGGATGAACAGTGTATCCACCACTTGCTGGCAACTTAGCTCATGCAGGTGCTTC
 AGTTGACCTAGCCATCTTCTACTAATGAAGCAGGAGCCGGAACAGGATGAACAGT
 GTATCCACCACTTGCTGGCAACTTAGCTCATGCAGGTGCTTCAGTTGACCTAGCC
 ATCTTCTCCCTTCATCTAGCAGGTATTTCTTCTATTTTAGGAGCCATCAATTTTATTA
 CTAATTTATTAATAAAAACCACCCGCAATATCACAATACCAAACCTCCCCTATTCCG
 TCTGATCAGTAATAATCACAGCAGTACTCCTTTTATCCCTTCTGTTCTAGCTG
 CAGGAATTACTTTTCTATTAACAGATCGTAATTTAATAACCACTTTCTTTGATCC **675 bp**

(10B) Puma concolor

GACTGCTCTTAGTCTCCTAATCCGGGCCGAACCTAGGTCAACCTGGCACACTACTA
 GGAGATGATCAAATTTATAATGAGGACAATACTGCCCATGCTTTTGTGATGATTTT
 CTTTCATAGTAATACCTATTATGATTGGAGGGTTTTGGTAATTTCTGAAAAAATTA
 TAATTGGGAGCCCCTGACATAGCACGAATGAATAACATGAGCTTATGACTTCTTCC
 TCCATCTTTTTTACTTCTACTTGCTTCATCTATGGTGGAGGCCGGAGCAGGGACTG
 GATGAACAGTATATCCACCCTTAGCCGGTAATCTGGCTCATGCGGGAGCATCCGT
 AGATCTAACCATTTTCTCACTCCACCTAGCAGGTGTCTCTTCGATCTTGGGTGCTA
 TTAATTTTATCACCCTATTATTAATAAAAACCTCCTGCCATATCTCAATACCAAAC
 ACCCCTTTTTGTATGATCAGTTTTAATCACTGCAGTCCTATTACTCCTATCGCTCCC
 AGTCCTAGCAGCAGGAATTACTATGCTATTAACAGATCGAAACCTAATAACCAT
 TC **564 bp**

(11B)*Puma concolor*

TAGGAACTGCTCTTAGCCTCCTAATCCGGGCCGAAGCTAGGTCAACCTGGCACACT
 ACTAGGAGACGATCAAATTTATAATGTGGTCGTTACTGCCCATGCTTTTGTGATGA
 TTTTCTTCATAGTAATACCTATTATGATTGGAGGGTTTGGTAACTGATTGGTCCCAT
 TAATAATTGGAGCCCCTGACATAGCATTCCCCCGAATGAATAACATGAGCTTCTGA
 CTTCTTCTCCATCTTTTTTACTTCTACTTGCTTCATCTATGGTGGAGGCCGGAGC
 AGGGACTGGATGAACAGTATATCCACCCTTAGCCGGTAATCTGGCTCAAGCGGGA
 GCATCCGTAGATCTAACCATTTTCTCACTCCACCTAGCAGGTGTCTTTTCGATCTT
 GGGTGCTATTAATTTTATCACCCTATTATTAATATAAAACCTCCTGCCATATCTCA
 ATACCAAACACCCCTTTTTGTATGATCAGTTTTAATCACTGCAGTCCTATTACTCCT
 ATCGCTCCCAGTCCTAGCAGCAGGAATTACTATGCTATTAAGAGATCGAAACCTAA
 ATACC **566 bp**

(12B)*Myoprocta sp.*

GGTCGTATTGAGGTTTCGATCTGTGAGTAATATAGTAATCCCTGCTGCTAGGACTG
 GAAGGGATAGTAATAGAAGTACGGCTGTAATTAATACAGATCAGACGAATAAGGG
 TGTTTGGTATTGTGTTATCGCATTTTATGTTAATAATTGTAGTAATAAAGTTGATGG
 CCCCTAGAATTGATGACACTCCTGCTAAATGAAGGGAGAAAATAGTTAGGTCTACT
 GAGGCACCCCGTGTGCTAAATTCCCAGCTAAAGGCGGGTAAACAGTTCATCCTG
 TTCCAGCTCCTGCTTCAATTATTGATGATGATAATAGTAGGAGGAATGATGGGGG
 GAGAAGTCAGAAGCTTATATTATTTCGCGGGAAGGCTATATCAGGGGCTCCA
 ATTATTAGTGGAACCAGTCAGTTCCCAAACCTCCAATTATAATCGGTATAACTATA
 AAGAAAATTATGACAAATGCGTGGGCAGTTACGATCACATTATAAATCTGATCGTC
 TCCGAGTAGTGTCCCTGGTTGTCTAGTTCTGCACGGATTAATAAACTAAGTGC
556 bp

(13B)*Cavia porcellus*

TAGGTAAGCTTGTAAATTCGAGCAGAAATGGGCAAAACGGAACACTC
 TTAGGCGATGATCAAATTTATAAAGAAATCGACACGGCCCATGCTTTTCGTAATAAT
 TTTCTTCATGGTTATACCAATTATAATTGGAGGCTTCGGAAACCCCGTTAGTGCCC
 TTAATAATTGGTGCTCCAGACATAGCATTTCGCGGATAAATAACATAAGCTTTTG
 ACTTCTTCCCCCTTCATTTTTACTACTGTTACCCTCATCTATAGTCGAAGCTGGTGC
 TGGAACCGGGTGGACTGTTTACCCTCCTTTAGCAGGAAACCTGGCACATGCTGGG
 GCTTCCGTAGACCTAACTATTTTTCACTTCACTTGGCAGGTGTCTTCAATCCTT
 GGAGCAATCAACTTTATTACAATATCATTAAACATAAAACCACCTGCAATAACGCAA
 TATCAAACACCATTATTTGTTTGGTCCGTAATAACTGCCGTTCTCCTTCTTTTA
 TCCTTACCAGTTCTAGCTGCAGGTATTACATTGCTATTAACAGATCGAAATTTGAAT
 ACAACC **569 bp**

(LN3)*Galictis cuja*

TAGGCACGGCCCTCAGCCTATTAATTCGCGCTGAACTTCGAAAAAAAGGCGCTC
 TCCTAGGAGATGACCAAATCTACAATGAAAGTAAAGAACCGCCACGCATTTGTAA
 TAATTTTCTTCATAGTTATGCCAATTATAATCGGGGGCTTTGGAACTCCCCCGGA
 GCCTTTAATAATTGGCGCACCTGACATGGCATTCCCCGAAAAACAATATAAGCT
 TCTGACTCCTACCCCTTCTTTGTCTCCTGCTTGCCTTCCATAGTAGAGGCA

```
GGTGCGGGGACAGGGTGGACTGTACATCCCCCTCCAGCAGGAAATTTAGCCCAT
GCAGGAGCATCTGTTGATTTAACAAATTTCTCCTTGCACCTAGCAGGGGTCTCATC
TATCCTAGGAGCCGTTAATTTTATTACCACTATTATCAACATAAAACCCCCAGCAAT
AACACAATACCAAACCTCTTTATTTGTGTGATCTGTCCTAATCACAGCCGTACTIONCT
ATTACTATCTCTACCAGTATTAGCGGCTGGTATTACTATGCTACTTACAGACCGGA
ACCTAACACCACCTTCTTGACC 582bp
```

(LN4) Mazama gouazoupira

```
TGCCCTAAGCCTACTAATCCGTGCTGAACTGGGTCAACCCGGTACTCTACTCGGA
GATGACCAAATTTATAATGTAATTGTCACCGCACATGCATTTGTGATAATTTTCTTT
ATAGTTATACCAATTATAATCGGAGGATTTGGTAATTGACTTGTCCCCTTAATAATT
GGTGCTCCAGATATAGCATTTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTTTGACTTCTACC
CCCTTCATTTTTACTACTTCTAGCATCATCTATAGTTGAAGCCGGAGCAGGGACAG
GTTGAACTGTCTATCCCCCTTAGCCGGCAATCTAGCTCACGCAGGAGCCTCAGT
TGACTTAACTATCTTTTCCCTACATTTAGCAGGCATTTCTTCAATTTTAGGGGCTAT
TAACTTTATTACAACAATTATCAATATAAAACCCCTGCCATATCACAATATCAGAC
TCCCTTATTCGTCTGATCCGTACTAATTACTGCAGTACTACTGCTCCTTTCACTTCC
TGTATTAGCAGCCGGAATTACAATACTATTAACAGACCGAAATCTAAATACC 559bp
```

A qualidade do DNA extraído das amostras A e B se mostrou um pouco inferior ao analisar os resultados obtidos da quantificação, já que a concentração se verificou um relativamente baixa, o que pode demonstrar uma baixa qualidade da conservação do material, ou até mesmo poderia se encontrar um pouco degradado, isso seria justificável em amostras forenses. Os resultados da relação 260/280, que verifica a pureza do DNA, é dado pela concentração do material genético sobre a quantidade de proteínas; e a análise da relação 260/230, demonstra a concentração em relação a metabólitos secundários e componentes do tampão, que mostram-se inferiores ao desejável. Está padronizado na literatura os valores entre 1,8 a 2,2 para a razão 260/280 e 2,0 a 2,2 para a razão 260/230 (ALACS et al., 2010; FROSCH et al., 2011; WHITEMAN & MONTEIRO, JOHNSON et al.; 2014).

Embora a maioria dos animais analisados estivessem em câmara fria até a realização do procedimento necroscópico, com período de morte variado, não foi estabelecido nenhum parâmetro para comparar este tempo de morte e a qualidade do DNA. Os sinais de autólise e putrefação por vezes prejudicam a análise correta do material, no entanto a medicina veterinária legal visa evoluir

para que possam também ser estabelecidos diagnósticos quando o cadáver encontra-se em estados inócuos e não desejáveis, uma vez que tratando-se de crimes torna-se comum este tipo de situação (FRÉZAL; LEBLOIS, 2008; DALTON; KOTZE, 2011; JOHNSON; WILSON-WILDE; LINACRE, 2014).

Ainda assim amostras de tecido muscular, pele e sangue foram submetidas às etapas seguintes de amplificação utilizando os primers HCO2198, LCO1490, 16Sar 5' e 16Sbr 3', purificação e sequenciamento para verificar a viabilidade do uso do material para o prosseguimento da pesquisa (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; PEREIRA et al., 2017).

Os primers da região 16S foram elegidos para ampliar a sensibilidade do teste controle, no entanto em diversos estudos apenas com os primers universais HCO2198 e LCO1490 é possível fazer a identificação das espécies de mamíferos e até mesmo peixes e moluscos, nota-se que neste caso será necessário o emprego de técnicas mais apuradas para amplificar e sequenciar o DNA dos casos onde não foi possível obter-se a identificação (DAWNAY et al., 2007; KHEDKAR et al., 2014)(DAWNAY et al., 2007; KHEDKAR et al., 2014).

Conclusão

As análises estatísticas da qualidade do material genético dos casos de amostras forenses utilizadas para identificação de espécies da fauna silvestre mostraram valores bastante heterogêneos de mediana e desvio padrão, considerando-as fora dos valores ideais, porém individualmente muitas amostras foram consideradas adequadas. A continuidade da pesquisa permitirá estabelecer umnexo entre a qualidade do DNA extraído das amostras com a sensibilidade e especificidade do resultado dos sequenciamentos e identificações genéticas, condizendo assim com a realidade encontrada em situações forenses.

Agradecimento

CAPES Edital Pró Forenses 25/2014 Processo 23038.006841/2014-11

Associação Mata Ciliar

CEMPAS – FMVZ – UNESP – Botucatu

Referências

AN, J.; LEE, M. yeong; MIN, M. S.; LEE, M. H.; LEE, H. A Molecular Genetic Approach for Species Identification of Mammals and Sex Determination of Birds in a Forensic Case of Poaching from South Korea. **Forensic Science International**, v. 167, n. 1, p. 59–61, 2007.

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, n. 2–3, p. 99–108, 2003.

CARMO, R. R. do. Identificação de Animais Silvestres de Interesse Criminal Da Fauna Matogrossense Por Meio de DNA Mitocondrial. p. 86, 2011.

DALTON, D. L.; KOTZE, A. DNA Barcoding as a Tool for Species Identification in Three Forensic Wildlife Cases in South Africa. **Forensic Science International**, v. 207, n. 1–3, p. e51–e54, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.12.017>>.

DAWNAY, N.; OGDEN, R.; MCEWING, R.; CARVALHO, G. R.; THORPE, R. S. Validation of the Barcoding Gene COI for Use in Forensic Genetic Species Identification. **Forensic Science International**, v. 173, n. 1, p. 1–6, 2007.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four Years of DNA Barcoding: Current Advances and Prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727–736, 2008.

GOLDSTEIN, P. Z.; DESALLE, R. Integrating DNA Barcode Data and Taxonomic Practice: Determination, Discovery, and Description. **BioEssays**, v. 33, n. 2, p. 135–147, 2011.

HAJIBABAEI, M.; SMITH, M. A.; JANZEN, D. H.; RODRIGUEZ, J. J.; WHITFIELD, J. B.; HEBERT, P. D. N. A Minimalist Barcode Can Identify a

Specimen Whose DNA Is Degraded. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 959–964, 2006.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological Identifications through DNA Barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2002.2218>>.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences among Closely Related Species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl_1, p. S96–S99, 2003. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsbl.2003.0025>>.

HILTON-TAYLOR, C.; STUART, S. N. **Wildlife in a changing world**. [s.l: s.n.]

INTERPOL. **Environmental Compliance and Enforcement Committee Advisory Board - Impact Report 2015 - 2017**. [s.l: s.n.].

IYENGAR, A. **Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review** *Journal for Nature Conservation*, 2014. .

JOHNSON, R. N.; WILSON-WILDE, L.; LINACRE, A. Current and Future Directions of DNA in Wildlife Forensic Science. **Forensic Science International: Genetics**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.007>>.

KHEDKAR, G. D.; ABHAYANKAR, S. B.; NALAGE, D.; AHMED, S. N.; KHEDKAR, C. D. DNA Barcode Based Wildlife Forensics for Resolving the Origin of Claw Samples Using a Novel Primer Cocktail. **Mitochondrial DNA**, v. 1736, p. 1–4, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19401736.2014.987270>>.

MITANI, T.; AKANE, A.; TOKIYASU, T.; YOSHIMURA, S.; OKII, Y.; YOSHIDA, M. Identification of Animal Species Using the Partial Sequences in the Mitochondrial 16S rRNA Gene. **Legal Medicine**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. S449–S450, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.02.002>>.

MWALE, M.; DALTON, D. L.; JANSEN, R.; DE BRUYN, M.; PIETERSEN, D.; MOKGOKONG, P. S.; KOTZÉ, A. Forensic Application of DNA Barcoding for Identification of Illegally Traded African Pangolin Scales. **Genome**, v. 60, n. 3, 2017.

PEREIRA, A. A. S.; DE CASTRO FERREIRA, E.; DA ROCHA LIMA, A. C. V. M.; TONELLI, G. B.; RÊGO, F. D.; PAGLIA, A. P.; ANDRADE-FILHO, J. D.; PAZ, G. F.; GONTIJO, C. M. F. Detection of Leishmania Spp in Silvatic Mammals and Isolation of Leishmania (Viannia) Braziliensis from Rattus Rattus in an Endemic Area for Leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–9, 2017.

STAATS, M.; ARULANDHU, A. J.; GRAVENDEEL, B.; HOLST-JENSEN, A.; SCHOLTENS, I.; PEELEN, T.; PRINS, T. W.; KOK, E. **Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. .

SUSANA, L.; GANÇO, J. Identificação Genética de Amostras de Origem Animal - Canis Familiaris e Felis Catus - Em Contexto Forense “ Identificação Genética de Amostras de Origem Animal Em Contexto Forense .” 2009.

TÚLIO, S.; REIS, J.; SAID DE LAVOR, L. M.; SANT 'ANA, L. V.; TREMORI, T. M.; GONZALEZ, A. T.; BRÜGGER, P.; REIS, S. T. J. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in Investigations of Wildlife Crimes. **Brazilian Journal of Forensic Sciences Medical Law and Bioethics**, v. 5, n. 52, 2016. Disponível em: <www.ipebj.com.br/forensicjournal>.

WANG, Q.; ZHANG, X.; ZHANG, H. Y.; ZHANG, J.; CHEN, G. Q.; ZHAO, D. H.; MA, H. P.; LIAO, W. J. Identification of 12 Animal Species Meat by T-RFLP on the 12S RRNA Gene. **Meat Science**, v. 85, n. 2, p. 265–269, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.010>>.

YANCY, H. F.; FRY, F. S.; RANDOLPH, S. C.; DEEDS, J.; IVANOVA, N. V.; GRAINGER, C. M.; HANNER, R.; WEIGT, L. A.; DRISKELL, A.; HUNT, J.; ORMOS, A.; HEBERT, P. D. N. A Protocol for Validation of DNA-Barcoding for

the Species Identification of Fish for FDA Regulatory Compliance. **Laboratory Information Bulletin 4420**, v. 24, n. 4420, p. 1–25, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm169034.htm>>.

CAPÍTULO 4

Trabalho científico a ser enviado para a revista **OPEN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES**

Normas aos autores disponível em:

<http://www.scirp.org/journal/ojas/>

ISSN 2161-7597

HAIR ANALYSIS OF MAMMALS OF BRAZILIAN WILDLIFE FOR FORENSIC PURPOSES

Tália Missen Tremori^{1*}, Fernanda Marion Monteiro Garcia¹, Luis Mauricio Montoya Flórez¹, Bianca Picado Gonçalves², Bárbara Wagner Duarte Ferraz de Camargo¹, Claire Gwinnett³, Carlos Roberto Teixeira⁴, Noeme Sousa Rocha¹

¹Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

²Department of Genetics, Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

³Faculty of Computing, Engineering and Sciences, University of Staffordshire, UK.

⁴Department of Surgery and Anesthesiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil.

*Email: talia_missen@hotmail.com

How to cite this paper: Author 1, Author 2 and Author 3 (2018) Paper Title. *****, *, *.*.

http://dx.doi.org/10.4236/****.2018.*****

Received: **** **, ***

Accepted: **** **, ***

Published: **** **, ***

Copyright © 2018 by author(s) and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Wildlife trafficking is classified as the fourth biggest in the world. Taxonomic identification of wildlife is an ordinary process for forensics experts. The aim of this study was to analyze animal's hair from Brazilian's wildlife through microscopic and compare morphology of bristle among species analyzed. Hair samples of nine species were analyzed. Glass slides were analyzed through optical microscopy and following measurements were obtained: total length, medulla diameter, overall diameter and overall ratio diameter of the medulla's diameter. The images obtained at identification of animals through the morphology of hair and the statistics analysis corroborates in favor for the validation of the technique.

Keywords

Forensic zoobiology, hair analysis, veterinary forensic medicine, animal expertise, animal trafficking, smuggling.

1. Introduction

Brazil is a country of great importance for global biodiversity, there are 658 mammalian species whereas approximately 10% are considered as endangered. The loss of biodiversity is one of the greatest problems facing society today (1). Due to major environmental disasters and a decrease in the number of species, this environmental issue has been highlighted in the scientific community, drawing the attention of the Health authorities and the community about environmental protection. Approximately 82 species of mammals are in danger of extinction in Brazil (2,3).

Wildlife trafficking is classified as the fourth biggest illegal commerce, behind firearms, drugs and people trafficking (1). While the number of species in extinction increases, the effect is adverse: instead of reducing the traffic, the demand for these species has intensified due to its rarity. This has consequently increased the potential gain with its illegal practice (2).

Within Brazil's legislation, crimes against the environment belong to the Law on Environmental Crimes (Law 9605/98), this is a major advance among infraconstitutional standards, turning Brazil into one of the most advanced countries regarding standards applied to environmental protection. However, great efforts are still needed to ensure that the sanctions are harshly applied (4).

Veterinary Forensic Medicine was created with the goal of combining knowledges of veterinary medicine with the law when assisting in environmental issues such as wildlife trafficking and animal abuse. Hence, this advances knowledge and skills in wildlife crime investigations, thereby sustaining the evidential value of evidence such as animal hairs and improving case investigations. Because of these benefits, the need for training further professionals in the area was seen (5–7).

The taxonomic identification of the wild fauna is an ordinary activity for the forensics expert in the area of veterinary medicine (8,9). The techniques currently available include the use of photodocumentation, zoobiology, forensic genetics and also identification through hair analysis. In addition to the knowledge of trichological information, the geographical distribution of the species should be taken into account for a more accurate identification. Identification is not always easy, considering that the samples found may be insufficient for certain types of tests (6,10,11). With the investment in new techniques of species identification and the development of studies in the area of taxonomy, the number of identifications has increased (12,13).

Hair identification has been reported by diferents techniques along two centuries, nowadays it is also used to the traces analise crime scene's collected genetic samples and give other precious informations like the presence of toxic agents, parasites, diseases and

particular details from the crime scene (14–17). However morphology and morphometric characteristics' examination based on microscopy, which may enable the hair analyst to identify hair as from animal origin (18), to characterize the hair to a particular species (19,20), and to conduct comparative examinations (12).

The aim of this study is to outline the key features of animal hair retrieved from nine different species of Brazilian wild mammals that are commonly trafficked. This study will aid the identification of such species in wildlife crime investigations in Brazil and countries where products from these species are trafficked.

2. Methods

Hair samples of nine animals from Brazilian fauna species were seized by the Environmental Military Police in illegal conditions like animal trafficking, smuggling, physical abuse among others mistreatments and designated to Laboratory of Forensic Veterinary Pathology of FMVZ - UNESP / Botucatu and Center of Medicine and Research of Wild Animals – CEMPAS. This study was approved by Ethical Committee of Animal Use (CEUA – protocol 86/2015) and had authorization from SISBIO/IBAMA n° 49607-2.

Hairs (20-30) were obtained from each animal using tweezers and pulled out from the region of the intersection of the median line with the waistline. Each sample was processed by two way using glass microscopic slides for medulla analysis.

Initially, the hairs with root bulb and tip, were separated from the others and washed with commercial ethyl alcohol and dried upon a paper towel.

The preparation for medulla analysis could be set up by two manners. Put on the whole hair between two glass microscopic slide and to attach the ends with adhesive tape. In addition, one layer of resin may be applied on glass microscopic slides and put on the whole length of the hair, an additional cover glass microscope slide was placed on top and then applied force with fingers.

If it is a medulla sample from pigmented hair, it should be in a whitening mixture composed of hydrogen peroxide and decolorizing powder (30% for 80 minutes). The exposure time to the hydrogen peroxide varied depending on the thickness and size of the hair samples. The hairs were then mounted on a microscope slide and to avoid loss, secured using a small amount of adhesive tape at each end. The glass slides were labeled with species identification and stored in a microscope slide box (11).

Each hair was observed using a computerized image analyzer Axio Vision Rel 4.8, Carl Zeiss®, German, high powered microscope at x100, x200 and x400 magnification, and photographs taken for comparison using the software Image J, SciJava®, the following measurements were obtained (Figure 1) medulla diameter, total hair diameter and medulla diameter/total diameter ratio (aka the medulla ratio or medulla index). The length of the hairs were obtained with a ruler. The data was tabulated in MS Excel 2007 and the descriptive statistics analysis was performed with the software GraphPad Prism7 version for windows, La Jolla California®, USA.

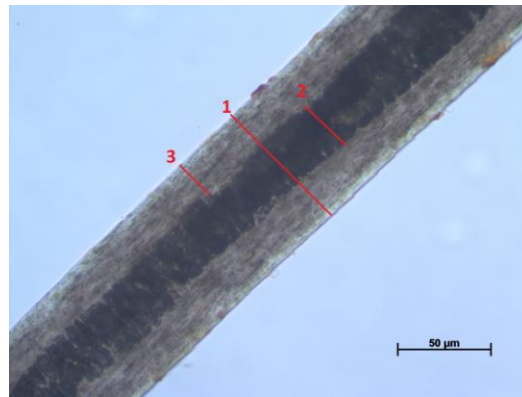


Figure 1. Optical microscopy hair of a brown howler monkey (*Alouatta guariba*). 1 - overall diameter; 2 – medulla diameter; 3 – cuticle overall distance diameter/medulla diameter. 400x.

3. Results

The hair samples were analyzed and each species evaluated regarding their extinction risk according to IUCN Red List (Table 1). Figures 2 to 14 show images of the hairs for both the internal features and scale impressions.

Each species sample were measured according to Table 2 showing the parameters: hair length, medulla diameter, overall hair diameter and medulla/overall diameter ratio.

The descriptive statistics analysis of the overall length of the hairs between species had an average of 3.2 ± 1.79 mm and a non-parametric distribution, also on Wilcoxon analysis statistics significance was obtained ($P < 0,05$). Other remaining parameters have been non-parametric distribution and the Wilcoxon test for comparison between each specie covering all others measurements (medulla diameter, overall hair diameter, ratio overall diameter/medulla) statistics significance was obtained ($P < 0,05$).

Table 1. Classification about the risk of extinction and population of each species sample hair

Scientific name	Common name	Risk of extinction	Population
<i>Alouatta guariba</i>	Brown Howler Monkey	Least concern	Decreasing
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	Pampas deer	Near threatened	Decreasing
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Forest Rabbit	Least concern	Unknown
<i>Panthera onca</i>	Jaguar	Near threatened	Decreasing
<i>Didelphis albiventris</i>	White-eared Opossum	Least concern	Stable
<i>Puma concolor</i>	Cougar	Least concern	Decreasing
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Giant Anteater	Vulnerable	Decreasing
<i>Leopardus tigrinus</i>	Northern Tiger Cat	Vulnerable	Decreasing

<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	Black Agouti	Least concern	Stable
------------------------------	--------------	---------------	--------

a. Sample of a according to IUCN Red List (2).

Table 2. Complete data from each animal/species measured from the software ImageJ.

Species	Hair Length (cm)	Medulla Diameter (μm)	Overall Diameter (μm)	Ratio Overall Diameter/Medulla
Brown Howler Monkey	4,0	28,369	72,057	2,540
Pampas deer	6,3	90,438	131,307	1,452
Forest Rabbit	3,0	39,084	79,035	2,022
Jaguar	0,7	57,714	82,342	1,427
White-eared Opossum	5,5	59,516	114,575	1,925
Cougar	2,3	26,625	47,814	1,796
Giant Anteater	3,0	82,989	251,595	3,032
Northern Tiger Cat	1,8	58,417	69,153	1,184
Cutia	2,2	93,505	124,240	1,329

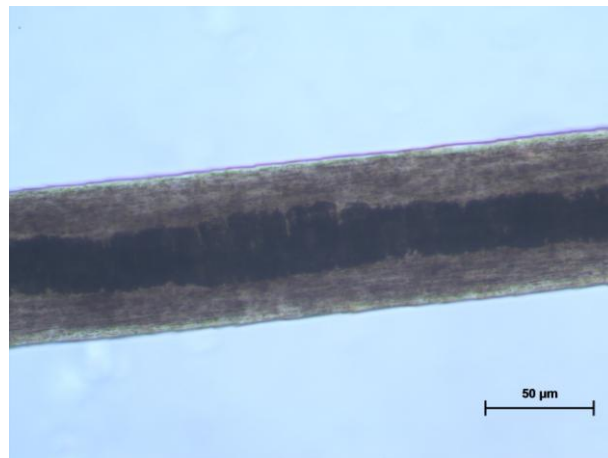


Figure 2. Optical microscopy of a brown howler monkey (*Alouatta guariba*) medulla hair. 400x.

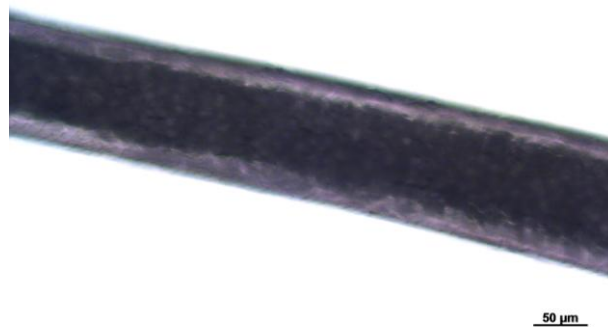


Figure 3. Optical microscopy of a Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) medulla hair, 200x.

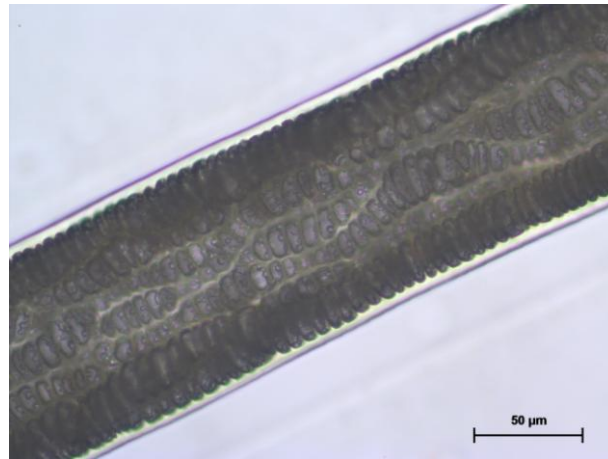


Figure 4. Optical microscopy of a forest rabbit (*Sylvilagus brasiliensis*) medulla hair, 400x.

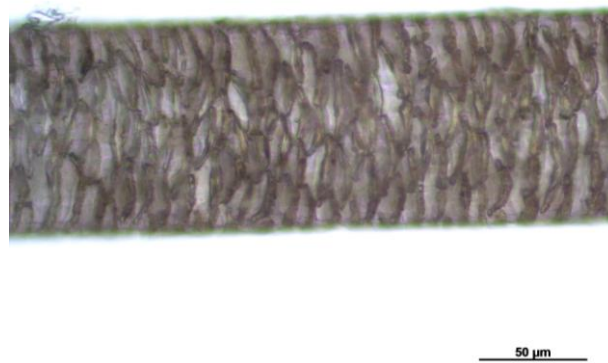


Figure 5. Optical microscopy of a forest rabbit (*Sylvilagus brasiliensis*) hair scales, 400x.

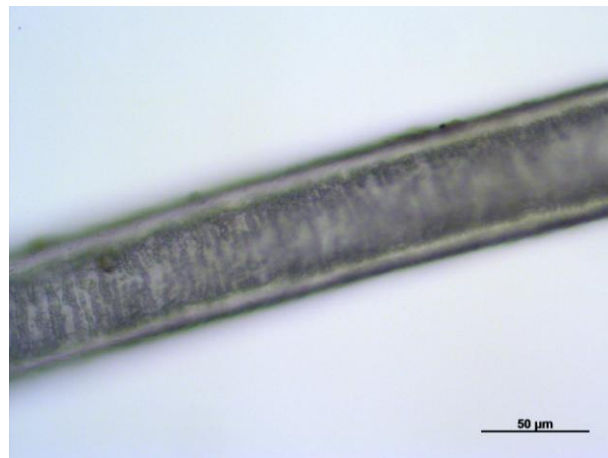


Figure 6. Optical microscopy of a Cougar (*Puma concolor*) medulla hair, 400x.

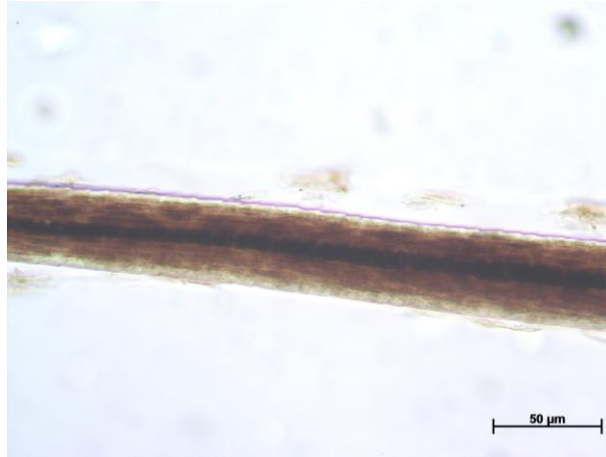


Figure 7. Optical microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) medulla hair. 400x.

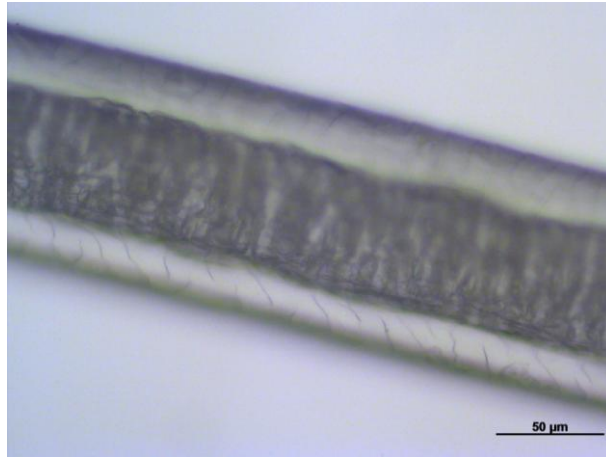


Figure 8. Optical microscopy of a White-eared Opossum (*Didelphis albiventris*) medulla and hair scales. 400x.

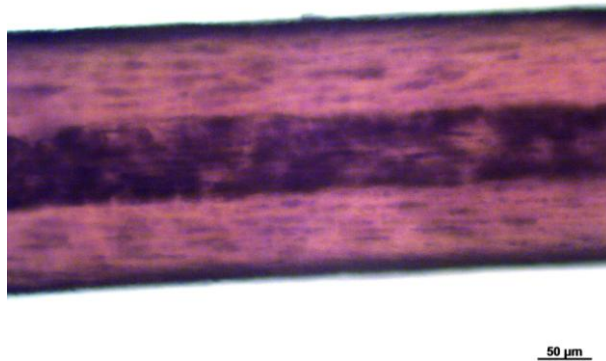


Figure 9. Optical microscopy of a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) medulla hair. 200x.

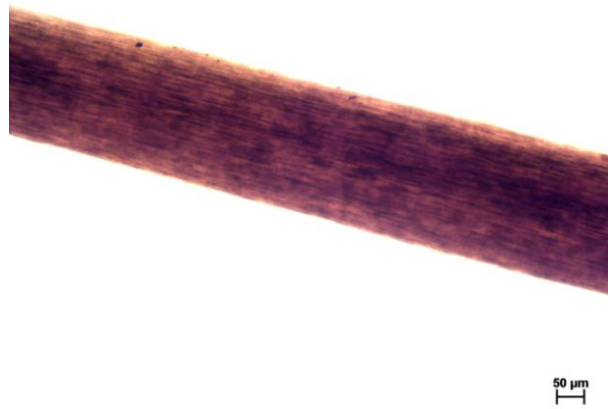


Figure 10. Optical microscopy of a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) hair scales. 100x.

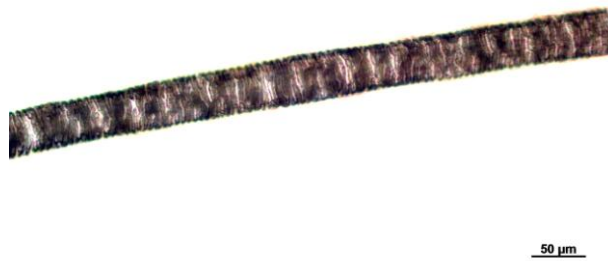


Figure 11. Optical microscopy banded hair of a Northern Tiger cat (*Leopardus tigrinus*), showing scales and pigment. 200x.



Figure 12. Optical microscopy of a Northern Tiger cat (*Leopardus tigrinus*) medulla hair. 200x.



Figure 13. Optical microscopy of a Black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) hair scales with pigment. 100x.



Figure 14. Optical microscopy of a Black agouti (*Dasyprocta fuliginosa*) medulla hair. 100x.

4. Discussion and Conclusion

According to these analysis results, it is possible to infer that there is a difference between the measurements made in the hair samples of different species. This is exhibited by statistics analysis from the comparison among each species measurements. Besides the perceptible divergence of values, it is possible to highlight a great difference at the morphology of the hairs (11,13,19).

The photographed images used for measurement are clear and the measurements were easily performed, it is possible to note the distinction between the hairs. The technique reported in this study is simple, easy and cheap and can contribute effectively to several sectors, purposing the preservation of the national fauna and veterinary practice in the forensic area (6,18,20).

The preparation of the material began with the retrieval of hairs of the species to be analyzed. Correctly, multiples samples from more than one animal of each species are

required to identify intra and inter-variation. To reduce contamination, a dedicated area reserved for this particular research was used, with the use of lab coat and personal protective equipment (PPE). In order to avoid sample mix-up, each species was analyzed individually and separately from the others. The labeling and packaging of the samples is important for the adequate preservation of the chain of custody and integrity of the sample; hairs were packaged in paper envelopes inserted in plastic bags of adequate size for each type of hair (2,15).

The comparison of the morphology of the hairs could be a trial method and resulted in another examination to confirm the species, although genetics is the "gold standard" for the identification, but it is a complementary technique that helps to direct the analysis and to increase the sensitivity of the expert report (16,17).

Futures works are required to quantify the variation that may be present in hairs from different body areas of these species and in different individuals from the same species. This will enable the interpretation of this analysis to be more accurate for the law courts. Further hair characteristics should be explored for their ability to differentiate between these species and closely related ones for greater discrimination (1,5,7,11).

The images obtained and the quantitative measurements contribute to the identification of these previously undocumented species through the morphology of the hairs and the statistics analysis corroborates in favor of validating the technique. This study ultimately aims to aid the identification of animals in a more simple, faster and effective way to benefit the daily analysis of the practitioners working in veterinary forensics. This study contributes to the ongoing research for the preservation of threatened Brazilian's fauna.

Acknowledgements

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Pró Forenses 25/2014 Process 23038.006841/2014-11.

Mata Ciliar Association, NGO, Jundiaí, São Paulo, Brazil.

References

1. Galetti M, Moleón M, Jordano P, Pires MM, Guimarães PR, Pape T, et al. Ecological and evolutionary legacy of megafauna extinctions. *Biol Rev.* 2017;
2. Hilton-taylor C, Stuart SN. Wildlife in a changing world [Internet]. 2009. Available from: <http://www.iucn.org/dbtw-wpd/html/RL-2009-001/cover.html>
3. Daszak P. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* (80-) [Internet]. 2008;287(5452):443–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5452.443>
4. Reis STJ, Lavor LMS de, Sant'Ana LV, Tremori TM, Gonzalez VAT, Brügger P. Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in

- Investigations of Wildlife Crimes, 2013-2014. *Brazilian J Forensic Sci Med Law Bioeth.* 2016;5(2):198–214.
5. Tremori TM, Rocha NS. Exame do corpo de delito na Perícia Veterinária (ensaio). *Rev Educ Contin em Med Veterinária e Zootec do CRMV-SP2.* 2013;11(3):30–25.
 6. Munro R, Munro HMC. Some challenges in forensic veterinary pathology: A review. *J Comp Pathol* [Internet]. 2013;149(1):57–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.10.001>
 7. Gerdin JA, McDonough SP. Forensic Pathology of Companion Animal Abuse and Neglect. *Vet Pathol* [Internet]. 2013;50(6):994–1006. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813488895>
 8. Gupta SK, Bhagavatula J, Thangaraj K, Singh L. Establishing the identity of the massacred tigress in a case of wildlife crime. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(1):74–5.
 9. Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, Robertson J. DNA detective: A review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci Med Pathol.* 2010;6(3):180–94.
 10. Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. Validation of the bar-coding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int.* 2007;173(1):1–6.
 11. Miranda G de, Rodrigues F, Paglia A. Guia de Identificação de Pelos de Mamíferos Brasileiros [Internet]. *Ciências Forenses.* 2014. 108 p. Available from: http://www.researchgate.net/profile/Guilherme_Miranda2/publication/266908770_Guia_de_Identificacao_de_Pelos_de_Mamferos_Brasileiros/links/5450c45a0cf201441e93cfa8.pdf
 12. Tridico SR, Houck MM, Kirkbride KP, Smith ME, Yates BC. Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014;238:101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.023>
 13. Sato H. Preliminary study of hair form of Japanese head hairs using image analysis. *Forensic Sci Int.* 2003;131(2–3):202–8.
 14. Pozebon D, Scheffler GL, Dressler VL. Elemental hair analysis: A review of procedures and applications. *Anal Chim Acta.* 2017;992.
 15. Merigueti YFFB, Santarém VA, Ramires LM, da Silveira Batista A, da Costa Beserra LV, Nuci AL, et al. Protective and risk factors associated with the presence of *Toxocara* spp. eggs in dog hair. *Vet Parasitol* [Internet]. 2017;244(April):39–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.020>
 16. Bellis C, Ashton KJ, Freney L, Blair B, Griffiths LR. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Sci Int.* 2003;134(2–3):99–108.
 17. Khedkar GD, Abhayankar SB, Nalage D, Ahmed SN, Khedkar CD. DNA barcode based wildlife forensics for resolving the origin of claw samples using a novel primer cocktail. *Mitochondrial DNA* [Internet]. 2014;1736:1–4. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19401736.2014.987270>
 18. Yates BC, Espinoza EO, Baker BW. Forensic species identification of elephant

(Elephantidae) and giraffe (Giraffidae) tail hair using light microscopy. *Forensic Sci Med Pathol.* 2010;6(3):165–71.

19. Sato H, Matsuda H, Kubota S, Kawano K. Statistical comparison of dog and cat guard hairs using numerical morphology. *Forensic Sci Int.* 2006;158(2–3):94–103.

20. Sato I, Nakaki S, Murata K, Takeshita H, Mukai T. Forensic hair analysis to identify animal species on a case of pet animal abuse. *Int J Legal Med.* 2010;124(3):249–56.

1 **CAPÍTULO 5**

2 Trabalho científico a ser enviado para a revista **EUROPEAN JOURNAL OF**
3 **WILDLIFE RESEARCH**

4 Normas aos autores disponível em:

5 <https://www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/10344>

6

7 **ISSN 1612-4642 (print version)**

8 **1439-0574 (electronic version)**

9

10

11 **FORENSIC GENETIC AND HAIR ANALYSIS AS A TOOL**
12 **FOR JAGUAR (*Panthera onca*) IDENTIFICATION**

13

14

15 **Tália Missen Tremori^{1,5*}, Mari Maki Siria Godoy Cardena², Bianca Picado**
16 **Gonçalves³, Claire Gwinnet⁴, Julio López-Abán⁵, Cintia Fridman², Noeme Sousa**
17 **Rocha¹**

18

19 ¹ Department of Veterinary Clinics, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State
20 University, UNESP, Distrito de Rubião Jr. s/n, Botucatu – SP, 18618-970, Brazil.

21 ² Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, USP, Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo - SP,
22 01246-903, Brazil

23 ³ Department of Genetics, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, UNESP, Distrito de Rubião Jr.
24 s/n, Botucatu – SP, 18618-970, Brazil.

25 ⁴ Faculty of Computing, Engineering and Sciences, Science Centre, Staffordshire University, College Road,
26 University Quarter, ST4 2 DE, Staffordshire, UK

27 ⁵ Faculty of Pharmacy, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Av. Lco. Mendéz Nieto, s/n,
28 37007, Salamanca, Spain.

29

30

31

32

ABSTRACT

33

Aims: Identification of specie by one piece from police apprehension by mitochondrial DNA and hair.

Presentation case: A preserved region from mtDNA was sequenced and compared to the DNA database (GenBank) in order to do the genetic identification. To hair analysis has been used optical

* Tel.: +55 14 998277318

E-mail talia_missen@hotmail.com

microscopy in 100, 200 and 400x and photographs has been taken by the software “AxioVision”. To measurements has been employed the program “Image J” and hair identification has been completed by compared analysis. The association between forensic genetic and trichology techniques could identify the *Panthera onca* with 100% similarity in this case

Discussion: Animal trafficking, smuggling and illegal trade comprises as the fourth most common illegal activity in the world. Biodiversity and environmental imbalance affects and increases the risk of extinction of several endangered species. The taxonomic identification of wildlife is a routine process of forensics expert.

Conclusion: This study can demonstrate a manner to improve and helps the forensic experts to apply for analysis to reduce environmental crimes.

34
35

Keywords: Animal hair, forensic veterinary, genetic identification, animal crime, conservation.

36
37
38

1. INTRODUCTION

39
40
41
42
43
44
45

Environmental crimes represent an international problem that could put in risk various wildlife species. In Brazil, the loss of biodiversity, measured for the prompt decline of constituents parts, like species, genes and ecosystems, is due to the fact that wild animal trafficking, smuggling and illegal trade have a significant impact. The International Union for Conservation of Nature (IUCN – Red List Data) and Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) manage and classify the species according to threatened, confirm that the number of cases have increase endangered species, and the population decline.

46
47
48
49
50
51

International wild animal trade grows each year, Interpol (*International Policing Organization*), which has the support of 190 country members, verify that illegal animal trade is an increasingly worrying phenomenon; this area of crime is fourth largest in the world. Negative consequences and impacts of such environmental crime are mainly related with health aspects, socioeconomic and ecologic, when the resources availability decrease, changing the environment conditions and put wildlife species in a potential accidental and stochastic effects (1,2).

52
53

The growth of endangered species promotes the opposite effect, instead to decline animal trafficking the demand for rare species enlarged, therefore the profit of this illegal activity (1).

54
55
56
57

Species preservation is a complex situation and animal crime investigation requires forensics experts and multidisciplinary professionals. The first step is the specie identification, up next others contributive information like the geographic distribution and illness transmission. The epidemiological of these points have impacts on one health (1,3).

58
59
60

Available techniques to species identification include photo-documentation, zoo biology, forensic genetics and also identification by hair. The most popular way over the years was the morphology; know as forensic zoo biology, which use the anatomic comparison (4–6).

61
62
63

Molecular techniques has been developed join to forensic human genetics and can be extrapolated to animal cases, therefore remain a highly specialized with advances and challenges (7).

64
65
66
67
68
69
70

The mtDNA molecular markers has been used widely, mainly in illegal wildlife hunter cases which is essential the specie identification and to give evidences. Also has been applied to marketed products among which identification had lost to warranty the traceability. Some mitochondrial genes presents a high rate of mutation however others genes have a reduced rates of mutation. Because of that reason could be apply to individual recognition to same species, using the controller mtDNA region D-loop, could be apply to species identification and their phylogenetic relations using the cytochrome C oxidase subunit I (COI) mtDNA gene (8–10).

71
72

Actually a pattern segment of COI gene have 650 base pair (bp), this can be used to generate a *DNA barcode* which allow identify species by comparison (8).

73
74
75
76

Another method to species identification is the trichology (hair assay), comparative studies show that it is quite feasible. To concise identification, in addition of the trichology information, the geographical allocation should be taken into account (5,11,12).

2. PRESENTATION OF CASE

This case comprises as an identification of police seizure illegally captures species, through morphologic analysis and forensic genetics isolation and compared assay. Was request to Laboratory of Veterinary Legal Medicine from Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Campus of Botucatu, Sao Paulo, Brasil by the Police to provide the identification of animal species for an apprehension illegally specie. The hairs founded were analyzed according to stain, thickness and length, besides scales and medulla pattern. The hair samples were washed with liquid detergent, alcohol 70% and water, afterward one layer of colorless nail polish was applied on a glass microscope slide and waited for 15 a 20 seconds for drying, then, they were placed on top of the nail polish and other glass slide was pressed over the hair for about 5 minutes, applying a considerable pressure. After the preparation of the material, the glass slides were analyzed by optical microscopy (ZEISS®), using optical 100, 200 and 400x and photographs were taken with the software *AxioVision* and electronic microscope. With the program *Image J*, the following measurements were obtained: marrow diameter, overall diameter, ratio marrow/cuticle, ratio diameter overall of marrow/cuticle and amount of scales in 100µm. The size of hair was obtained with the aid of a ruler. Hair identification was complete by compared analysis (5).

To genetic identification, was taken tissue sample, DNA was extracted by Universal kit Quick-DNA Miniprep (Zymo Research®) according to manufacturer's instructions. After the concentration (µg/µL), reason 260/280 and reason 260/230 by spectrophotometer using Nanovue®.

Henceforth, the amplification using Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed with primers of the mitochondrial gene from COI using each of the initial sequences (Table 01) used by Hebert *et al.* (2003) H15149 (forward), L14841 (reverse). To provide a positive control was used the ribosomal gene 16S used by Palumbi *et al.* (1996), 16Sar 5' (forward), 16Sbr 3' (reverse).

The PCR assay was conducted the protocol in 25 µl reaction mixture containing: 2 µl of sample DNA extract, 4µl dNTP 1,25mM, 2,5µl buffer 10x, 1µl MgCl₂ 50 mM, 5µl each primer 10pmol/ml, 0,5µl Taq-polymerase (5u/µl), 2µl ultrapure water. Initial denaturation was conducted at 94°C for 3 min, followed by a touchdown program for 30 cycles, the reaction was denatured at 94°C for 40 s, followed by annealing at 59 °C for 30 s and polymerization at 72 °C for 30 s. The final extension was performed at 72°C for 10 min.

Negative (no DNA template) and positive (human DNA sample) controls were included. After the product amplified were subject to 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

The purification was performed with 10µl each amplified product, 0,5µl of Exo 4000u and 1µl of FAST 1000u/µl, followed by a thermal cycle program at 37 °C for 15 m, followed by 85°C for 15 m. The sequencing was conducted on *Applied Biosystems* 3130 (4 capillary) in forward and reverse to the following protocol: 5µl mix (2µl Big Dye buffer, 2µl Primer (2,5µM), 1µl Big Dye) and 5µl purified PCR product. Put into SeqAB (*Applied Biosystems Sequencing*) program for 35 cycles at 96°C for 1 m, 96°C for 15 s, 50°C for 15 s and 60°C for 4 m, finishing at 4°C for 7 m.

The sequences resolved for the unknown samples were blasted against database of National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program and were also compared to reference sequences.

The analyzed hairs had aspect thing, straight, color yellow and brown, distal end black, sized according to Table 02. On electronic microscopic presented a transversal wavy pattern with smooth and continuous scales (Figure 01).

On optical microscopic was possible to show the medulla pattern, with intermediate (Figure 02) and narrow width (Figure 03), multi-seriated rows cells, anastomosis, trabecular shape and fringe wavy pattern. All this characteristics was according to Miranda *et al.* (2014). Therefore, the transversal wavy pattern is common to different species and may not to be a diagnostic.

The DNA extraction success was verified by spectrophotometer according to Table 03 and the amplification by PCR warranted by electrophoresis on agarose gel 2% (Figure 04).

The sequences from sample one and two aligned (100% sequence similarity in 16S ribosomal and 94% in COI region) with the mitochondrial DNA sequence of *Panthera onca* or Jaguar (NCBI accession no. KP202264) and did not align with any of the species with 100% similarity, the sequences has showed according to the match on the Table 04.

132 Regarding to hair analysis the images are clear and the measurements were held easily,
133 considers that had distinctions between the analyzed hairs, and similarity with references.
134 Consequently, may be the identification according to taxonomic, in this case a feline, due to
135 medulla trabecular fimbriated pattern (4,5).

137 138 **3. DISCUSSION**

139 According to IUCN RedList the classification of *Panthera onca* is near threatened with a
140 decreasing population. Most common individuals in nature were localized on South America (Figure
141 05) (13).

142
143 The identification by hair worked very well like a trial exam, as is possible to eliminate any
144 hypothesis about the identification. Among the advantages we can cited the origin easy, which is
145 effective to field applications, with the propose to preserve the wildlife. The hair collection can be
146 direct, from the animal or parts of them, or indirect, from crime scene, stools and others trace
147 evidences. The taking and labeling of samples is very important, must be packed in paper inside
148 the plastic bags suitable for each hair size, to preserve the chain of custody in forensics cases
149 (11,12).

150 Forensic genetics still is the gold standard to species identification, so these techniques
151 have high sensibility using less samples. Despite others methodologies are useful, like hair
152 analysis, to show a direction and to help the conclusion on technical reports too (7,14,15).

153 After the blast with database (GenBank), the results enabling any doubts about the specie
154 identification, the 100% similarity dismissed the error and warranty the exam, extremely important in
155 forensic cases (4,16).

156 The hair samples were submitted to microscopic pattern analysis of cuticle and medulla,
157 aiming at the production of reference material (microphotographs and trichological collection) that,
158 in the future, can be used as standard on taxonomic identification tests for forensic purposes or
159 ecological studies (diet, living area, geographical distribution). The adopted methodology involved
160 slides preparation techniques of great simplicity and low-cost material, facilitating its dissemination
161 in forensic units spread throughout Brazil (5,12,17).

162 The identification in wildlife crimes have valuable legal consequences, one of the reasons is
163 because some species are protected according to their extinction risk in IUCN Red List. Can
164 generate a judicial proceeding, are requested technical reports prepared by forensic experts. These
165 documents may to help judicial authorities to execute the detentions according to the regulations
166 about environmental protection in force (18–20).

167 168 **4. CONCLUSION**

169 The identification could be effective connecting the hair analysis with the forensic genetic. In
170 this manner was possible to confirm the origin of samples from wildlife, *Panthera onca* or Jaguar.
171 The possibility to apply the hair analyses on field could improve the forensic expert to help justice to
172 reduce environmental crimes.
173

174 175 **ACKNOWLEDGEMENTS**

176
177
178 Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) - Process
179 25/2014 no. 23038.006841/2014-11

180
181 Non-governmental Organization: Associação Mata Ciliar, Jundaí, São Paulo, Brazil.
182
183

184 **COMPETING INTERESTS**

185

186 Authors have declared that no competing interests exist.

187

188

189

190 **REFERENCES**

191

192 1. Interpol. Environmental Compliance and Enforcement Committee Advisory Board - Impact
193 Report 2015 - 2017. Edinburgh; 2017.

194 2. Iyengar A. Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A
195 review. Vol. 22, Journal for Nature Conservation. 2014.

196 3. Hilton-taylor C, Stuart SN. Wildlife in a changing world [Internet]. 2009. Available from:
197 <http://www.iucn.org/dbtw-wpd/html/RL-2009-001/cover.html>

198 4. Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. Validation of the barcoding
199 gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci Int*. 2007;173(1):1–
200 6.

201 5. Miranda G de, Rodrigues F, Paglia A. Guia de Identificação de Pelos de Mamíferos
202 Brasileiros [Internet]. *Ciências Forenses*. 2014. 108 p. Available from:
203 [http://www.researchgate.net/profile/Guilherme_Miranda2/publication/266908770_Guia_de_](http://www.researchgate.net/profile/Guilherme_Miranda2/publication/266908770_Guia_de_identificacao_de_Pelos_de_Mamferos_Brasileiros/links/5450c45a0cf201441e93cfa8.pdf)
204 [dentificao_de_Pelos_de_Mamferos_Brasileiros/links/5450c45a0cf201441e93cfa8.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Guilherme_Miranda2/publication/266908770_Guia_de_identificacao_de_Pelos_de_Mamferos_Brasileiros/links/5450c45a0cf201441e93cfa8.pdf)

205 6. Gerdin JA, McDonough SP. Forensic Pathology of Companion Animal Abuse and Neglect.
206 *Vet Pathol* [Internet]. 2013;50(6):994–1006. Available from:
207 <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813488895>

208 7. Johnson RN, Wilson-Wilde L, Linacre A. Current and future directions of DNA in wildlife
209 forensic science. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2014;10(1):1–11. Available from:
210 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.007>

211 8. Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase
212 subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc B Biol Sci* [Internet].
213 2003;270(Suppl_1):S96–9. Available from:
214 <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsbl.2003.0025>

215 9. Yancy HF, Fry FS, Randolph SC, Deeds J, Ivanova N V., Grainger CM, et al. A Protocol for
216 Validation of DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish for FDA Regulatory
217 Compliance. *Lab Inf Bull* 4420 [Internet]. 2009;24(4420):1–25. Available from:
218 <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm169034.htm>

219 10. Hajibabaei M, Smith MA, Janzen DH, Rodriguez JJ, Whitfield JB, Hebert PDN. A minimalist
220 barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Mol Ecol Notes*. 2006;6(4):959–
221 64.

222 11. Pozebon D, Scheffler GL, Dressler VL. Elemental hair analysis: A review of procedures and
223 applications. *Anal Chim Acta*. 2017;992.

224 12. Tridico SR, Houck MM, Kirkbride KP, Smith ME, Yates BC. Morphological identification of
225 animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls. *Forensic Sci Int* [Internet].
226 2014;238:101–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.023>

227 13. Quigley, H., Foster, R., Petracca, L., Payan, E., Salom, R. & Harmsen B. *Panthera onca*
228 [Internet]. The IUCN Red List of Threatened Species 2017. 2017 [cited 2018 Jan 23]. p.
229 e.T15953A50658693. Available from: [http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en)
230 [3.RLTS.T15953A50658693.en](http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T15953A50658693.en)

- 231 14. Bellis C, Ashton KJ, Freney L, Blair B, Griffiths LR. A molecular genetic approach for
232 forensic animal species identification. *Forensic Sci Int.* 2003;134(2–3):99–108.
- 233 15. Karlsson AO, Holmlund G. Identification of mammal species using species-specific DNA
234 pyrosequencing. *Forensic Sci Int.* 2007;173(1):16–20.
- 235 16. Yates BC, Espinoza EO, Baker BW. Forensic species identification of elephant
236 (Elephantidae) and giraffe (Giraffidae) tail hair using light microscopy. *Forensic Sci Med
237 Pathol.* 2010;6(3):165–71.
- 238 17. Sato I, Nakaki S, Murata K, Takeshita H, Mukai T. Forensic hair analysis to identify animal
239 species on a case of pet animal abuse. *Int J Legal Med.* 2010;124(3):249–56.
- 240 18. Cooper JE. What is forensic veterinary medicine? its relevance to the modern exotic animal
241 practice. *Semin Avian Exot Pet Med* [Internet]. 1998;7(4):161–5. Available from:
242 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055937X98800601>
- 243 19. Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, Robertson J. DNA detective: A review of molecular
244 approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci Med Pathol.* 2010;6(3):180–94.
- 245 20. Frosch C, Dutsov A, Georgiev G, Nowak C. Case report of a fatal bear attack documented
246 by forensic wildlife genetics. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2011;5(4):342–4. Available
247 from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.009>

248

249

250

251 **Table 01:** Sequences of PCR *Primers* for the amplification of COI and 16S ribosomal region
252 to specie identification.

Primer	Reference
LCO 1490(5' – GGT CAA CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G) ^a	Hebert et al. 2003
HCO 2198 (5' – TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA) ^b	Hebert et al. 2003
16Sar – 5' (5' – CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT) ^a	Palumbi et al. 1996
16Sbr – 3' (5' – CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T) ^b	Palumbi et al. 1996

253 ^a forward; ^b reverse.

254

255

256

257

Table 02. Complete data from hair samples measured from the software *ImageJ*.

Hair Length (cm)	Medulla Diameter (µm)	Overall Diameter (µm)	Ratio Overall Diameter/Medulla
0,7	57,714	82,342	1,427

258

259

260

261

262

Table 03. Complete data from tissue DNA quantitation by Nanovue

Tissue	Concentration (µg/µL)	260/280	260/230
Muscle	0.101	2.061	3.015
Skin	0.213	1.885	2.393

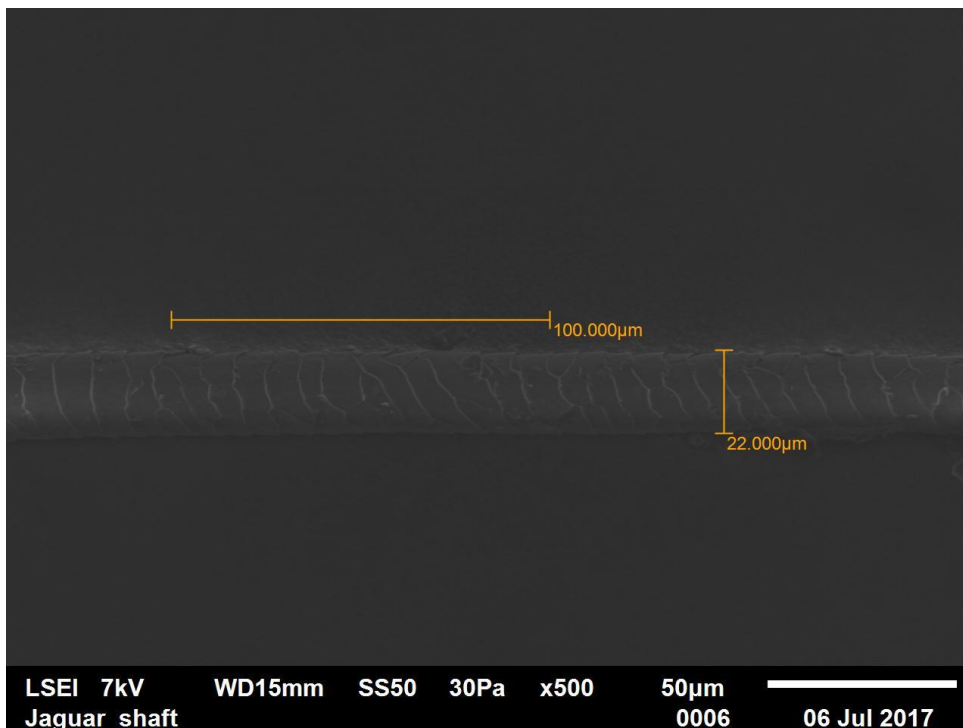
263

264
265
266

Table 04: Nucleotide sequence of *Panthera onca* from COI region(A) and 16S(B), mitochondrial DNA.

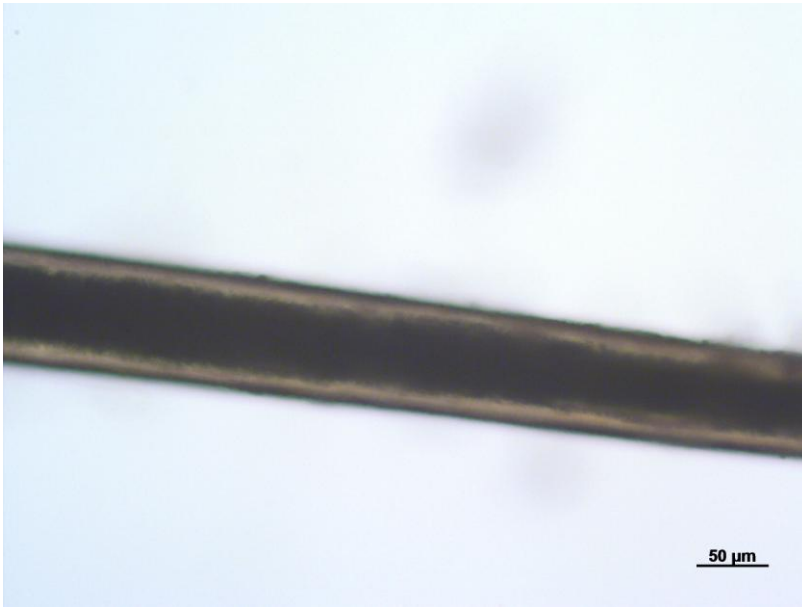
(A) <i>Panthera onca</i>
AAAATGAAAAGCGCGCCGCGAGCGCGACGCGGAAGAAGGCTCTAATTTCTCAACCGAA CTAACTGGGAAAAGGCAGCTATTAGGGGAGACAGATTTATAAGTAGAGGGGACCGCAAGCCT GTAATAATCTTCTTCATAGTGAGCCTATCATGATAGGAGGATACGGAAACTGATAGGTCCAAAA ACGATTGGGGCTCCCGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATGAGCTTCTGACTCCTCCCTC CATCTTTCTTACTTTTGGCTCGCATCATCTATGGTAGAGGCTGGAGCAGGGACTGGGTGGACAG TATACCCACCTCTAGCCGGTAACCTAGCTCATGCAGGGGCATCCGTAGATATAACTATTTTTTC ACTGCACCTGGCAGGTGTCTCCTCAATCCTAGGTGCTATTAATTTTATTACTACTATAATCAATA TAAAACCCCTGTTTATATCCCAATATCAAACACCCCTGTTTGTCTGATAGGTTTTAATCACTGC TGTATTACTACTTCTATCACTGCCCTCTTAGCACCACGCATCACTATACTACTGACAGATCGA AATCTAAACACCACATTTTTTTGACCCCGCCGAGGAGGGGGATCCTATCTCATATCAACACCT ATACTGATATTTTTGGCACTG 653bp
(B) <i>Panthera onca</i>
TATTAGAGGCACTGCCTGCCAGTGACATCAGTTAAACGGCCGCGGTATCCTGACCGT GCAAAGGTAGCATAATCATTGTTCCCTTAATAGGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGGCTT TACTGTCTCTTACTTCCAATCCGTGAAATTGACCTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATATGACAATA AGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAACCGACCCAAAGAGATCTTGATAATCAACCGACA GGGATAACATACTCTACCATGGGCCGACAATTTAGGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAACA ACCTCCGAGTGATTTAAATCTAGACTAACTAGTCGAAAGTACTACATCACTTATTGATCCAAAA CTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTTTAGAGTCCATATCGA CAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCGATGGTGCAGCAGCTATCAAAGG TTCGTTTGTTCACGATTAAGTCCTACGTGATCT 540bp

267
268



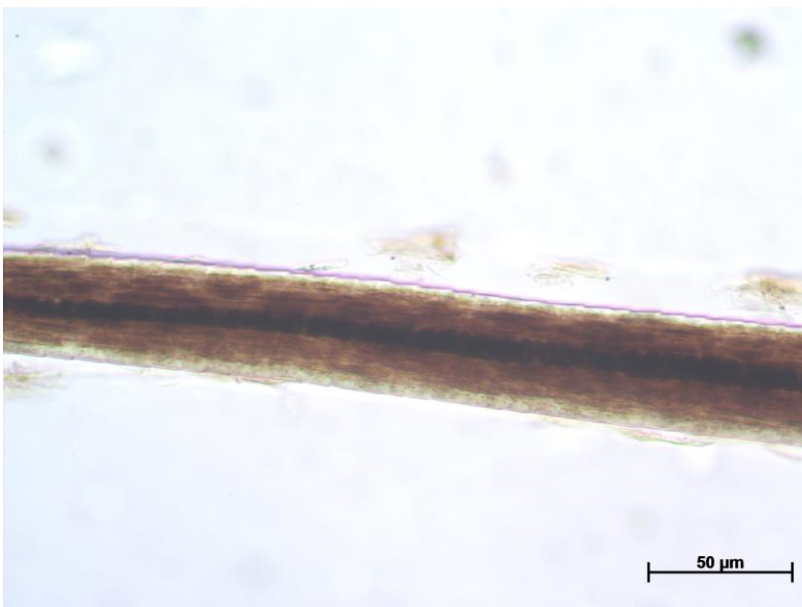
269
270
271
272

Figure 01. Electronic microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) hair, showing scales with transversal wavy pattern. (400x)



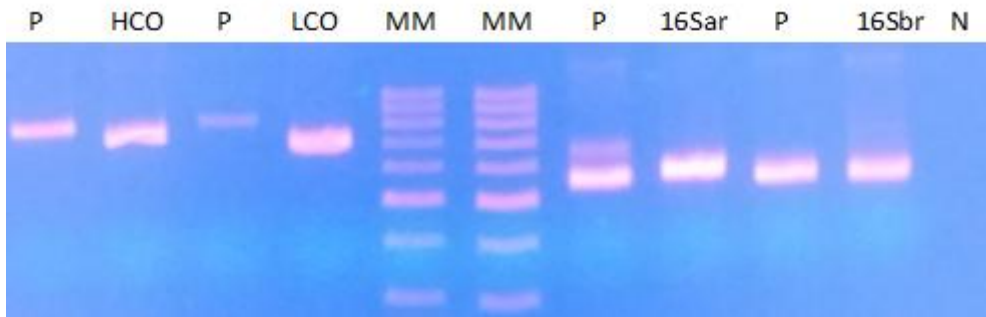
273
274 **Figure 02.** Optical microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) hair, showing medulla. (200x).
275 Intermediate trabecular fimbriated medulla pattern.

276
277
278



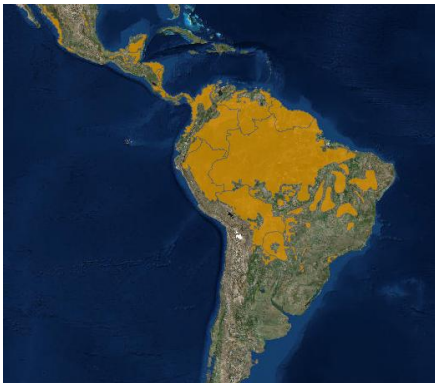
279
280 **Figure 03.** Optical microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) hair, showing medulla. (400x). Narrow
281 trabecular fimbriated medulla pattern.

282
283
284



285
286
287
288
289
290

Figure 04: PCR verification. P, positive control primer; HCO, LCO, 16Sar/16Sbr, sample analysis, MM, molecular markers de 100pb; N, negative control.



291
292
293
294

Figure 05: Distribution of Jaguar (*Panthera onca*) on the world (13).

CAPÍTULO 6

1. DISCUSSÃO

Há diferença entre as mensurações realizadas nos pelos de diferentes espécies e também com relação à morfologia (MIRANDA; RODRIGUES; PAGLIA, 2014; TRIDICO et al., 2014; DA COSTA LIMA et al., 2018).

As imagens obtidas permitem a elaboração de material científico de maneira que venham a contribuir com a identificação de animais através da morfologia dos pelos e as análises estatísticas significativas permitem validação da técnica com base em materiais de referência pois notou-se similaridade com as identificações realizadas (SATO et al., 2010; MIRANDA; RODRIGUES; PAGLIA, 2014; POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

A identificação dos pelos é de procedência simples, sucinta, e que pode contribuir de forma efetiva para diversos setores, visando à preservação da fauna nacional e atuação do médico veterinário na área legal (TREMORI; ROCHA, 2013; MCDONOUGH; MCEWEN, 2016).

A rotulação das amostras é de devida importância, acondicionando-as em recipientes de tamanho adequado, lacrados e identificados, considerando-se inclusive o fato de se tratar de um exame pericial e neste caso a necessidade de preservar a cadeia de custódia (BONACCORSO, 2005; WOODALL et al., 2015; KHATUN et al., 2017).

A identificação de animais encaminhados e requisitados pela autoridade policial o exame de identificação durante a execução do projeto, mostrou a aplicabilidade do trabalho, onde a genética forense associada à comparação da morfologia dos pelos resultou em mais um exame para confirmar a espécie, quando possível a sua realização. Apesar da genética forense ser considerada “padrão ouro” para a identificação, o uso de técnicas complementares oferecem maior sensibilidade ao laudo pericial, tornando assim o exame mais fidedigno podendo servir como exame de triagem quando os profissionais estão em situações à campo (JOHNSON et al.; KHEDKAR et al., 2014; LINDQUIST & WICTUM, 2016).

É plausível a realização de mais estudos de morfologia dos pelos para certificar valores em mais espécies e em maior número de indivíduos. Seria de

grande interesse também a medição de outros fatores dos pelos além dos relatados nesse estudo, para maior especificação e detalhamento do processo (SILVA, 2001; MIRANDA et al., 2014; TREMORI et al., 2014).

A técnica do DNA *barcoding* é eficaz, inclusive em casos de material genético degradado, como é comum nas amostras forenses, como os casos de animais oriundos de tráfico e contrabando. A não identificação pode ser decorrente de falhas na etapa de sequenciamento ou a necessidade de utilização de reativos específicos para a área forense (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; DALTON; KOTZE, 2011; KHEDKAR et al., 2014; MUHAMMAD TAHIR; AKHTAR, 2015).

Avanços na área de medicina veterinária legal são importantes para elucidação de casos com envolvimento criminal de animais, obtendo informações que auxiliam a perícia veterinária, a fim de contribuir para responder a solicitação da autoridade policial ou judiciária, principalmente para casos de monitoramento da exploração ilegal de espécies relacionadas ao artigo 29 da Lei de Crimes Ambientais (COOPER, 1998; ALACS et al., 2010; FROSCH et al., 2011; TÚLIO et al., 2017).

A positividade demonstrada no exame de LAMP para *Trypanosoma cruzi* nas amostras abre portas para mais estudos na área para identificação de hospedeiros, reservatórios e compreensão de como o parasito se comporta (GÜRTLER; CARDINAL, 2015; CEVALLOS et al., 2017; HODO et al., 2018).

Além disso, torna-se relevante à implantação de conjuntos de políticas e normas operacionais rígidas para proteger os animais e também todo o contexto em que se inserem, ou seja, o meio ambiente, do qual faz parte também o ser humano. Trata-se de uma condição que permita prevenir, controlar, reduzir e/ou eliminar riscos inerentes às atividades que comprometam a saúde humana, animal e o meio ambiente, denominada saúde única (GOULD et al., 2013; CARDOSO et al., 2017).

A premissa por mais estudos futuros para determinar se a atividade ilícita (comércio ilegal de animais) pode estar relacionada com disseminação de enfermidades zoonóticas causadas por parasitas é necessária, visto os resultados observados (ESCH; PETERSEN, 2013; VALLAT et al., 2013; TOMASSONE et al., 2018).

A utilização de análises de risco de doenças pode funcionar de maneira eficaz quando utiliza-se as tecnologias disponíveis e os conhecimentos científicos, porém é uma assunto muito amplo e com frequentes descobertas que tornam a pesquisa com animais silvestres um tema atual e sobretudo relevante. Os danos provocados pela caça ilegal, tráfico e contrabando de animais podem ser diretos e indiretos, possuem importante implicação ambiental através do levantamento de evidências genéticas forenses sobre a identificação de animais e análise de risco de doenças de caráter zoonótico causadas por parasitos (ESCH; PETERSEN, 2013; POLAK; SMITH-BLACKMORE, 2014; MERIGUETI et al., 2017).

2. CONCLUSÕES GERAIS

O estudo demonstrou que foi possível realizar a identificação dos animais silvestres através do DNA mitocondrial e de pelos e também permitiu a identificação do protozoário *T. cruzi* nas amostras, indicando assim a possibilidade dos animais utilizados nestes estudos serem reservatórios do parasita.

3. CONCLUSIONES

El estudio ha demostrado que ha sido posible llevar a cabo la identificación de animales silvestres por ADN mitocondrial y de pelos y también ha probado la identificación del protozoo *T. cruzi* en muestras, y la posibilidad de que los animales utilizados en esta investigación sean reservorios del parásito.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ALACS, E. A.; GEORGES, A.; FITZSIMMONS, N. N.; ROBERTSON, J. DNA Detective: A Review of Molecular Approaches to Wildlife Forensics. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 6, n. 3, p. 180–194, 2010.
- AN, J.; LEE, M. yeong; MIN, M. S.; LEE, M. H.; LEE, H. A Molecular Genetic Approach for Species Identification of Mammals and Sex Determination of Birds in a Forensic Case of Poaching from South Korea. **Forensic Science International**, v. 167, n. 1, p. 59–61, 2007.
- ASHFORD, R. W. When Is a Reservoir Not a Reservoir ? Invasive Mycobacterium Marinum Infections. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1495–1496, 2003.
- 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, n. 2–3, p. 99–108, 2003.
- BESUSCHIO, S. A.; LLANO MURCIA, M.; BENATAR, A. F.; MONNERAT, S.; CRUZ MATA, I.; PICADO DE PUIG, A.; CURTO, M. de los Á.; KUBOTA, Y.; WEHRENDT, D. P.; PAVIA, P.; MORI, Y.; PUERTA, C.; NDUNG’U, J. M.; SCHIJMAN, A. G. Analytical Sensitivity and Specificity of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Kit Prototype for Detection of Trypanosoma Cruzi DNA in Human Blood Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2017.
- BONACCORSO, N. S. Aplicação Do Exame de Dna Na Elucidação De Crimes. **Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 1–193, 2005.
- BOSMALI, I.; GANOPOULOS, I.; MADEISIS, P.; TSAFTARIS, A. Microsatellite and DNA-Barcode Regions Typing Combined with High Resolution Melting (HRM) Analysis for Food Forensic Uses: A Case Study on Lentils (*Lens Culinaris*). **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 141–147, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.013>>.
- BOUSINI, S.; ATHANASIOU, L. V.; SPANAKOS, G.; NTOUSI, D.; DOTSIKA, E.; BISIA, M.; PAPADOPOULOS, E. Phlebotomine Sandflies and Factors Associated with Their Abundance in the Leishmaniasis Endemic Area of Attiki, Greece. **Parasitology Research**, p. 1–7, 2017.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS – ABNT. **NBR 6023: Informação e documentação – referências: elaboração.** Rio de Janeiro: 2005, 24p.

BRANICKI, W.; KUPIEC, T.; PAWLOWSKI, R. Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. **Journal of forensic sciences**, v. 48, n. 1, p. 83–87, 2003.

CARDOSO, S. D.; FARACO, C. B.; DE SOUSA, L.; DA GRAÇA PEREIRA, G. History and Evolution of the European Legislation on Welfare and Protection of Companion Animals. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 19, p. 64–68, 1 May 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1558787817300485>>.

Acesso em: 2 jun. 2018.

CARMO, R. R. do. Identificação de Animais Silvestres de Interesse Criminal Da Fauna Matogrossense Por Meio de DNA Mitocondrial. p. 86, 2011.

CEVALLOS, W.; FERNÁNDEZ-SOTO, P.; CALVOPIÑA, M.; FONTECHA-CUENCA, C.; SUGIYAMA, H.; SATO, M.; LÓPEZ ABÁN, J.; VICENTE, B.; MURO, A. LAMPimerus: A Novel LAMP Assay for Detecting Amphimerus Sp. DNA in Human Stool Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–16, 2017.

COOPER, J. E. What Is Forensic Veterinary Medicine? Its Relevance to the Modern Exotic Animal Practice. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 7, n. 4, p. 161–165, 1998. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055937X98800601>>.

DA COSTA LIMA, M. S.; HARTKOPF, A. C. L.; DE SOUZA TSUJISAKI, R. A.; OSHIRO, E. T.; SHAPIRO, J. T.; DE FATIMA CEPA MATOS, M.;

CAVALHEIROS DORVAL, M. E. Isolation and Molecular Characterization of Leishmania Infantum in Urine from Patients with Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 178, p. 248–251, 1 Feb. 2018. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17305004?_rdoc=1&_fmt=high&_origin=gateway&_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb&dgcid=raven_sd_via_email>. Acesso em: 11 jan. 2018.

DALTON, D. L.; KOTZE, A. DNA Barcoding as a Tool for Species Identification in Three Forensic Wildlife Cases in South Africa. **Forensic Science International**, v. 207, n. 1–3, p. e51–e54, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.12.017>>.

DANDRIEUX, J. R. S.; SACCHINI, F.; HARMS, G.; GLOBOKAR, M.; BALZER, H. J.; PANTCHEV, N. Canine Leishmania Infantum Infection: An Imported Case in UK after Staying in the Canary Islands. **Parasitology Research**, n. December 2011, p. 1–4, 2017.

DASZAK, P. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443–449, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5452.443>>.

DAWNAY, N.; OGDEN, R.; MCEWING, R.; CARVALHO, G. R.; THORPE, R. S. Validation of the Barcoding Gene COI for Use in Forensic Genetic Species Identification. **Forensic Science International**, v. 173, n. 1, p. 1–6, 2007.

DE SOUZA GODOI, P. A.; PIECHNIK, C. A.; DE OLIVEIRA, A. C.; SFEIR, M. Z.; DE SOUZA, E. M.; ROGEZ, H.; THOMAZ SOCCOL, V. QPCR for the Detection of Foodborne Trypanosoma Cruzi. **Parasitology International**, v. 66, n. 5, p. 563–566, 1 Oct. 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357691630469X?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

FAO; WHO. **Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Born Parasites**. [s.l: s.n.]

FERNANDA, E.; HERNANDEZ, T. Das Redes e Do Tráfico de Animais . v. 11, p. 271–281, [s.d.]

FERRI, G.; ALU, M.; CORRADINI, B.; LICATA, M.; BEDUSCHI, G. Species Identification through DNA “Barcodes.” **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 13, n. 3, p. 1–12, 2009. Disponível em:

<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/gtmb.2008.0144>>.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. Four Years of DNA Barcoding: Current Advances and Prospects. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 727–736, 2008.

FROSCH, C.; DUTSOV, A.; GEORGIEV, G.; NOWAK, C. Case Report of a Fatal Bear Attack Documented by Forensic Wildlife Genetics. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 4, p. 342–344, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.009>>.

GALETTI, M.; MOLEÓN, M.; JORDANO, P.; PIRES, M. M.; GUIMARÃES, P. R.; PAPE, T.; NICHOLS, E.; HANSEN, D.; OLESEN, J. M.; MUNK, M.; DE MATTOS, J. S.; SCHWEIGER, A. H.; OWEN-SMITH, N.; JOHNSON, C. N.; MARQUIS, R. J.; SVENNING, J. C. Ecological and Evolutionary Legacy of Megafauna Extinctions. **Biological Reviews**, 2017.

GARCIA DA COSTA FILHO, P. E. Medicina Legal e Criminalística. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 1, n. 1, p. 45, 2011. Disponível em:

<<http://www.rbc.org.br/ojs/index.php/rbc/article/view/33>>.

GERDIN, J. A.; MCDONOUGH, S. P. Forensic Pathology of Companion Animal Abuse and Neglect. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 994–1006, 2013.

Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813488895>>.

GOLDSTEIN, P. Z.; DESALLE, R. Integrating DNA Barcode Data and Taxonomic Practice: Determination, Discovery, and Description. **BioEssays**, v. 33, n. 2, p. 135–147, 2011.

GOULD, L. H.; WALSH, K. a; VIEIRA, A. R.; HERMAN, K.; WILLIAMS, I. T.; HALL, A. J.; COLE, D. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1998-2008. **Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)**, v. 62, n. 2, p. 1–34, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804024>>.

GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. Reservoir Host Competence and the Role of Domestic and Commensal Hosts in the Transmission of *Trypanosoma Cruzi*. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 32–50, 2015.

HAJIBABAEI, M.; SMITH, M. A.; JANZEN, D. H.; RODRIGUEZ, J. J.; WHITFIELD, J. B.; HEBERT, P. D. N. A Minimalist Barcode Can Identify a Specimen Whose DNA Is Degraded. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 959–964, 2006.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological Identifications through DNA Barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2002.2218>>.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences among Closely Related Species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270,

n. Suppl_1, p. S96–S99, 2003. Disponível em:

<<http://rsob.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsob.2003.0025>>.

HODO, C. L.; WILKERSON, G. K.; BIRKNER, E. C.; GRAY, S. B.; HAMER, S.

A. Trypanosoma Cruzi Transmission Among Captive Nonhuman Primates,

Wildlife, and Vectors. **EcoHealth**, 2018. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10393-018-1318-5>>.

IMAI, K.; TARUMOTO, N.; AMO, K.; TAKAHASHI, M.; SAKAMOTO, N.;

KOSAKA, A.; KATO, Y.; MIKITA, K.; SAKAI, J.; MURAKAMI, T.; SUZUKI, Y.;

MAESAKI, S.; MAEDA, T. Non-Invasive Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

by the Direct Boil Loop-Mediated Isothermal Amplification Method and

MinION™ Nanopore Sequencing. **Parasitology International**, v. 67, n. 1, p.

34–37, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.03.001>>.

INTERPOL. **Environmental Compliance and Enforcement Committee**

Advisory Board - Impact Report 2015 - 2017. [s.l: s.n.].

IYENGAR, A. **Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity**

conservation: A review **Journal for Nature Conservation**, 2014. .

JOHNSON, R. N.; WILSON-WILDE, L.; LINACRE, A. Current and Future

Directions of DNA in Wildlife Forensic Science. **Forensic Science**

International: Genetics, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.007>>.

KAFADAR, S.; KAFADAR, H. The Medico-Legal Evaluation of Injuries from

Falls in Pediatric Age Groups. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 31,

p. 52–55, 1 Apr. 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1752928X1500013X>>.

Acesso em: 2 jun. 2018.

KARAGIANNIS-VOULES, D. A.; SCHOLTE, R. G. C.; GUIMARÃES, L. H.;

UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Bayesian Geostatistical Modeling of

Leishmaniasis Incidence in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n.

5, 2013.

KARSTEN, C. L.; WAGNER, D. C.; KASS, P. H.; HURLEY, K. F. An

Observational Study of the Relationship between Capacity for Care as an

Animal Shelter Management Model and Cat Health, Adoption and Death in

Three Animal Shelters. **Veterinary Journal**, v. 227, n. August, p. 15–22, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.08.003>>.

KHATUN, M.; ALAM, S. M. S.; KHAN, A. H.; HOSSAIN, M. A.; HAQ, J. A.; ALAM JILANI, M. S.; RAHMAN, M. T.; KARIM, M. M. Novel PCR Primers to Diagnose Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood, Spleen or Bone Marrow Aspirates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 753–759, 1 Aug. 2017. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517302584>>.

Acesso em: 11 jan. 2018.

KHEDKAR, G. D.; ABHAYANKAR, S. B.; NALAGE, D.; AHMED, S. N.; KHEDKAR, C. D. DNA Barcode Based Wildlife Forensics for Resolving the Origin of Claw Samples Using a Novel Primer Cocktail. **Mitochondrial DNA**, v. 1736, p. 1–4, 2014. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19401736.2014.987270>>.

L. B. L. TEZZA, S. T. J. REIS, C. F. M. MOLENTO, R. C. M. G. Situação Da Disciplina de Medicina Veterinária Legal Em Cursos de Graduação No Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 1, p. 81–81, 2017.

LOURENÇO, J. L. M.; MINUZZI-SOUZA, T. T. C.; SILVA, L. R.; OLIVEIRA, A. C.; MENDONÇA, V. J.; NITZ, N.; AGUIAR, L. M. S.; GURGEL-GONÇALVES, R. High Frequency of Trypanosomatids in Gallery Forest Bats of a Neotropical Savanna. **Acta Tropica**, v. 177, n. August 2017, p. 200–206, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.012>>.

MCDONOUGH, S. P.; MCEWEN, B. J. Veterinary Forensic Pathology: The Search for Truth. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 875–877, 2016.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607–625, 1999.

MERIGUETI, Y. F. F. B.; SANTARÉM, V. A.; RAMIRES, L. M.; DA SILVEIRA BATISTA, A.; DA COSTA BESERRA, L. V.; NUCI, A. L.; DE PAULA ESPOSTE, T. M. Protective and Risk Factors Associated with the Presence of Toxocara Spp. Eggs in Dog Hair. **Veterinary Parasitology**, v. 244, n. April, p. 39–43, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.020>>.

MIRANDA, G. de; RODRIGUES, F.; PAGLIA, A. **Guia de Identificação de Pelos de Mamíferos Brasileiros**. [s.l: s.n.]

- MORAITIS, K.; SPILIOPOULOU, C. Forensic Implications of Carnivore Scavenging on Human Remains Recovered from Outdoor Locations in Greece. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 298–303, 1 Aug. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1752928X10000600>>. Acesso em: 2 jun. 2018.
- MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Accurate, and Cost-Effective Diagnostic Method for Infectious Diseases. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 15, n. 2, p. 62–69, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>>.
- MUHAMMAD TAHIR, H.; AKHTAR, S. Services of DNA Barcoding in Different Fields. **Mitochondrial DNA**, 2015.
- MUNRO, R.; MUNRO, H. M. C. Some Challenges in Forensic Veterinary Pathology: A Review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 57–73, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.10.001>>.
- MWALE, M.; DALTON, D. L.; JANSEN, R.; DE BRUYN, M.; PIETERSEN, D.; MOKGOKONG, P. S.; KOTZÉ, A. Forensic Application of DNA Barcoding for Identification of Illegally Traded African Pangolin Scales. **Genome**, v. 60, n. 3, 2017.
- NEWBERY, S. G.; COOKE, S. W.; MARTINEAU, H. M. A Perspective on Veterinary Forensic Pathology and Medicine in the United Kingdom. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 894–897, 2016.
- NZELU, C. O.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; SAKURAI, T.; MARTINI-ROBLES, L.; UEZATO, H.; MIMORI, T.; KATAKURA, K.; HASHIGUCHI, Y.; KATO, H. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Mass-Screening of Sand Flies for Leishmania Infection. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.016>>.
- OGDEN, R.; LINACRE, A. Wildlife Forensic Science: A Review of Genetic Geographic Origin Assignment. **Forensic Science International: Genetics**, v. 18, 2015.
- PESAVENTO, P. A.; MURPHY, B. G. Common and Emerging Infectious Diseases in the Animal Shelter. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 478–491, 2014. Disponível em:

<<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813511129>>.

POLAK, K. C.; SMITH-BLACKMORE, M. Animal Shelters: Managing Heartworms in Resource-Scarce Environments. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 1–2, p. 78–82, 2014.

POLLANEN, M. S. The Rise of Forensic Pathology in Human Medicine: Lessons for Veterinary Forensic Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 878–879, 2016.

POZEBON, D.; SCHEFFLER, G. L.; DRESSLER, V. L. Elemental Hair Analysis: A Review of Procedures and Applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 992, 2017.

REIS, S. T. J.; LAVOR, L. M. S. de; SANT'ANA, L. V.; TREMORI, T. M.; GONZALEZ, V. A. T.; BRÜGGER, P. Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in Investigations of Wildlife Crimes, 2013-2014. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 5, n. 2, p. 198–214, 2016.

REPORT, M. W. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks—United States, 2006. **Annals of Emergency Medicine**, v. 55, n. 1, p. 47–49, 2010. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064409017119>>.

RIBAS, L. M.; RITA, M.; MASSAD, R.; ROCHA, N. S. Necropsia Virtual Em Animais. 2016.

SATO, H. Preliminary Study of Hair Form of Japanese Head Hairs Using Image Analysis. **Forensic Science International**, v. 131, n. 2–3, p. 202–208, 2003.

SATO, I.; NAKAKI, S.; MURATA, K.; TAKESHITA, H.; MUKAI, T. Forensic Hair Analysis to Identify Animal Species on a Case of Pet Animal Abuse.

International Journal of Legal Medicine, v. 124, n. 3, p. 249–256, 2010.

STAATS, M.; ARULANDHU, A. J.; GRAVENDEEL, B.; HOLST-JENSEN, A.; SCHOLTENS, I.; PEELEN, T.; PRINS, T. W.; KOK, E. **Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification** **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2016. .

TOMASSONE, L.; BERRIATUA, E.; DE SOUSA, R.; DUSCHER, G. G.; MIHALCA, A. D.; SILAGHI, C.; SPRONG, H.; ZINTL, A. Neglected Vector-Borne Zoonoses in Europe: Into the Wild. **Veterinary Parasitology**, v. 251, n. December 2017, p. 17–26, 2018. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401717305307>>.

TREMORI, T. M.; KAMIGUCHI, I. E.; FERRAZ DE CAMARGO DUARTE, B. W.; RODRIGUES MASSAD, M. R.; RIBAS, L. M.; SOUSA ROCHA, N. Corpus Delicti Exam on Cat (Felis Catus) Victim of Firearms Caused Wounds- Case Report. **Journal of Forensic Research**, v. 08, n. 02, p. 8–9, 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/corpus-delicti-exam-on-cat-felis-catus-victim-of-firearms-caused-woundscase-report-2157-7145-1000369.php?aid=87168>>.

TREMORI, T. M.; ROCHA, N. S. Exame Do Corpo de Delito Na Perícia Veterinária (Ensaio). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP2**, v. 11, n. 3, p. 30–25, 2013.

TRIDICO, S. R.; HOUCK, M. M.; KIRKBRIDE, K. P.; SMITH, M. E.; YATES, B. C. Morphological Identification of Animal Hairs: Myths and Misconceptions, Possibilities and Pitfalls. **Forensic Science International**, v. 238, p. 101–107, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.023>>.

TÚLIO, S.; REIS, J.; SAID DE LAVOR, L. M.; SANT 'ANA, L. V.; TREMORI, T. M.; GONZALEZ, A. T.; BRÜGGER, P.; REIS, S. T. J. Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in Investigations of Wildlife Crimes. **Brazilian Journal of Forensic Sciences Medical Law and Bioethics**, v. 5, n. 52, 2016. Disponível em: <www.ipebj.com.br/forensicjournal>.

TÚLIO, S.; REIS, J.; TREMORI, T. M.; RITA, M.; MASSAD, R.; DIEHL, N. F.; BECK, R. M.; DE, A. C. B.; PINTO, C. F.; RIBAS, L. M.; ROCHA, N. S. Brazilian Journal of Forensic Sciences , Medical Law and Bioethics Estudo Retrospectivo Da Destinação de Aves Silvestres Apreendidas Pela Polícia Militar Ambiental Do Estado de São Paulo No Período de 2012 a 2015. v. 6, n. 4, p. 599–608, 2017.

VALLAT, B.; THIERMANN, A.; JEBARA, K. Ben; DEHOVE, A. Notification of Animal and Human Diseases : The Global Legal Basis OIE Notification System. **Revue scientifique et technique**, v. 32, n. 2, p. 331–335, 2013. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/M_Karim_Ben_Jebara/publication/260250450_Notification_of_animal_and_human_diseases_the_global_legal_basis/lin

ks/54e33dcd0cf2d618e1962c54.pdf%5Cnhttp://www.oie.int/doc/ged/D12775.PDF>.

VERMA, S.; SINGH, R.; SHARMA, V.; BUMB, R. A.; NEGI, N. S.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Development of a Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis and Assessment of Cure of Leishmania Infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 223, 2017. Disponível em:

<<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2318-8>>.

WAN, Q. H.; FANG, S. G. Application of Species-Specific Polymerase Chain Reaction in the Forensic Identification of Tiger Species. **Forensic Science International**, v. 131, n. 1, p. 75–78, 2003.

WOODALL, L. C.; GWINNETT, C.; PACKER, M.; THOMPSON, R. C.; ROBINSON, L. F.; PATERSON, G. L. J. Using a Forensic Science Approach to Minimize Environmental Contamination and to Identify Microfibres in Marine Sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 95, n. 1, p. 40–46, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.044>>.

YANCY, H. F.; FRY, F. S.; RANDOLPH, S. C.; DEEDS, J.; IVANOVA, N. V.; GRAINGER, C. M.; HANNER, R.; WEIGT, L. A.; DRISKELL, A.; HUNT, J.; ORMOS, A.; HEBERT, P. D. N. A Protocol for Validation of DNA-Barcoding for the Species Identification of Fish for FDA Regulatory Compliance. **Laboratory Information Bulletin 4420**, v. 24, n. 4420, p. 1–25, 2009. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm169034.htm>>.