

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**SEXAGEM MOLECULAR EM AVES: CONTRIBUIÇÕES À CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA
E À DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA**

Mestranda: Bianca Picado Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**SEXAGEM MOLECULAR EM AVES: CONTRIBUIÇÕES À CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA
E À DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas/AC: Genética.

Mestranda: Bianca Picado Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

“..Tudo o que um sonho precisa para
ser realizado é alguém que acredite
que ele possa ser realizado..”

[Roberto Shinyashiki](#)

“..Maria passa na frente e vai abrindo estradas e caminhos. Abrindo portas e portões. Abrindo
casas e corações..”

Oração "Maria, passa na frente"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pelo dom do discernimento e por iluminar meu caminho me dando forças para seguir sempre em frente.

Agradeço toda minha família, especialmente a meus pais, Rafael e Sandra, e aos meus irmãos, Renato e Álvaro, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, com muito amor, me incentivando a lutar pelos meus sonhos e servindo de exemplo.

Agradeço a confiança e os ensinamentos de minha orientadora, Professora Doutora Adriane Pinto Wasko, que sempre, com muita paciência e generosidade, se mostrou solícita em todas as fases do meu aprendizado.

Agradeço aos professores do Departamento de Genética e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, pelo conhecimento transmitido em sala de aula.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Genética Animal e do Laboratório de Genômica Integrativa, especialmente a Jesica Ruiz, Magali Lira, Valquíria Santiloni e a Professora Doutora Lígia Mota, pela troca de experiência e idéias que puderam contribuir para o melhoramento deste trabalho e pelos momentos de confraternização.

Agradeço ao Instituto Floravida, ao Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres da UNESP de Botucatu, ao Criadouro Poços de Caldas e ao Criadouro C.A., pela disponibilidade dos animais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Professora Doutora Miriam Tsunemi, do Departamento de Bioestatística da UNESP de Botucatu, por todo apoio e trabalho realizado nas análises estatísticas do presente trabalho e pela acessibilidade e disponibilidade para reuniões necessárias.

Agradeço aos meus amigos, especialmente a Alicia Suman, Carolina Furlan, Lais Thomas, Naiara Cinegaglia, Giovana Salomão, Camila Libardi, por todo apoio e amizade verdadeira.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concessão da bolsa de pesquisa.

RESUMO

Entre os animais silvestres envolvidos em tráfico e comércio ilegal no Brasil, as aves compreendem um dos grupos mais atingidos, especialmente devido a características como canto e colorido das penas. Atualmente, análises genéticas representam uma das formas mais eficazes de gerar dados para solucionar e minimizar os resultados de crimes ambientais e comércio ilegal de animais silvestres. Desta forma, este trabalho teve como objetivo realizar análises genéticas de sexagem em diversas aves, incluindo espécies comumente associadas ao tráfico de animais e apreendidas pela Polícia Ambiental e pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), e gerar um material de divulgação científica sobre tráfico e conservação deste grupo de vertebrados. Amostras de DNA foram obtidas de penas e sangue de 124 exemplares de 53 espécies das famílias Accipitridae, Cacatuidae, Cardinalidae, Cariamidae, Columbidae, Cuculidae, Emberezidae, Falconidae, Icteridae, Musophagidae, Psittacidae, Ramphastidae, Sturnidae, Thraupidae, Tinamidae, Trochilidae e Turdidae, mantidas junto a um Centro de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres - CETAS (ONG Instituto Floravida, Botucatu, SP), a um Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres - CEMPAS (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP) e a dois criadouros científicos de fauna silvestre para fins de conservação (Criadouro C.A., Itatiba, SP e Criadouro Poços de Caldas, Poços de Caldas, MG). Perfis genéticos sexo-específicos foram gerados por meio da amplificação de segmentos de DNA dos cromossomos Z e W. Um conjunto de *primers* que se anelam a regiões de éxons dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* (*chromo helicase-DNA binding*) e que amplificam uma região de íntron que difere em tamanho entre os dois genes foi utilizado em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 2%. Dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos foram evidenciados para fêmeas e um único fragmento foi evidenciado para machos. Adicionalmente, foram identificados polimorfismos de tamanho dos genes *CHD* comparando-se espécies distintas. Fragmentos de DNA associados ao gene *CHD-Z* de *Bolborhynchus lineola* (Psittacidae), *Columba livia* (Columbidae) e *Falco femoralis* (Falconidae) foram caracterizados e comparados com sequências depositadas em bancos de dados, o que permitiu evidenciar que maiores níveis de similaridade nucleotídica podem ser correlacionados a relações filogenéticas. Diversas das espécies analisadas foram comumente associadas ao tráfico ilegal de aves - 31 espécies encontram-se listadas pelo *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES) e destas, 3 espécies (*Brotogeris tirica* - periquito rico, *Paroaria gularis* - cardeal da Amazônia e *Amazona*

rhodocorytha - chauá) são endêmicas do Brasil. Adicionalmente, 11 espécies encontram-se listadas nas categorias "vulnerável", "quase ameaçada", "em perigo" ou "criticamente em perigo" pela União Internacional para Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature* - IUCN). Os dados gerados permitiram identificar corretamente machos e fêmeas e subsidiar planos de formação de casais e vêm sendo utilizados em programas conservacionistas de recuperação, manutenção e reprodução de aves em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução destes animais. Além disso, este trabalho permitiu a interação entre pesquisa e extensão universitária, por meio de prestação de serviços associada a laudos de sexagem molecular e por meio de divulgação científica associada à conscientização da população sobre tráfico de aves e conservação genética.

Palavras chave: Aves, Sexagem, Genética da Conservação, Tráfico.

ABSTRACT

Birds represent a large part of the animals associated to illegal trade and commerce in Brazil, mainly due to some characteristics as song and feathers colors. Nowadays, genetic analyses comprehend one of the most efficient approaches to generate data in order to solve and minimize the results of environmental crimes and illegal trade of wild animals. Therefore, this work intent to perform sex identification genetic analyses in several birds, including species that are commonly associated to illegal animal trade and apprehended by the Environmental Policy and by IBAMA (Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources), and generate a scientific broadcasting material about illegal trade and conservation of this vertebrate group. DNA samples were obtained from feathers and blood of 124 individuals that belong to 53 species of the families Accipitridae, Cacatuidae, Cardinalidae, Cariamidae, Columbidae, Cuculidae, Emberezidae, Falconidae, Icteridae, Musophagidae, Psittacidae, Ramphastidae, Sturnidae, Thraupidae, Tinamidae, Trochilidae, and Turdidae, maintained by a Wildlife Reception, Screening and Rehabilitation Center (Floravida Institute NGO), a Wildlife Animal Health and Research Center (Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, São Paulo State University Botucatu, SP) and to two scientific breeding grounds of wild fauna based on conservation purposes (Criadouro C.A., Itatiba, SP and Criadouro Poços de Caldas, Poços de Caldas, MG). Sex-specific genetic profiles were generated by the amplification of DNA segments of the Z and W chromosomes. A primer set that anneal to exon regions of the *CHD-Z* and *CHD-W* (*chromo helicase-DNA binding*) genes and that amplify an intron region that differ in size between the two genes was used in PCR (Polymerase Chain Reaction) and the amplification products were visualized in 2% agarose gel. Two different size DNA fragments were evidenced for females and a single fragment was evidenced for males. Additionally, size polymorphisms in the *CHD* genes were identified among different species. DNA fragments associated to the *CHD-Z* gene of *Bolborhynchus lineola* (Psittacidae), *Columba livia* (Columbidae), and *Falco femoralis* (Falconidae) were characterized and compared to database sequences, which led to evidence that higher nucleotide similarity levels can be correlated to phylogenetic relationships. Several analyzed species were commonly associated to illegal birds trade - 31 species were set up at the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) and, among these, 3 species (*Brotogeris tirica* - plain parakeet, *Paroaria gularis* - red-capped cardinal, and *Amazona rhodocorytha* - red-browed parrot) are Brazilian endemic. Furthermore, 11 species are current listed as "vulnerable", "almost threatened", "endangered" or "critically endangered" by the International Union for

Conservation of Nature (IUCN). The generated data permitted the accurate identification of males and females and can subside couple design plans and have been used on conservation programs of recovery, maintenance and reproduction of captive birds and further release or reintroduction of these animals. Furthermore, this work permitted an interaction between research and university extension, throughout a service offer associated to molecular sexing reports and a scientific diffusion associated to population consciousness on birds trade and conservation genetics.

Key words: Birds, Sexing, Conservation Genetics, Illegal Trade.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biodiversidade de aves no Brasil	4
2.2 Classificação das aves.....	7
2.3 Tráfico Ilegal de animais	7
2.4 Soltura e reintrodução de aves.....	11
2.5 Genética da conservação e aplicação de marcadores moleculares	12
2.6 Identificação do sexo em aves	14
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Materiais	17
4.2 Métodos	25
4.2.1 Análises genéticas	25
4.2.1.1 Coleta de material biológico	25
4.2.1.2 Extração de DNA	26
4.2.1.2.1 Extração de DNA de penas.....	26
4.2.1.2.2 Extração de DNA de sangue	27
4.2.1.3 Análise da qualidade e quantidade das amostras de DNA.....	27
4.2.1.4 Sexagem molecular.....	28
4.2.1.5 Clonagem de fragmentos de DNA.....	29
4.2.1.5.1 Ligação inserto-plasmídeo	29
4.2.1.5.2 Transforma�o de bactérias competentes.....	30
4.2.1.5.3 Identifica�o de plasmídeos recombinantes	30
4.2.1.5.4 Mini-preparações para obtenção de plasmídeos recombinantes	31
4.2.1.6 Sequenciamento nucleotídico	32
4.2.1.7 Análise das sequências nucleotídicas	33
4.2.2 Divulgação Científica	33
4.2.2.1 Levantamento de conhecimentos gerais sobre genética forense e conservação biológica.....	33

4.2.2.1.1	Elaboração de questionário.....	33
4.2.2.1.2	Aplicação de questionário	34
4.2.2.1.3	Avaliação dos questionários.....	35
4.2.2.2	Elaboração de <i>folder</i> de divulgação científica.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	CAPÍTULO 1	36
5.1.1	Espécies analisadas	36
5.1.2	Análises genéticas	47
5.1.2.1	Isolamento de DNA	47
5.1.2.2	Sexagem molecular.....	49
5.1.2.3	Caracterização dos segmentos de DNA associados aos genes <i>CHD</i>	56
5.2	CAPÍTULO 2	60
5.2.1	Divulgação científica	60
5.2.1.1	Levantamento de dados.....	60
5.2.1.2	<i>Folder</i> informativo	73
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO I - QUESTIONÁRIO ELABORADO PARA LEVANTAMENTO DE DADOS DAS ÁREAS DE GENÉTICA FORENSE E CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA		83
ANEXO II - LAUDO DE SEXAGEM MOLECULAR EMITIDO PELO LABORATÓRIO DE GENÉTICA ANIMAL DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNESP		84
ANEXO III - <i>FOLDER</i> DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA ELABORADO PARA CONSCIENTIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ACERCA DA PROBLEMÁTICA ASSOCIADA AO TRÁFICO ILEGAL DE AVES E DA APLICAÇÃO DA GENÉTICA FORENSE NA ÁREA DE CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA		85
ANEXO IV - TABELAS AUXILIARES REFERENTES ÀS VARIÁVEIS ANALISADAS DO QUESTIONÁRIO.....		89

1 INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVAS

O Brasil apresenta a terceira maior diversidade de aves do mundo, com cerca de 1.800 espécies, das quais mais de 13% são endêmicas (SABINO & PRADO, 2003; CBRO, 2013). Desta forma, o país pode ser considerado um dos mais importantes em relação a investimentos em conservação neste grupo de vertebrados (SICK, 1997).

Apesar da grande diversidade de aves no país, tem havido um crescente declínio no número de exemplares de diversos grupos, especialmente devido a intervenções humanas, como o comércio ilegal (COLLAR *et al.*, 1997; MARINI & GARCIA, 2005). O tráfico internacional de aves e de outros animais silvestres é uma atividade intensa no Brasil (LACAVA, 2000; RENCTAS, 2002). Estima-se que o comércio ilegal de animais silvestres movimente anualmente de 10 a 20 bilhões de dólares no mundo e, no ano de 2001, o Brasil foi considerado o terceiro país em maior número de animais envolvidos no tráfico ilegal (WEBB, 2001).

Dentre os animais traficados, as aves apresentam características que resultam em grande interesse para o comércio ilegal, como sua beleza, cores das penas e seu canto (PEREIRA & BRITO, 2005), além de ampla distribuição geográfica e alta diversidade (POUGH *et al.*, 2003). Segundo dados do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), aproximadamente 82,71% dos animais contrabandeados no país são aves (IBAMA, 2002). Estima-se que 4 bilhões de aves sejam comercializadas ilegalmente por ano no Brasil. Destas, 70% são destinadas para o comércio interno e cerca de 30% vão para o mercado da Europa, Ásia e Estados Unidos (VANNUCCI-NETO, 2000; ARAUJO *et al.*, 2010).

Com base nas leis e decretos associados a crimes contra animais silvestres, os órgãos de fiscalização, frente a um delito, normalmente autuam o infrator e apreendem os animais. A resolução de crimes ambientais, relacionados principalmente a tráfico/apreensões ilegais de animais, abrange uma área relacionada a estudos da ciência forense. Tais estudos, em que o conhecimento científico e suas ferramentas são geralmente empregados em casos de investigação sob responsabilidade do foro judicial, são muito mais amplos do que somente resoluções de questionamentos jurídico-policiais. Incluem também análises genéticas em espécies animais, vegetais e de microorganismos, que podem ser direcionadas a resoluções de

incertezas taxonômicas, testes de paternidade, identificação de origem e de sexo, entre outras aplicações.

Em geral, um estudo forense é interdisciplinar e envolve diferentes campos do conhecimento, como Física (análise balística de projéteis), Química (análise de sangue, gotas de saliva, fios de cabelo e pêlos, substâncias, etc.), Biologia (análise de tipagem sanguínea, de DNA, morfologia de tecidos e órgãos) e até Matemática/Estatística (JOBILING & GILL, 2004). Desta forma, a ciência forense tem se beneficiado e cresceu muito nos últimos anos em decorrência de novas metodologias e tecnologias que surgiram nestas diversas áreas (SILVA & PASSOS, 2006).

Entre as diferentes vertentes do campo forense, a Genética representa uma área extremamente importante na identificação por DNA. Atualmente, esta área passou a fazer parte do vocabulário comum devido ao impacto dos perfis de DNA sobre a detecção de crimes e identificação de paternidade em humanos e tem sido temática de diversos programas de televisão, noticiários e reportagens. Apesar da grande difusão de informações nesta área, dados de caráter geral e de caráter técnico muitas vezes não são corretamente divulgados, interpretados e/ou compreendidos. Adicionalmente, as análises forenses se sobrepõem, em muitos casos, a uma área da biologia denominada de biologia da conservação que, embora venha crescendo extremamente nos últimos anos em termos de metodologias e aplicações, é ainda desconhecida da população em geral.

Atualmente, grande parte das análises voltadas à conservação de diferentes espécies, especialmente silvestres, vem sendo realizada por meio de estudos genéticos. Desta forma, uma subárea da Genética, denominada de genética da conservação, visa, entre outras aplicações, a identificação de espécies, subespécies, híbridos e populações, determinação de origem, identificação de níveis de diversidade genética, determinação de estrutura populacional e de gargalos populacionais, identificação de sexo, determinação de paternidade e outros níveis de parentesco. Tais dados podem ser obtidos por meio da utilização de diferentes metodologias, especialmente aquelas que empregam marcadores moleculares. Quando associados ao campo da genética forense, estes dados são, muitas vezes, negligenciados, especialmente por desconhecimento de sua importância e aplicação.

Animais silvestres capturados sem licença prévia do IBAMA, com o intuito de tráfico e venda irregulares, constituem um dos crimes mais largamente realizados no Brasil (LACAVA, 2000; RENTAS, 2002). Os animais apreendidos necessitam ser inicialmente alojados, alimentados e receber cuidados médicos-veterinários, especialmente devido os maus tratos e ao estresse a que foram geralmente submetidos. Posteriormente, há necessidade de serem incluídos em programas de manutenção, manejo e reprodução em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução (BRANCO, 2008). Desta forma, governos, zoológicos, criadouros científicos, comerciais e conservacionistas têm hoje um importante papel em programas de conservação de espécies. Análises genéticas podem contribuir não somente para a elucidação destes crimes como também contribuir com tais programas de manejo e reprodução em cativeiro e programas de soltura ou reintrodução desses animais na natureza.

Algumas espécies que compõem o grupo das aves não apresentam dimorfismo sexual aparente que permita a diferenciação morfológica externa entre machos e fêmeas (TELL & LASLEY, 1991). Desta forma, um dos exemplos da contribuição da Genética para a área forense associada ao tráfico e comércio ilegais deste grupo de animais refere-se à correta determinação do sexo. Este dado permite a proposição de estratégias de formação de grupos ou casais objetivando a reprodução em cativeiro e/ou uma posterior soltura ou reintrodução monitorada de indivíduos, casais e/ou dos descendentes na natureza, sendo considerada uma das principais medidas para que se obtenha sucesso em programas conservacionistas (RENTAS, 2002).

Atualmente, uma das maneiras mais seguras e efetivas de realizar a identificação de machos e fêmeas em diversas espécies de aves é por meio da denominada “sexagem molecular”, em que se analisa uma determinada porção do genoma que apresenta diferenças entre os sexos. Como as aves apresentam um sistema de determinação sexual do tipo ZZ (machos) / ZW (fêmeas), um marcador ideal para identificação de sexo nestes animais pode ser considerado um DNA único ao cromossomo sexual W, presente unicamente nas fêmeas (MIYAKI *et al.*, 1998).

Dado o exposto, o presente trabalho teve como objetivo realizar análises genéticas em diferentes aves, incluindo espécies comumente apreendidas pela Polícia Ambiental e pelo IBAMA, visando a identificação do sexo, e gerar um material de divulgação científica sobre tráfico ilegal de aves e conservação genética neste grupo de vertebrados. O desenvolvimento de um trabalho

tanto experimental como teórico de análises forenses associadas à área de conservação genética mostrou-se importante para, de forma direta e indireta, auxiliar a minimizar os efeitos drásticos de um dos maiores crimes cometidos no Brasil - o tráfico ilegal de animais silvestres. Os resultados obtidos vêm sendo utilizados para subsidiar programas de conservação de aves, especialmente àquelas pertencentes a grupos comumente associados ao tráfico ilegal de animais silvestres, como Psittacidae, Emberezidae, Thraupidae, Fringiliidae, Turdidae, Cardinalidae, Ramphastidae e Cracidae.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiversidade de aves no Brasil

O Brasil possui uma grande biodiversidade, apresentando o maior número de espécies conhecidas de mamíferos, peixes dulcícolas, anfíbios e plantas superiores. Além disso, é considerado o terceiro país em riqueza de aves e quinto em répteis (MITTERMEIER *et al.*, 1997; SABINO & PRADO, 2004) (Tabela 1). Desta forma, abriga uma das mais diversas avifaunas do mundo, sendo o número de espécies estimado em cerca 1.800. Adicionalmente, diversas espécies de aves são endêmicas, tendo uma distribuição geográfica restrita ao Brasil (MITTERMEIER *et al.*, 1997; NATURE SERVE, 2004; CBRO, 2013; IUCN, 2013).

Tabela 1: Diversidade de vertebrados (em número de espécies descritas) no Brasil e no mundo, percentual de espécies endêmicas no Brasil e posição do país no *ranking* mundial de diversidade. N, número de espécies (Retirado de SABINO & PRADO, 2004).

Classe	N espécies Mundo	N espécies Brasil	Endemismo Brasil (%)	Rank diversidade Brasil
<i>Agnatha</i>	104	04	-	-
<i>Chondrichthyes</i>	960	139 marinhos 16 água doce	- 23%	- -
<i>Osteichthyes</i>	ca. 27.400	1.155 marinhos 2.106 água doce	ca. 10% -	- 1
<i>Amphibia</i>	5.504	775	57 %	1
<i>Reptilia</i>	8.163	633	37 %	5
<i>Aves</i>	9.900	1.696	11 %	3
<i>Mammalia</i>	5.023	541 ¹	25 %	1
TOTAL	ca. 57.054	7.061	-	1

Apesar de atualmente considerar-se que a avifauna brasileira seja constituída por um grande número de espécies, sendo aproximadamente 234 endêmicas (CBRO, 2013), o conhecimento desta diversidade de aves começou muito tardiamente, sendo o Brasil um dos últimos países das Américas a ter a sua natureza explorada de maneira mais consistente e organizada. Esta particularidade provavelmente está associada às restrições impostas pela Coroa Portuguesa à entrada de pesquisadores estrangeiros no Brasil, fato que somente foi alterado a partir da fuga da família real para o Rio de Janeiro, no começo do século XIX (SICK, 1985).

Até então, muito do que se conhecia sobre a avifauna brasileira derivava principalmente dos textos de J. Marcgrave (1648, 1942), largamente aproveitados por Carolus Linnaeus em suas edições do *Systema Naturae*. Entretanto, os dados advindos destes autores apenas forneciam uma fraca visão da diversidade da fauna brasileira, que só começou a ser conhecida de uma forma sistemática a partir das expedições de diversos naturalistas como Spix, Wied e Natterer (PAPAVERO, 1971; VANZOLINI, 1996). Adicionalmente, as coleções remetidas para o Museu de História Natural de Viena foram estudadas por August von Pelzeln (1871) que, de maneira pioneira, com inusitada visão biogeográfica e com base em estudos publicados por outros pesquisadores, tentou classificar a avifauna brasileira dividindo o país em três “províncias biogeográficas” (Avifauna Austral, Amazônica e Boliviana-Brasileira), além de comparar avifaunas regionais (Santa Catarina - Rio Grande do Sul com a avifauna do Uruguai) (DEAN, 1995; STRAUBE, 2000). Ao longo dos anos subsequentes, diversos estudos e registros foram realizados em relação à biodiversidade de aves no Brasil e dados do número de espécies deste grupo de vertebrados e de caracterização de seus biomas vêm sendo constantemente revisados e atualizados, especialmente com o apoio da Sociedade Brasileira de Ornitologia (SBO), por meio do estabelecimento do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO). Os objetivos desse comitê incluem acumular, revisar e analisar os relatos de novas espécies e de sua área de distribuição no país.

Embora todas as regiões brasileiras apresentem grande número de espécies de aves, esta distribuição é desigual, estando a maior diversidade de espécies concentrada na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica (MARINI & GARCIA, 2005; CBRO, 2013). Grande parte da avifauna brasileira, correspondente a espécies residentes, é encontrada na Floresta Amazônica

(cerca de 1.300 espécies). Adicionalmente, esta região também apresenta maior grau de endemismo (20% das espécies) (MITTERMEIER *et al.*, 2003). Aproximadamente 1.020 espécies de aves são encontradas ao longo dos fragmentos restantes da Mata Atlântica, sendo 18% destas consideradas endêmicas (MMA, 2000). O Cerrado, dominado pela vegetação de savana, é o terceiro bioma mais rico do país, com 837 espécies de aves (4,3% endêmicas) (SILVA, 1995; CAVALCANTI, 1999; SILVA & BATES, 2002; LOPES, 2004). A Caatinga, uma vegetação de matas secas situada no Nordeste do Brasil, possui 510 espécies de aves (2,9% endêmicas) (SILVA *et al.*, 2003) e os Campos Sulinos, que correspondem a uma extensão dos Pampas argentinos no Brasil, têm 476 espécies e um grau de endemismo de apenas 0,4% (MMA, 2000). O Pantanal, a maior área alagada da América do Sul (HARRIS *et al.*, 2005), possui 463 espécies de aves, mas nenhuma é endêmica deste bioma brasileiro (TUBELIS & TOMAS, 2003).

Adicionalmente, aproximadamente 130 espécies de famílias de aves tipicamente marinhas habitam áreas costeiras do Brasil, embora nenhuma espécie seja endêmica (SICK, 1993; VOOREN & BRUSQUE, 1999). Muitas espécies aquáticas migrantes, especialmente oriundas do hemisfério norte, deslocam-se por longas distâncias e se congregam, sazonalmente, ao longo da costa ou nas grandes bacias de drenagem brasileiras (SICK, 1993).

A despeito desta grande diversidade de aves encontradas em todos os biomas brasileiros, intervenções humanas, especialmente associadas à destruição e/ou fragmentação de *habitats* e mudanças climáticas, têm tido impactos negativos nas populações, uma vez que diminuem a disponibilidade de recursos e modificam as condições de seus ambientes (PRIMACK & RODRIGUES, 2001; SEGELBACHER *et al.*, 2010). Os resultados destes impactos podem ser claramente visualizados pelo número de espécies de aves ameaçadas de extinção, sendo o Brasil o país que apresenta o maior número de espécies neotropicais categorizadas como "criticamente em perigo", "em perigo" ou "vulnerável" (COLLAR *et al.*, 1997; IUCN, 2013). Este cenário somente poderá ser minimizado com um maior número de informações sobre as espécies e suas áreas de ocorrência, com o intuito de elaborar medidas conservacionistas e com a promoção de políticas públicas de proteção às aves brasileiras.

2.2 Classificação das aves

A classificação científica dos animais refere-se ao campo da taxonomia ou zoologia sistemática. Em aves, como nos demais grupos animais, esta classificação foi iniciada com base em dados morfológicos e anatômicos e, até o presente, baseia-se principalmente em tais caracteres (SICK, 1985). Entretanto, dados bioquímicos, fisiológicos, etológicos e genéticos também passaram a ser utilizados em estudos taxonômicos e filogenéticos.

As aves apresentam características como bipedia, homeotermia, oviparidade, presença de penas, apêndices locomotores anteriores modificados em asas, bico córneo e ossos pneumáticos. Apresentam uma grande diversidade morfológica e de tamanho e habitam todos os ecossistemas do globo, do Ártico à Antártica. Este grupo de vertebrados pertence a uma classe específica, dividida em duas subclasses: (1) *Archaeornithes*, que compreende aves ancestrais, representadas por *Archaeopteryx*, e (2) *Neornithes*, que corresponde às aves verdadeiras e engloba tanto representantes fósseis (como *Hesperornis*, do período Cretáceo) como representantes atuais. Embora, até o momento, não exista uma proposição única em relação ao número de espécies de aves e como estas são classificadas, grande parte dos autores adota a proposição de subdivisão dos *Neornithes* em duas Superordens - *Paleognathae* (Ordens *Apterygiformes*, *Dinornithiformes*, *Casuariiformes*, *Aepyornithiformes*, *Struthioniformes*, *Rheiformes* e *Tinamiformes*) e *Neognathae* (Ordens *Sphenisciformes*, *Gaviiformes*, *Podicipediformes*, *Procellariiformes*, *Pelecaniformes*, *Ciconiiformes*, *Anseriformes*, *Accipitriformes*, *Falconiformes*, *Galliformes*, *Gruiformes*, *Charadriiformes*, *Columbiformes*, *Psittaciformes*, *Cuculiformes*, *Strigiformes*, *Caprimulgiformes*, *Apodiformes*, *Coliiformes*, *Trogoniformes*, *Coraciiformes*, *Piciformes* e *Passeriformes*). Dentre as diferentes ordens, os *Passeriformes* (pintassilgos, canários, pardais, cotovias e sabiás, entre outros) compreendem o maior número de espécies - acima de 5 mil, o que corresponde a mais da metade de todas as espécies conhecidas (DEL HOYO *et al.*, 1992).

2.3 Tráfico ilegal de animais

O ritmo atual de destruição, alteração e fragmentação de ambientes naturais, devido ao crescente impacto das atividades humanas, tem levado a uma alarmante perda da biodiversidade.

Além disso, o tráfico ilegal de animais silvestres (naturais de determinado país ou região, pertencentes às espécies nativas, migratórias, aquáticas ou terrestres, que tenham a sua vida ou parte dela ocorrendo naturalmente dentro dos limites do território nacional e suas águas jurisdicionais), definido pela retirada de espécimes de vida livre para que possam ser comercializados, é também responsável pela ameaça de diversas espécies e/ou populações no Brasil (NORBERTO, 2009).

O impacto mais significativo gerado pelo tráfico de animais é o desequilíbrio populacional, já que a captura excessiva é a segunda principal causa da redução populacional de várias espécies, perdendo apenas para a degradação e perda de habitat provocada pelo desmatamento (MARINI & GARCIA, 2002). Além disso, animais comercializados ilegalmente geralmente são excluídos do processo reprodutivo, reduzindo, desta forma, o número de descendentes, o que aumenta o risco de extinção de várias espécies (SICK, 1997).

Estima-se que o comércio ilegal de animais silvestres movimente anualmente de 10 a 20 bilhões de dólares no mundo (WEBB, 2001; NORBERTO, 2009), sendo considerada a terceira maior atividade ilegal, após os tráficos de armas e narcóticos (WEBB, 2001). Embora no Brasil, atualmente, o controle da criação, soltura e comércio de animais silvestres seja feito pelo IBAMA, por intermédio de legislação específica, o tráfico de animais silvestres compreende um mercado lucrativo. O país é responsável por cerca de 10 a 15% do valor total mundial do tráfico ilegal de animais silvestres, especialmente devido à sua grande biodiversidade (RENCTAS, 2002; LOPES, 2006). De acordo com FERREIRA & GLOCK (2004), estes dados são imprecisos e, provavelmente subestimados, por se tratar de uma atividade ilegal.

O tráfico de animais é estruturado sobre uma rede formada por um emaranhado de rotas para o escoamento de animais no interior do Brasil e também para fora do país (HERNANDEZ & CARVALHO, 2006). Nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país, ocorre um expressivo número de ocorrências de captura de animais silvestres que são posteriormente destinados a centros urbanos por intermédio de meios ilegais. Estes animais são levados principalmente para a região Sudeste, em especial São Paulo e Rio de Janeiro, de onde, muitas vezes, partirão para abastecer o comércio ilegal internacional (JUPIARA & ANDERSON, 1991; RENCTAS, 2002). Na maioria das vezes, estes animais são transportados sem condições adequadas, o que resulta em

um alto número de mortes (REDFORD, 1992). Além disso, os traficantes utilizam técnicas cruéis para garantir a manutenção dos animais e venda do produto. Em relação às aves, por exemplo, é comum transportar os animais em pequenos espaços, sem água e sem alimento, cegar os animais, manter as asas amarradas, quebrar o osso externo de araras e papagaios, pintar periquitos para serem vendidos como papagaios e até mesmo matar os pais para facilitar a captura dos filhotes (LOPES, 1991; TOUFEXIS, 1993).

No Brasil, o tráfico da fauna silvestre possui características peculiares quanto às espécies traficadas e ao destino que estas têm ao chegar aos mercados internacionais. Basicamente, são quatro as modalidades do comércio ilegal (GIOVANINI, 1998) - (1) Animais para colecionadores particulares e zoológicos: o mais cruel dos tipos de tráfico da vida selvagem, pois prioriza principalmente as espécies mais ameaçadas. (2) Animais para fins científicos (biopirataria): neste grupo, encontram-se as espécies que fornecem substâncias químicas que servem como base para a pesquisa e produção de medicamentos, movimentando altos valores. (3) Animais para *pet shops*: modalidade que mais incentiva o tráfico de animais silvestres no Brasil, tendo como objetivo final a população em geral. (4) Produtos de fauna: produtos usados para fabricar adornos e artesanatos, como couros, peles, penas, garras e presas, entre outros.

Com base nas leis e decretos associados a crimes contra animais silvestres, os órgãos de fiscalização, frente a um delito, normalmente autuam o infrator e apreendem os animais. Os animais apreendidos necessitam ser inicialmente alojados, alimentados e receber cuidados médicos-veterinários, especialmente devido os maus tratos e ao estresse a que foram submetidos. Posteriormente, há necessidade de serem incluídos em programas de manutenção/reprodução em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução (BRANCO, 2008).

Entre os diversos animais que têm sido envolvidos em crimes ambientais no país e apreendidos por órgãos de fiscalização, as aves compreendem um dos grupos mais atingidos, devido a seu alto valor de mercado associado ao canto e ao exuberante colorido das penas. Estima-se que as aves tenham correspondido a 80% das espécies mais comumente confiscadas pelo IBAMA entre os anos de 2005 a 2009 (MMA, 2012). O tráfico, juntamente com a perda de *habitat*, são as duas maiores ameaças que a avifauna brasileira enfrenta (WILSON, 1988; AVISE, 1996; MARINI & GARCIA, 2005). No Brasil, cerca de 12 milhões de animais são traficados por

ano (LACAVA, 2000), sendo os Passeriformes e os Psittaciformes as aves silvestres mais frequentemente capturadas pelas autoridades ambientais (WANJTAL & SILVEIRA, 2000; WRIGHT *et al.*, 2001; FERREIRA & GLOCK, 2004; ARAUJO *et al.* 2010).

Apreensões de diferentes aves envolvidas em tráfico ilegal (Figura 1) vêm crescendo nos últimos anos e diversas instituições, como parques ecológicos, zoológicos, ONGs (Organizações Não Governamentais) e universidades, desenvolvem atualmente programas de conservação especificamente direcionados a tais animais. Entretanto, análises genéticas que possam subsidiar estes programas, por meio da identificação das espécies e do sexo dos animais, determinação de sua origem, grau de parentesco e nível de diversidade genética, são ainda escassas no país. Somente com a implementação de estudos que visem elucidar estas características, poderão ser corretamente instituídos e desenvolvidos programas de recuperação, criação, reprodução, soltura e reintrodução destes animais.



Figura 1: Operação da Polícia Ambiental contra o comércio ilegal de animais silvestres no município de Bofete, interior de São Paulo, evidenciando as condições de transporte (A e B) e manutenção de diversas aves (C e D) (retirado de www.acontecebotucatu.com.br).

2.4 Soltura e reintrodução de aves

A soltura ou reintrodução de aves na natureza frequentemente gera confusão, pois pode induzir ao leigo a impressão de que esta “libertação” contribui para a recuperação da espécie. Porém, este ato pode resultar em consequências desastrosas para a própria ave libertada, se esta não for corretamente manejada, e também às possíveis populações existentes no local de soltura (WANJTAL & SILVEIRA, 2000).

O retorno desses animais à natureza é um processo complexo e que deve seguir protocolos de normatização de solturas e de áreas de soltura pela Divisão de Fauna da Superintendência do IBAMA, por intermédio de documentos específicos, especialmente de Requerimentos para Cadastro de Área de Soltura e Protocolo de Orientações para a Soltura, adaptados das recomendações da IUCN (IUCN, 1995).

Para tais mecanismos, há a necessidade de diferenciar o ato de soltura de um ato de reintrodução. O termo “soltura” é genérico e tal ação ocorre comumente no Brasil, sendo praticada, na maioria das vezes, pelo poder público, por intermédio das Polícias Florestais e mesmo do IBAMA, mas criadores também a realizam. A soltura refere-se simplesmente ao ato de libertar indivíduos em áreas “escolhidas”, por meio dos mais variados critérios, para que os mesmos tenham alguma chance de sobrevivência fora das condições de cativeiro (IBAMA, 2006). Um dos maiores riscos associados a esta prática é a disseminação de zoonoses, com a possível extinção local das espécies infectadas. Por outro lado, reintrodução refere-se à tentativa de se estabelecer uma espécie em uma área que anteriormente fazia parte de seu histórico, mas da qual foi extirpada ou se tornou extinta, com finalidades específicas e controladas (IBAMA, 2006). O principal objetivo não se refere simplesmente a dar um destino aos animais associados ao tráfico e comércio ilegais e confiscados (WANJTAL & SILVEIRA, 2000).

Projetos de reintrodução devem ser submetidos e aprovados pelo IBAMA e, para que estes tenham sucesso, é necessário que exista um programa de acompanhamento a longo prazo, que verifique cuidadosamente os efeitos pós-reintrodução (SANZ & GRAJAL, 1998). Além disso, antes de iniciar tais projetos, é necessário conhecer os *habitats* e a biologia da espécie que se deseja reintroduzir e as interações desta com outras espécies. Indivíduos de espécies ameaçadas de

extinção são preciosos e não devem servir de “pilotos de teste” em programas de reintrodução que não cumpram requisitos imprescindíveis (WANJTAL & SILVEIRA, 2000). Entre tais requisitos, as análises genéticas mostram-se de extrema importância para gerar dados acerca dos níveis de diversidade genética, número de indivíduos, número de machos e fêmeas e graus de parentesco, tanto dos animais que serão reintroduzidos como das populações encontradas nos locais selecionados para o processo de reintrodução.

2.5 Genética da conservação e aplicação de marcadores moleculares

O ritmo atual de destruição, alteração e fragmentação de ambientes naturais, devido ao crescente impacto das atividades humanas, tem levado a uma alarmante perda da biodiversidade presente em nosso planeta (WILSON, 1988; ERLICH, 1988; AVISE, 1996). Esforços no sentido de reverter ou minimizar os efeitos deste processo são ainda insuficientes e necessariamente devem envolver iniciativas integradas por campos tão diversos quanto à economia, política, ciências sociais e muitas áreas das ciências biológicas, as quais compõem uma ciência relativamente nova conhecida como biologia da conservação (SOULÉ & WILCOX, 1980).

Inserida no contexto da biologia da conservação, encontra-se o campo da genética da conservação, atualmente bastante interligada com o campo da ecologia e biologia molecular. Estudos na área de genética da conservação baseiam-se em análises genéticas com o intuito de compreender os processos populacionais e evolutivos relevantes à conservação de diferentes espécies, especialmente aquelas ameaçadas (SCHONEWALD *et al.*, 1983; AVISE & HAMRICK, 1996). Hoje em dia, grande parte das análises genéticas direcionadas à conservação de espécies e/ou populações baseia-se na análise de marcadores moleculares.

A identificação e caracterização de marcadores do genoma nuclear iniciaram-se com análises de polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA, obtidos por meio do tratamento do DNA com enzimas de restrição, gerando padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (GRODZICKER *et al.*, 1974). Adicionalmente, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS *et al.*, 1987) permitiu a descrição de outros marcadores moleculares, incluindo sequências repetitivas de

DNA, denominadas microssatélites, e de seqüências polimórficas amplificadas ao acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Entre os diferentes marcadores moleculares, as repetições minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats* - repetições *in tandem* de número variável), correspondentes a arranjos em seqüência de múltiplas cópias de um pequeno segmento de DNA (10 a 60 pares de bases) que podem ser geradas por meio de digestão enzimática e posterior hibridação em membrana com sondas específicas, permitiram a obtenção de dados extremamente informativos para subsidiar análises de diversidade genética (JOBLING & GILL, 2004). Atualmente, os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats* - Repetições de Seqüência Simples) (LITT & LUTY, 1989) representam os marcadores mais amplamente utilizados nas áreas de genética forense e populacional, pois se encontram distribuídos por todo o genoma e geralmente apresentam um alto grau de polimorfismo. Estes possuem a vantagem de ser co-dominantes, o que permite a identificação de heterozigotos, e podem ser analisados por meio de sua amplificação, via PCR, utilizando *primers* específicos complementares às seqüências únicas que os flanqueiam (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Recentemente, outra classe de marcador molecular, denominado de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* - Polimorfismo de Nucleotídeo Único), ou seja, polimorfismo criado por uma mutação de ponto, resultante da substituição de um nucleotídeo por outro levando ao surgimento de diferentes alelos, vem sendo cada vez mais utilizada em análises de genética forense e conservacionista, dado seu alto grau de polimorfismo entre diferentes indivíduos tanto no DNA nuclear como no DNA mitocondrial (GOODWIN *et al.*, 2007).

Análises forenses e populacionais vêm, portanto, utilizando dados de DNA no sentido de subsidiar problemas de questionamentos jurídico-policiais e associados à conservação da biodiversidade. Estas duas vertentes apresentam uma correlação direta na área de conservação biológica, no sentido de gerar dados que auxiliem, especialmente, a resolução de incertezas taxonômicas, determinação do sexo dos indivíduos, minimização da perda de diversidade genética, determinação de graus de parentesco, definição de rotas de tráfico e delineamento de estratégias de recuperação de espécies e/ou populações (CARVALHO & HAUSER, 1998).

2.6 Identificação do sexo em aves

Os vertebrados, de maneira geral, apresentam não somente diferenças morfológicas externas entre machos e fêmeas, como também diferenças relacionadas a caracteres ecológicos e comportamentais (ELLENGREN & SHELDON, 1997; SHELDON, 1999), sendo o sexo determinado de diferentes maneiras, incluindo fatores genéticos e ambientais (EZZAZ *et al.*, 2006).

Espécies de peixes e répteis, embora possam apresentar cromossomos sexuais heteromórficos (GRIFFITHS *et al.*, 1998; MODI & CREWS, 2005; EZZAZ *et al.*, 2006), podem também ter o sexo determinado por fatores ambientais (EZZAZ *et al.*, 2006; ULLER *et al.*, 2007). Por outro lado, outras espécies de vertebrados não sofrem influência ambiental na determinação do sexo e possuem cromossomos sexuais diferenciados, como os mamíferos que apresentam um sistema de determinação sexual XX/XY, em que os machos representam o sexo heterogamético. Da mesma forma, as aves também apresentam um claro sistema de determinação sexual, do tipo ZZ/ZW, sendo que as fêmeas correspondem ao sexo heterogamético (e.g. OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Quando se toma o universo de espécies que compõem o grupo das aves, aproximadamente 30% não apresentam dimorfismo sexual externo aparente que permita a diferenciação morfológica entre machos e fêmeas (POUGH & HARVEY, 1999). Desta forma, a identificação sexual pode ser realizada por meio de técnicas de cariotipagem, laparoscopia e análise de esteróides fecais. Entretanto, tanto a inspeção da cavidade abdominal com um endoscópio como a análise de hormônios apresentam algumas desvantagens, por serem invasivas e/ou por não serem totalmente confiáveis (GRANDO, 2002). O exame de laparoscopia, embora possa ser utilizado em qualquer espécie de ave, envolve grande manipulação dos animais e riscos cirúrgicos. A análise de esteróides fecais baseia-se na razão entre estrógeno e testosterona. Além desta razão não ser sempre altamente confiável para determinação do sexo em algumas espécies de aves, as amostras necessitam de manutenção adequada visando a não degradação dos hormônios durante a coleta em campo (MIYAKI *et al.*, 1998).

A análise de cromossomos em metáfase permite a correta distinção entre os sexos, já que fêmeas apresentam dois tipos de cromossomos sexuais (Z e W), enquanto machos apresentam somente cromossomos Z. Entretanto, esta forma de sexagem, além de ser trabalhosa, demandar

grande tempo e nem sempre gerar resultados satisfatórios, não pode ser utilizada em algumas espécies cujos cromossomos sexuais são virtualmente idênticos (MIYAKI *et al.*, 1998).

Outra maneira de identificação do sexo das aves, por meio de análise genética, refere-se à denominada "sexagem molecular", por meio da amplificação de uma região dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* (*chromo-helicase-DNA-binding*), localizados nos cromossomos sexuais. O gene *CHD-W* localiza-se no cromossomo W e, portanto, encontra-se somente nas fêmeas, e o gene *CHD-Z* é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo em ambos os sexos (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Desta forma, a identificação do gênero em espécies de aves pode ser realizada por meio da utilização de PCR, empregando um único conjunto de *primers* para amplificar fragmentos homólogos de ambos os genes referentes a íntrons que geralmente variam de tamanho entre as espécies (GRIFFITHS *et al.*, 1996; 1998; MIYAKI *et al.*, 1998; GRIFFITHS, 2000; FRIDOLSSON & ELLEGRENI, 2000; ANCIÃES & DEL LAMA, 2002; CHANG *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2009). O resultado, visualizado em gel de agarose ou poliacrilamida, demonstra que as fêmeas, que possuem dois cromossomos sexuais diferentes, apresentam dois fragmentos de DNA, enquanto os machos, homogaméticos, apresentam somente um fragmento (GRIFFITHS *et al.*, 1998; FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 2000; GRIFFITHS, 2000).

A determinação do sexo em aves monomórficas é fundamental para o sucesso reprodutivo de espécies silvestres mantidas em cativeiro, em programas de reintrodução ou soltura, em estudos comportamentais e em análises forenses associadas ao comércio/tráfico ilegal de animais (GRIFFITHS, 2000; RASO & WERTHER, 2004; FARIA *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Com o objetivo de fornecer subsídios a programas de conservação de aves no Brasil, a presente proposta visou: (I) realizar análises genéticas de sexagem em diversas aves, incluindo espécies comumente apreendidas pela Polícia Ambiental e pelo IBAMA, e (II) gerar um material de divulgação científica sobre tráfico de aves e conservação genética.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Isolar amostras de DNA de penas e sangue de diferentes espécies de aves procedentes de Centros de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS), Centros de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) e Criadouros Científicos de Fauna Silvestre para fins de conservação.
- 2) Identificar o sexo de exemplares de diferentes espécies de aves, por meio da amplificação de regiões específicas dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* (*chromo helicase-DNA binding*) para geração de perfis genéticos sexo-específicos.
- 3) Implementar um protocolo de sexagem molecular de aves junto ao Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biociências da UNESP para subsidiar o fornecimento de laudos técnicos.
- 4) Caracterizar os segmentos de DNA amplificados por meio de seqüenciamento nucleotídico, visando análises comparativas dos genes *CHD* entre as espécies de aves estudadas.
- 5) Identificar o grau de informação de estudantes, docentes e técnicos administrativos do Instituto de Biociências da UNESP (Campus de Botucatu) sobre a área de genética forense associada à área de conservação biológica.
- 6) Elaborar um material de divulgação científica sobre crimes ambientais e tráfico/comércio ilegal de aves e sobre a possibilidade de utilização de ferramentas genéticas nesta área de interface entre genética forense e conservação biológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Dado que diversas aves, comumente associadas ao tráfico ilegal no país, apreendidas pela Polícia Ambiental e pelo IBAMA são posteriormente encaminhadas a locais específicos que desenvolvem propostas conservacionistas, no presente estudo foram analisados exemplares encontrados em quatro centros de conservação animal:

- (1) Projeto Centrofauna - Centro de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS) mantido pela ONG Instituto Floravida (Empresa Anidro do Brasil, Botucatu, SP);
- (2) Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP);
- (3) Criadouro C.A. (Itatiba, SP);
- (4) Criadouro Poços de Caldas (Poços de Caldas, MG).

Ao todo, foram analisados 124 exemplares de 53 espécies diferentes, pertencentes a distintas ordens das famílias Accipitridae, Cacatuidae, Cardinalidae, Cariamidae, Columbidae, Cuculidae, Emberezidae, Falconidae, Icteridae, Musophagidae, Psittacidae, Ramphastidae, Sturnidae, Thraupidae, Tinamidae, Trochilidae e Turdidae (Tabelas 2 a 5). Quinze espécies, pertencentes a 6 ordens, foram provenientes do Instituto Floravida (Tabela 2), 11 espécies, pertencentes a 7 ordens, foram provenientes do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Tabela 3), 16 espécies, pertencentes a 5 ordens, foram provenientes do Criadouro C.A. (Tabela 4) e 13 espécies, pertencentes a 2 ordens, foram provenientes do Criadouro Poços de Caldas (Tabela 5).

O Instituto Floravida (Figura 2) é uma organização não governamental e sem fins lucrativos, mantida com o objetivo de fomentar o desenvolvimento sócio-ambiental das comunidades locais e desenvolver projetos de conservação da biodiversidade, educação ambiental e inclusão social. Os animais apreendidos pela Polícia Ambiental e encaminhados a esta ONG são mantidos em viveiros construídos na mata nativa, preservada nas dependências da Empresa Anidro do Brasil, localizada em Botucatu, SP. Diariamente, as aves são alimentadas com

frutas da época, distribuídas aleatoriamente no recinto e com água à vontade. Após o período de reabilitação e finalização dos planos de manejo em cativeiro, as aves são soltas em locais pré-definidos pela Polícia Ambiental e pelos pesquisadores vinculados ao Instituto Floravida.

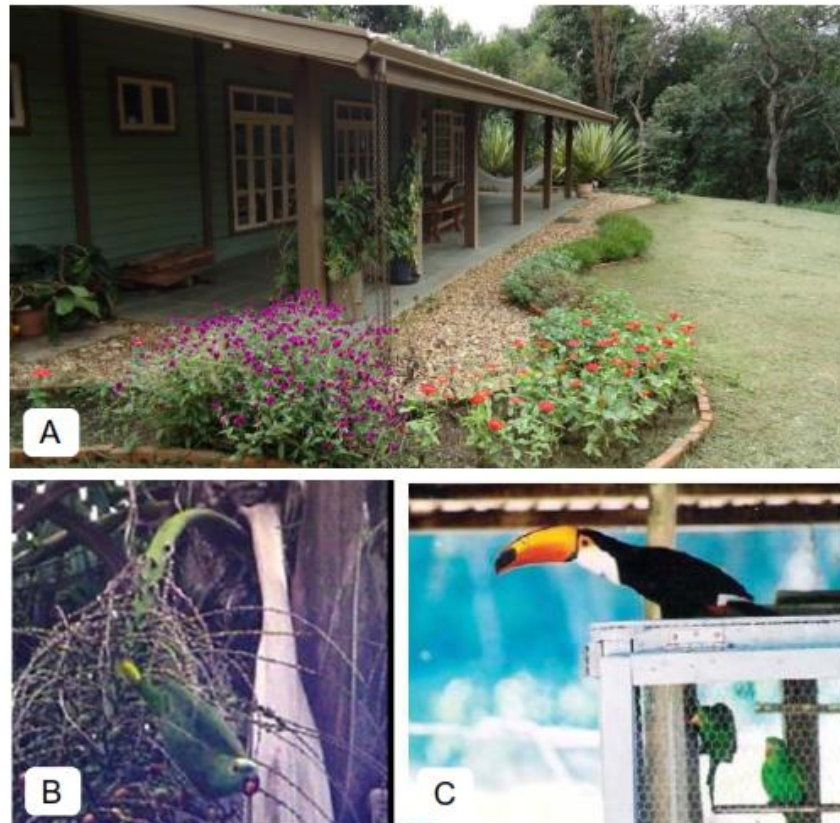


Figura 2: Centro de recepção aos visitantes e área de educação ambiental (A) e viveiros (B e C) do Instituto Floravida (Botucatu, SP).

O Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Figura 3), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira (docente junto ao Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária), recebe, por intermédio da Polícia Ambiental ou da própria população, animais em situação de risco e machucados, geralmente devido a maus tratos ocorridos durante o processo do tráfico. Nos últimos cinco anos, este CEMPAS atendeu mais de cinco mil casos envolvendo animais silvestres e estes foram submetidos a procedimentos clínicos, cirúrgicos e de diagnóstico. Além disso, este

também atua em educação ambiental e realiza ações de reabilitação em cativeiro, com o intuito de devolver estes animais à natureza, sempre que possível, após indicação de locais próprios para este fim pelos órgãos competentes.

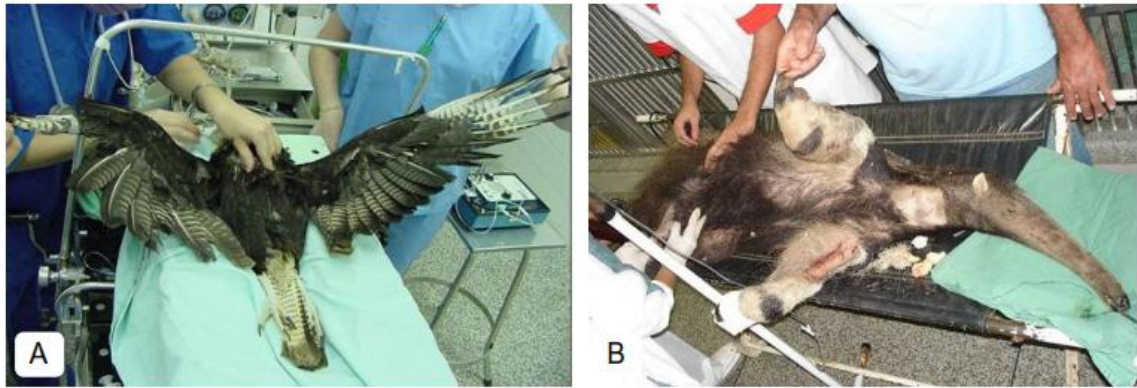


Figura 3: Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres - CEMPAS vinculado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP). Carcará (*Carcara plancus*) submetido à correção cirúrgica de fratura nos ossos da asa (A) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), vítima de atropelamento (B).

O Criadouro C.A., mantido pelo biólogo Carlos Alberto Polezel Filho, e o Criadouro Poços de Caldas, mantido pelo Sr. Moacyr de Carvalho Dias (Figura 4), correspondem a criadouros científicos de fauna silvestre para fins de conservação. O Criadouro C.A. possui um grande número de aves exóticas. O Criadouro Poços de Caldas possui cerca de 4.000 aves de 325 diferentes espécies e é considerado pelo IBAMA e pelo Instituto Chico Mendes o maior criadouro de aves silvestres do Brasil. Estes locais, além de trabalhar com técnicas de reprodução, têm o objetivo de apoiar, incentivar, desenvolver e promover ações sociais, culturais, educacionais e científicas que visam à defesa, preservação e conservação de aves e participam ativamente de atividades de combate à biopirataria e ao tráfico de animais silvestres.

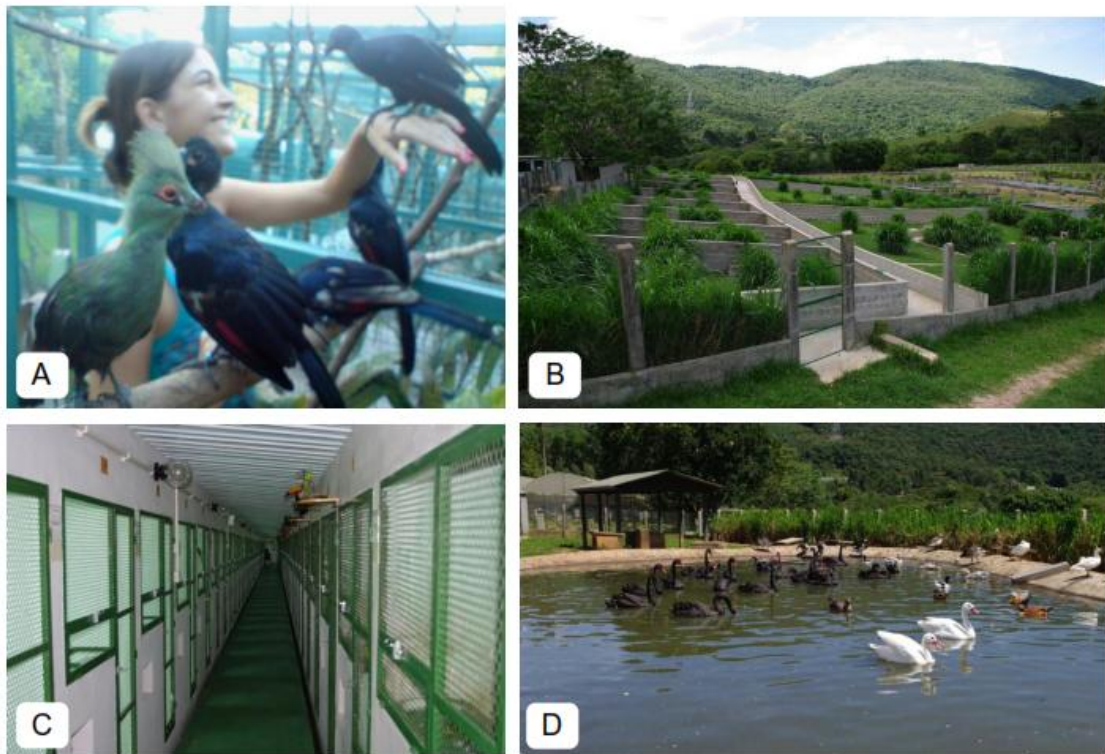


Figura 4: Viveiros do Criadouro C.A. (Itatiba, SP) (A) e do Criadouro Poços de Caldas (Poços de Caldas, SP) (B, C e D).

Tabela 2: Dados das espécies estudadas oriundas do Projeto Centrofauna, correspondente a um Centro de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS) mantido pela ONG Instituto Floravida (Empresa Anidro do Brasil, Botucatu, SP). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP).

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	Número de Indivíduos
1	Maitaca verde	<i>Pionus maximiliani</i>	Psittaciformes	Psittacidae	8
2	Periquitão maracanã	<i>Aratinga leucophthalma</i>			4
3	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>			8
4	Curica	<i>Amazona amazonica</i>			1
5	Catarina	<i>Bolborhynchus lineola</i>			3
6	Sabiá laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	Passeriformes	Turdidae	4
7	Tico tico	<i>Zonotrichia capensis</i>		Emberizidae	2
8	Azulão	<i>Cyanoloxia brissonii</i>		Cardinalidae	2
9	Trinca ferro verdadeiro	<i>Saltator similis</i>		Thraupidae	6
10	Cardeal da Amazônia	<i>Paroaria gularis</i>			1
11	Bico de prata	<i>Ramphocelus carbo</i>			3
12	Pomba doméstica	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Columbidae	2
13	Tucanuçu	<i>Ramphastos toco</i>	Piciformes	Ramphastidae	8
14	Anu branco	<i>Guira guira</i>	Cuculiformes	Cuculidae	1
15	Beija flor tesoura	<i>Eupetomena macroura</i>	Apodiformes	Trochilidae	1

Tabela 3: Dados das espécies estudadas oriundas do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP).

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	Número de Indivíduos
16	Bicudo	<i>Sporophila maximiliani</i>	Passeriformes	Emberizidae	1
17	Galo da campina	<i>Paroaria dominicana</i>		Thraupidae	2
18	Sanhaço	<i>Thraupis abbas</i>			1
19	Coruja buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>			1
20	Rolinha roxa	<i>Columbina talpacoti</i>	Columbiformes	Columbidae	1
21	Seriema	<i>Cariama cristata</i>	Cariamiformes	Cariamidae	1
22	Gavião	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitriformes	Accipitridae	1
23	Falcão de coleira	<i>Falco femoralis</i>	Falconiformes	Falconidae	2
24	Tucanuçu	<i>Ramphastos toco</i>	Piciformes	Ramphastidae	2
25	Periquito rico	<i>Brotogeris tirica</i>	Psittaciformes	Psittacidae	5
26	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>			8

Tabela 4: Dados das espécies estudadas oriundas do Criadouro C.A. (Itatiba, SP). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP).

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	Número de Indivíduos
27	Lóris rubritorquis	<i>Trichoglossus haematodus rubritorquis</i>	Psittaciformes	Psittacidae	1
28	Marianinha de cabeça preta	<i>Pionites melanocephalus</i>			2
29	Marianinha de cabeça amarela	<i>Pionites leucogaster</i>			4
30	Cacatua de crista amarela	<i>Cacatua sulphurea</i>		Cacatuidae	1
31	Melro metálico púrpura	<i>Lamprotornis purpureus</i>	Passeriformes	Sturnidae	1
32	Pomba de fruta perlatus	<i>Ptilinopus perlatus</i>	Columbiformes	Columbidae	1
33	Pomba de fruta melanospila	<i>Ptilinopus melanospilus</i>			1
34	Pomba soberba	<i>Ptilinopus superbus</i>			1
35	Pomba apunhalada	<i>Gallicolumba luzonica</i>			1
36	Pomba asa verde	<i>Chalcophaps indica</i>			1
37	Pomba de fruta chalconota	<i>Ducula aenea paulina</i>			1
38	Pomba coleira	<i>Streptopelia risoria</i>			1
39	Turaco persa ou turaco de crista branca	<i>Tauraco leucolophus</i>	Musophagiformes	Musophagidae	1
40	Turaco de orelha branca	<i>Tauraco leucotis</i>			1
41	Turaco violeta	<i>Musophaga violacea</i>			1
42	Macuco	<i>Tinamus solitarius</i>	Tinamiformes	Tinamidae	1

Tabela 5: Dados das espécies estudadas oriundas do Criadouro Poços de Caldas (Poços de Caldas, MG). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP).

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	Número de Indivíduos
43	Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	Psittaciformes	Psittacidae	2
44	Arara vermelha grande	<i>Ara chloropterus</i>			2
45	Araracanga	<i>Ara macao</i>			2
46	Arara canindé	<i>Ara ararauna</i>			2
47	Macaranã - guaçu	<i>Ara severus</i>			2
48	Ararinha de testa vermelha	<i>Ara rubrogenys</i>			1
49	Arara azul grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>			2
50	Papagaio campeiro	<i>Amazona ochrocephala</i>			2
51	Papagaio galego	<i>Alipiopsitta xanthops</i>			2
52	Papagaio moleiro	<i>Amazona farinosa</i>			2
53	Papagaio de peito roxo	<i>Amazona vinacea</i>			2
54	Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>			2
55	Grauna	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Passeriformes	Icteridae	2

4.2 Métodos

4.2.1 Análises genéticas

4.2.1.1 Coleta de material biológico

As amostras biológicas obtidas para estudo foram coletadas no período de agosto de 2011 a outubro de 2012. De forma a utilizar procedimentos não-destrutivos de amostragem biológica, amostras de penas e/ou sangue foram obtidas dos espécimes em estudo. Após contenção dos animais, o local de retirada das amostras biológicas foi higienizado com algodão embebido em álcool 70%. Preferencialmente, penas em crescimento foram utilizadas, já que estas possuem tecido rico em divisões celulares na região da polpa dérmica, e estas foram retiradas manualmente (Figura 5). Posteriormente, as penas coletadas foram mantidas em envelope de papel à temperatura ambiente até seu processamento ou, alternativamente, mantidas à temperatura ambiente em recipiente contendo álcool 100%. A coleta de sangue foi feita por meio do corte da unha dos animais, utilizando um corta-unhas esterilizado. Uma gota de sangue, obtida por meio do corte da unha a cerca de 2/3 de sua base (Figura 6), de modo a atingir a veia e produzir sangramento, foi coletada em papel cartão (FTA Classic Card, Whatman Biosciences), constituído de uma base de celulose impregnada de agentes químicos que impedem a degradação do DNA. Este foi posteriormente armazenado em envelope à temperatura ambiente até seu processamento. Os dois procedimentos de coleta dos materiais implicaram em riscos extremamente reduzidos de desenvolvimento de infecções nos animais.



Figura 5: Procedimento de coleta de penas dos animais em estudo, por meio de retirada manual.

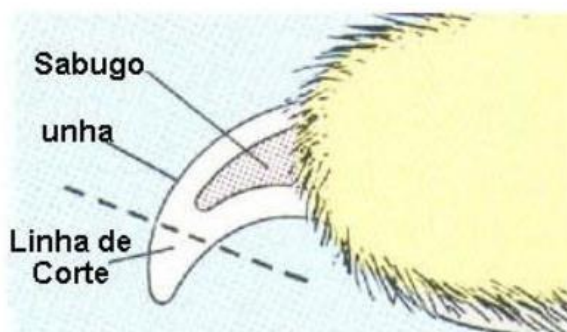


Figura 6: Linha de corte das unhas das aves, para coleta de sangue dos animais em estudo.
<http://equipeveterinariafv2010.blogspot.com/2010/08/como-cortar-unha-de-um-ca.html>

4.2.1.2 Extração de DNA

Diferentes procedimentos para isolamento de DNA foram utilizados, visando à obtenção de amostras de melhor qualidade. As amostras obtidas encontram-se depositadas no Laboratório de Genética Animal junto ao Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP (Campus de Botucatu, SP).

4.2.1.2.1 Extração de DNA de penas

A extração de DNA das penas foi realizada com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, segundo protocolo descrito em SAMBROOK & RUSSEL (2001), com algumas alterações. Alternativamente, algumas amostras de DNA foram obtidas utilizando-se o *kit Phire Animal Tissue Direct PCR* (Thermo Scientific), seguindo as informações do fabricante e o protocolo descrito por WOOLFE *et al.* (2005). Os protocolos utilizados encontram-se descritos a seguir.

Extração de DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico: Colocar amostras de penas de cada um dos animais em um cadinho estéril juntamente com nitrogênio líquido. Em seguida, macerar o material com auxílio de um bastão estéril. Adicionar 5 ml de solução de digestão composta por NaCl 0,4 M; EDTA 0,1 M; pH 8,0; SDS 0,1% e RNase 40 µg/ml, sobre o tecido já macerado. Após homogeneização, transferir as amostras para um tubo estéril de 15 ml e mantê-lo em banho-maria em uma temperatura de 50°C por 1 hora. Após este período, adicionar solução de Proteinase K 40 µg/ml e manter o tubo em banho-maria a 50°C por mais 1-3 horas, homogeneizando o material periodicamente. Após este período, retirar o tubo do banho-maria e, em capela com exaustor ligado, acrescentar 5 ml de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 50:48:2, respectivamente. Inverter o tubo, cuidadosamente, durante 15 minutos e, posteriormente, centrifugar a 5.000 rpm por mais 15 minutos. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 15 ml estéril, acrescentando-se solução de NaCl 1M calculada a partir do volume médio da amostra obtida. Posteriormente, completar o tubo com álcool 100% gelado para precipitação do DNA. Retirar a amostra de DNA do tubo com auxílio de uma ponteira de plástico e descartar o restante. Posteriormente, devolver o DNA ao tubo e adicionar 3 ml de álcool etílico 70%. Descartar o álcool e manter a amostra de DNA em estufa a 37°C para secagem. Após a secagem, acrescentar 200µl

de água filtrada autoclavada para eluição do DNA. Transferir as amostras de DNA obtidas para tubos estéreis de 1,5 ml e mantidas a -20°C.

Extração de DNA com o kit *Phire Animal Tissue Direct PCR* (Thermo Scientific): Macerar amostras de penas de cada um dos animais em nitrogênio líquido, colocar junto à amostra 20µl do reagente *Dilution Buffer*, em seguida adicionar 0.5µl do *DNARelease Additive*, deixar em temperatura ambiente de 2-5 minutos e finalizar em banho seco à 98°C por 2 minutos. No momento de realizar as reações de amplificação (PCR), utilizar 1µl da amostra com os reagentes adicionados como descrito acima.

4.2.1.2.2 Extração de DNA de sangue

A extração de DNA de sangue foi realizada seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante do *FTA Classic Card* (Whatman Biosciences). O protocolo utilizado encontra-se descrito abaixo.

Extração de DNA de *FTA Classic Card* (Whatman Biosciences): Remover o disco do papel cartão contendo a amostra de sangue e colocá-lo em um tubo estéril de 200µl. Lavar o disco com reagente de purificação, agitando o tubo, e descartar com o auxílio de uma micropipeta o reagente. Repetir o processo de lavagem por mais duas vezes. Posteriormente, lavar em tampão TE (Tris 10mM, EDTA 0.1mM, pH 8.0) e descartar o sobrenadante. Repetir este processo. Deixar o disco de papel cartão secar à temperatura ambiente dentro do tubo de 200µl. No momento de realizar as reações de amplificação, realizar a PCR diretamente no disco.

4.2.1.3 Análise da qualidade e quantidade das amostras de DNA

A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) e visualizado em transiluminador (Hoefer UV-25), sob luz ultravioleta. Para quantificação do DNA, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific), através de absorbância a 260-280nm.

4.2.1.4 Sexagem molecular

Para identificação do sexo dos animais, reações de amplificação (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) foram realizadas conforme protocolo descrito por MIYAKI *et al.* (1998), utilizando os *primers* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'), originalmente descritos por GRIFFITHS *et al.* (1998). Estes *primers* foram desenhados para amplificar uma região do gene *CHD-W*, ligado ao cromossomo sexual W, e o gene *CHD-Z*, presente no cromossomo sexual Z. Desta forma, são amplificados dois fragmentos de DNA de diferentes tamanhos nas fêmeas e apenas um fragmento em machos (MIYAKI *et al.*, 1998).

Para as amostras de DNA obtidas por meio da utilização de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e com o *FTA Classic Card* (Whatman Biosciences), as amplificações dos fragmentos de DNA, via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram inicialmente padronizadas para um volume final de 15 µl. Após padronização, cada reação de amplificação consistiu de 1,5 µl de tampão de reação 10x, 0,75 µl de cada *primer* (10 mM), 0,4 µl de dNTP (200 mM), 0,4 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,15 µl de *Taq* DNA polimerase (5 U/ml), 7,5 µl de DNA molde (70-100 ng/µl) e 3,55 µl de água filtrada autoclavada. As reações de amplificação foram colocadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridação a 47°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Um passo final de extensão a 72°C foi realizado por mais 5 minutos.

Para as amostras de DNA obtidas por meio do *kit Phire Animal Tissue Direct PCR*, as amplificações dos fragmentos de DNA foram inicialmente padronizadas para um volume final de 20 µl. Após padronização, cada reação de amplificação consistiu de 10 µl, de tampão de reação (2x *Phire Animal Tissue PCR Buffer*), 2 µl de cada *primer* (10Mm), 0,4 de *Hot Start* (*Phire Hot Start II DNA Polymerase*) e 4,6 de água filtrada autoclavada. As reações de amplificação foram colocadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research), de acordo com o seguinte programa: desnaturação a 98 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 98 °C por 5 segundos, hibridização a 47 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 20 segundos. Um passo final de extensão a 72 °C foi realizado por mais 1 minuto.

As amostras de DNA foram amplificadas em réplicas (duas reações de amplificação distintas). Além disso, um controle positivo (correspondente a uma amostra de DNA de uma espécie de ave - *Amazona aestiva* - previamente analisada cujo resultado de sexagem molecular foi corroborado com análises citogenéticas) e um controle negativo (correspondente a uma reação de amplificação contendo todos os componentes da PCR exceto amostra de DNA, para monitorar qualquer possível contaminação), foram utilizados a fim de gerar dados altamente confiáveis.

Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µl/10ml) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA) e visualizados no digitalizador de imagem GE *ImageQuant 300 Imager*, sob luz ultravioleta). Os pesos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com marcadores de peso molecular conhecido.

4.2.1.5 Clonagem de fragmentos de DNA

A clonagem de fragmentos de DNA de interesse, obtidos via PCR, foi realizada para posterior caracterização e comparação de suas sequências nucleotídicas. Fragmentos de DNA de interesse foram ligados a plasmídeos específicos, seguindo as especificações do fabricante. Posteriormente, foi realizada a transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5α.

4.2.1.5.1 Ligação inserto-plasmídeo

Fragmentos de DNA de interesse foram ligados ao plasmídeo pGEM-T (Promega), seguindo as especificações do fabricante. O protocolo utilizado encontra-se descrito a seguir.

Ligação inserto-plasmídeo (utilizando o *kit* de ligação pGEM-T Vector System I - Promega): Em um tubo de 0,5ml, adicionar 2µl do inserto de interesse (produto de DNA resultante de PCR), 1µl de T4 DNA ligase, 1µl de tampão de reação 10x, 1µl do plasmídeo pGEM-T (50ng) e 5µl de água filtrada autoclavada. Misturar cuidadosamente com uma micropipeta e incubar a reação a 4°C durante 12-16 horas.

4.2.1.5.2 Transformação de bactérias competentes

Posteriormente à ligação do inserto de interesse ao plasmídeo, foi realizada a transformação de bactérias competentes *Escherichia coli* DH5 α (Gibco.Brl), seguindo as instruções do fabricante. O protocolo utilizado encontra-se descrito abaixo.

Transformação de bactérias competentes (Gibco.Brl): Manter um tubo de 1.5ml estéril no gelo. Colocar 50 μ l de bactérias competentes (acondicionadas a -70°C) no tubo e posteriormente adicionar 10 μ l da reação de ligação (inserto-plasmídeo), misturando cuidadosamente com uma micropipeta. Manter o tubo em gelo por 30 minutos. Aplicar um choque térmico, aquecendo o tubo a 37°C em banho-maria por exatamente 45 segundos. Colocar o tubo imediatamente no gelo e manter por 2 minutos. Adicionar 950 μ l de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7.5) à temperatura ambiente e incubar a 37°C por 1 hora, sob agitação a 225rpm. Centrifugar por 5 segundos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante. Espalhar o produto de transformação em placas de Petri estéreis com meio LB sólido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, ágar 1.5%, pH 7.5), contendo 2 μ l de ampicilina (50mg/ml) por mililitro de meio LB e 50 μ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside) (50mg/ml), para posterior seleção dos recombinantes (colônias brancas). Incubar as placas, com o meio de cultura voltado para cima, em estufa a 37°C durante 12-16 horas.

4.2.1.5.3 Identificação de plasmídeos recombinantes

Para verificar a presença de insertos de interesse nos clones obtidos, ligações inserto-plasmídeo foram submetidas a reações de amplificação (PCR). A metodologia utilizada encontra-se descrita a seguir.

PCR para identificação de plasmídeos recombinantes: Em um tubo de 0.5ml, adicionar 50pmol de cada *primer* - M13F (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3') e M13R (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') -, tampão de reação 1x (KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM, Tris-HCl 10mM), 2mM de cada dNTP e 0.5U de *Taq* DNA polimerase (GE Healthcare Life Sciences), em um volume total de 50 μ l. Encostar um palito estéril sobre uma colônia recombinante e mergulhar o

palito no tubo de 0.5ml contendo as soluções para amplificação. As reações de amplificação são realizadas em termociclador PTC-100™ (MJ Research) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, hibridação a 63°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Submeter os produtos da reação de amplificação (6µl) à eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), durante 1.5-2 horas a 110V/150^a, para verificar a presença de recombinantes de interesse. Identificar insertos presentes nos plasmídeos através da análise do gel sob luz ultravioleta em transiluminador, utilizando um marcador de peso molecular conhecido para comparação. Após identificação dos clones de interesse, estocá-los a -70°C em glicerol 15%.

4.2.1.5.4 Mini-preparações para obtenção de plasmídeos recombinantes

Reações de mini-preparações (para retirada dos plasmídeos das bactérias) foram realizadas para posterior caracterização dos segmentos de DNA clonados. A metodologia utilizada refere-se à técnica de lise alcalina (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), descrita abaixo.

Crescimento das bactérias em meio de cultura líquido: Coletar, com o auxílio de uma ponteira ou palito de madeira estéreis, colônias de bactérias recombinantes (colônias brancas) das placas de Petri. Colocar o material recolhido em tubos de 15ml estéreis contendo 4ml de meio LB líquido (peptona 1%, NaCl 0.17M, extrato de levedura 0.5%, pH 7.5). Manter os tubos a 37°C durante 12-16 horas, sob agitação a 225rpm. Utilizar o material nas reações de mini-preparações.

Mini-preparações para obtenção de plasmídeos: Centrifugar cerca de 1.5ml de meio de cultura em um tubo de 1.5ml estéril, por 15 segundos a 13.000rpm. Retirar todo o sobrenadante com uma micropipeta e ressuspender o “pellet” em 100µl de solução A gelada (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM, EDTA 10mM). Adicionar 200µl de solução B (SDS 1%, NaOH 0.2M), misturar invertendo o tubo dez vezes cuidadosamente e incubar por 5 minutos em gelo. Adicionar 150µl de solução C (acetato de potássio 5M pH 4.8), misturar invertendo o tubo dez vezes cuidadosamente e incubar por 5 minutos em gelo. Centrifugar o tubo por 5 minutos a 13.000rpm e transferir o sobrenadante, com uma micropipeta, para um novo tubo. Adicionar 0.5ml de fenol:clorofórmio (1:1), misturar e

centrifugar por 2 minutos a 13.000rpm. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar dois volumes de etanol 100% gelado. Misturar invertendo o tubo cuidadosamente por dez vezes e deixar à temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos. Centrifugar por 5 minutos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante. Lavar o “pellet” com 100µl de etanol gelado 70% e deixar secar à temperatura ambiente ou em estufa a 37°C. Adicionar 30µl de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) com RNase 20µg/ml, misturar e guardar a -20°C.

4.2.1.6 Sequenciamento nucleotídico

O sequenciamento nucleotídico dos clones de interesse foi realizado utilizando o *kit DYEnamic Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare Life Sciences) e seqüenciador automático (Perking-Elmer ABI Prism 377 DNA Sequencer), seguindo as especificações dos fabricantes. O protocolo utilizado encontra-se descrito a seguir.

Sequenciamento nucleotídico: Preparar a reação de sequenciamento contendo 2µl de pré-mix (fornecido no *kit*), 2µl do produto purificado e 1µl de *primer* (10µM). Realizar as reações em termociclador (PTC-100TM - MJ Research) seguindo o programa: desnaturação inicial a 96°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 45 segundos, hibridação a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Adicionar às amostras 2µl de acetato de sódio 4.5mM e 80µl de etanol 95%. Centrifugar a 14.000rpm durante 20 minutos a 20°C. Remover o sobrenadante e adicionar 400µl de etanol 70%. Centrifugar novamente a 14.000rpm durante 10 minutos. Remover o sobrenadante e manter o material em estufa a 37°C por 1 hora, protegido da luz. Dissolver as amostras em solução de formamida e *blue dextran* (*Formamide Loading Dye* 5:2). Limpar a placa dupla de vidro com álcool, em que será colocado o gel de poliacrilamida. Colocar o pente na placa de vidro para formar os sulcos onde serão aplicadas as amostras de DNA. Colocar a placa em um forno de luz ultravioleta, inserir o gel de poliacrilamida (*RapidGel*TM-XL6% - GE Healthcare Life Sciences), com uma seringa, na placa dupla de vidro. Ligar a luz ultravioleta durante 3 minutos para polimerizar a poliacrilamida. Limpar novamente a placa de vidro, para evitar erros de leitura no sequenciamento. Colocar o gel no seqüenciador automático e encher as cubas superior e inferior do seqüenciador com tampão TBE 1x (Tris-Ácido bórico-

EDTA). Desnaturar as amostras de DNA a 80°C por 4 minutos, em termociclador, e colocá-las imediatamente em gelo. Determinar a voltagem (1.400V) e a intensidade do laser de leitura das bases (100) no programa computacional e identificar as linhas de leitura com o número correspondente das amostras. Aplicar 2µl de cada amostra em sua linha correspondente no gel. Iniciar a corrida do gel.

4.2.1.7 Análise das sequências nucleotídicas

Para identificação de possíveis similaridades com sequências previamente descritas, as sequências nucleotídicas obtidas neste trabalho foram primeiramente submetidas a buscas *online* BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1990) através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (USA), *website* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>. O alinhamento das sequências nucleotídicas foi realizado com o programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). As sequências consenso foram determinadas com o programa Geneious Pro 4.5.5. (Drummond *et al.*) *website* <http://geneious.com>.

4.2.2 Divulgação Científica

4.2.2.1 Levantamento de conhecimentos gerais sobre genética forense e conservação biológica

Dados sobre os conhecimentos gerais da população acerca das áreas de genética forense e de conservação biológica, suas associações e aplicabilidades, foram levantados a partir da aplicação de um questionário de caráter tanto qualitativo como quantitativo.

4.2.2.1.1 Elaboração de questionário

Com o intuito de realizar uma coleta de dados acerca do grau de informação/compreensão de diferentes grupos amostrais de distintos níveis de formação, sobre os princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à conservação biológica, foram levados em consideração à configuração do grupo amostral, a técnica de amostragem, a determinação do

tamanho da amostra, a maneira de aplicação do questionário, o delineamento do questionário e a avaliação deste.

De forma a englobar, de modo sucinto, informações básicas das áreas forenses e de conservação biológica, o questionário foi elaborado contendo informações gerais de identificação individual (sexo, idade, profissão/formação e grau de instrução) e cinco questões de múltipla escolha em que, em cada uma delas, poderiam ser marcadas uma única ou mais de uma alternativa (Anexo I).

4.2.2.1.2 Aplicação do questionário

Visando o levantamento de dados de diferentes segmentos sociais e profissionais, o questionário elaborado foi aplicado a distintos grupos amostrais pertencentes à Universidade Estadual Paulista - UNESP (Campus de Botucatu), constituídos por: (1) alunos de mestrado, (2) alunos de doutorado, (3) docentes e (4) funcionários técnico-administrativos.

O questionário foi encaminhado a todos os discentes e docentes vinculados aos programas de pós-graduação do Instituto de Biociências da UNESP (PPG em Ciências Biológicas - Genética, PPG em Ciências Biológicas - Botânica, PPG em Biometria, PPG em Biologia Geral e Aplicada, PPG em Farmacologia e PPG em Zoologia) e a todos os docentes e técnicos administrativos vinculados aos departamentos do Instituto de Biociências da UNESP (Departamentos de Anatomia, Bioestatística, Educação, Física e Biofísica, Fisiologia, Genética, Micro-Imunologia, Morfologia, Parasitologia, Química e Bioquímica, Botânica, Zoologia e Farmacologia).

O encaminhamento dos questionários e a solicitação de preenchimento dos mesmos foram feitos via e-mail, com endereço eletrônico criado especialmente para tal finalidade (geneticaposgraduacao@hotmail.com). A escolha desta forma de levantamento de dados levou em consideração o baixo custo, a rapidez e o grau de dificuldade do questionário (considerado de fácil e rápido preenchimento e, portanto, não necessitando de intermediários). Os encaminhamentos foram feitos durante os meses de março, abril, maio, junho, julho, agosto e

setembro de 2012. E-mails não respondidos dentro do prazo de um mês foram re-encaminhados nos meses subsequentes.

4.2.2.1.3 Avaliação dos questionários

O programa computacional SPSS Statistics versão 17.0 (IBM) foi utilizado para as análises estatísticas das respostas com a finalidade de um diagnóstico descritivo de variáveis. Os dados foram posteriormente utilizados para confecção de tabelas e gráficos, utilizando o programa Excel 2007. Para a comparação das respostas de cada questão por profissão/formação e sexo, utilizou-se o teste de Qui-Quadrado, pois as variáveis são qualitativas. A comparação entre os sexos foi realizada através do teste t e a comparação entre as profissões e programas foi feita através do teste ANOVA (*Analysis of Variance*).

As questões foram também analisadas por meio do cálculo das frequências que correspondem ao número de indivíduos relacionado em porcentagem da quantidade de itens assinalados, visto que todos os itens listados no questionário estão corretos. Cálculos de média, desvio padrão, mínimo e máximo do número de itens assinalados também foram feitos. Valores significativos foram encontrados através do teste Kruskal-Wallis (KRUSKAL & WALLIS, 1952), correspondente a um teste não paramétrico baseado no ordenamento de todos os dados disponíveis para comparação de tendência central entre grupos independentes.

4.2.2.2 Elaboração de *folder* de divulgação científica

As análises dos dados dos questionários serviram para subsidiar/embasar a elaboração de um *folder* de divulgação científica sobre os princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à conservação biológica, com ênfase no tráfico de animais silvestres. A escolha de elaboração de um *folder* como material de divulgação científica baseou-se no propósito (ser utilizado como uma ferramenta de comunicação para informar produtos, atividades, conceitos ou projetos específicos, características técnicas ou ações sociais) e nas características deste (impresso gráfico de material dobrado e com ilustrações, com uma sequência de argumentos, de forma a despertar a curiosidade para a abertura do mesmo). Este material de

divulgação tem como alvo a própria comunidade universitária da UNESP-Botucatu, utilizada na amostragem/levantamento de dados, e também professores e estudantes de escolas públicas e particulares de ensino básico, visando além da aprendizagem, um alerta contra o tráfico ilegal de animais silvestres, especialmente as aves.

De forma a gerar um material não somente de difusão científica (referente a todo e qualquer processo usado para comunicação da informação científica e tecnológica) como também de divulgação científica (termo também conhecido como popularização científica, definida como o uso de processos e recursos técnicos para a comunicação da informação científica e tecnológica ao público em geral), este *folder* foi elaborado com uma linguagem apropriada a este fim.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de dois capítulos, referentes aos dados de amostragem biológica e genéticos (Capítulo 1) e aos dados de divulgação científica (Capítulo 2). Adicionalmente, parte dos dados de revisão bibliográfica e dos resultados obtidos encontra-se no trabalho "Genética da conservação aplicada ao tráfico ilegal de aves", publicado na revista Saúde, Ética e Justiça (Anexo V).

5.1 CAPÍTULO 1

5.1.1 Espécies analisadas

No Brasil, estima-se que, por ano, 12 a 38 milhões de animais silvestres estejam envolvidos no tráfico ilegal. Dado que o país possui a mais rica avifauna do mundo, a maior porcentagem de animais traficados refere-se a espécies deste grupo, o que corresponde a 4 bilhões de animais comercializados ilegalmente. Deste total, cerca de 70% são destinadas ao comércio interno e o restante é exportado. Entretanto, apenas um reduzido número de aves é apreendido e um número ainda mais restrito é devolvido à natureza. Algumas espécies possuem alta cotação no mercado internacional, como a arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*), que chega a alcançar U\$ 60 mil, e o papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), vendido por U\$ 6

mil, sendo destinadas a coleções e zoológicos particulares. Outras espécies, como a arara-vermelha grande (*Ara chloroptera*), o papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), o papagaio-do-mangue (*A. amazonica*) e o tucanuçu (*Ramphastos toco*), comumente entram no mercado ilícito como animais de estimação (RIBEIRO & SILVA, 2007). Devido a este interesse, várias espécies comercializadas já encontram-se listadas pelo CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*), no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2008) e pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*, 2013).

Entre as 53 espécies analisadas no presente estudo, 31 encontram-se listadas pelo CITES (Tabelas 6 - 9). Destas, três espécies - *Brotogeris tirica* (periquito rico), *Paroaria gularis* (cardeal da Amazônia) e *Amazona rhodocorytha* (chauá) - são endêmicas do Brasil. Ressalta-se que, embora algumas das espécies em estudo não contenham dados junto ao CITES, estas são comumente envolvidas no tráfico de animais silvestres, dado que apreensões da Polícia Ambiental e análises de feiras livres têm evidenciado seu comércio de forma corriqueira em diversas regiões do Brasil (FERREIRA & GLOCK, 2004; ARAUJO *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2012).

Adicionalmente, algumas espécies analisadas - *Sporophila maximiliani* (bicudo), *Guaruba guarouba* (ararajuba), *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara azul), *Amazona vinacea* (papagaio de peito roxo) e *Amazona rhodocorytha* (chauá) - encontram-se na lista oficial do MMA como espécies da fauna nacional ameaçadas de extinção. Dados mais abrangentes, obtidos da IUCN evidenciam que uma espécie - *Cacatua sulphurea* (cacatua de crista amarela) - é classificada como "criticamente em perigo", cinco espécies - *Guaruba guarouba* (ararajuba), *Ara rubrogenys* (ararinha de testa vermelha), *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara azul), *Amazona vinacea* (papagaio de peito roxo) e *Amazona rhodocorytha* (chauá) - são classificadas como "em perigo", uma espécie - *Pionites leucogaster* (marianinha de cabeça preta) - é categorizada como "vulnerável" e quatro espécies - *Sporophila maximiliani* (bicudo), *Gallicolumba luzonica* (pomba apunhalada), *Tinamus solitarius* (macuco) e *Alipiopsitta xanthops* (papagaio galego) - são categorizadas no nível "quase ameaçada" (Tabelas 6 a 9). Embora as demais espécies estudadas sejam de baixa preocupação, segundo os critérios do IUCN, suas populações geralmente encontram-se em declínio (Tabelas 6 a 9). Desta forma, pode-se identificar que, entre as espécies do presente estudo comumente associadas ao tráfico ilegal, diversas são também consideradas

ameaçadas de extinção. Dados acerca destas espécies indicam que os fatores de declínio populacional são geralmente associados tanto à degradação ambiental como ao comércio ilegal.

Alipiopsitta xanthops, uma espécie de psitacídeo que, no Brasil, encontra-se restrita a regiões de cerrado e caatinga (SNYDER *et al.*, 2000), havia sido classificada, no período de 1994 a 2000, como "vulnerável". Entretanto, posteriormente, devido ao rápido declínio associado à perda de habitat (STOTZ *et al.* 1996; SNYDER *et al.*, 2000), passou a ser incluída na categoria "quase ameaçada".

Outro psitacídeo, endêmico do Brasil e encontrado na faixa litorânea leste do país, nos estados de Alagoas e Bahia, até o leste de Minas Gerais, Rio de Janeiro e litoral-norte de São Paulo, *Amazona rhodocorytha* vem sendo classificada como "em perigo" desde 2000, fato associado à fragmentação severa e grande declínio populacional. Adicionalmente, o tráfico de indivíduos adultos e, especialmente, de filhotes, responde por uma ameaça adicional à espécie, composta atualmente por cerca de 1.000 - 2.499 indivíduos. Atualmente, *A. rhodocorytha* pode ser encontrada em fragmentos isolados de mata Atlântica no leste do Brasil, especialmente no estado do Espírito Santo (KLEMMANN *et al.*, 2008). Outra espécie do gênero *Amazona* incluída neste estudo, o papagaio de peito roxo *A. vinacea*, também classificada como "em perigo", possui um número global extremamente reduzido e as populações vêm sofrendo um declínio acentuado e rápido. No Brasil, existe cerca de 1.500-2.000 indivíduos, o que está associado à extensa perda de habitat e fragmentação, levando à espécie a ser considerada rara ao longo de sua área natural de ocorrência. Embora ainda existam populações no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e São Paulo, *Amazona vinacea* provavelmente está próxima à extinção na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Adicionalmente, este é considerado o papagaio mais comercializado e comumente visto como animal de estimação, na região Sul do país, fato que também tem levado ao declínio das populações (BENCKE & RUPP, 2009).

Classificada como "vulnerável" até 1996, a maior espécie de arara - *Anodorhynchus hyacinthinus* - atualmente encontra-se na categoria "em perigo" devido à rápida redução populacional e à massiva captura ilegal com fins comerciais (COLLAR *et al.*, 1992; ANON, 2004). Ao menos 10.000 aves foram retiradas do ambiente natural na década de 1980 e, destas, 50% foram destinadas ao mercado nacional (MITTERMEIER *et al.*, 1990). Embora atualmente estes

números sejam muito mais reduzidos, o tráfico ilegal da arara azul continua corriqueiro. A espécie originalmente ocorria em três áreas do Brasil - leste da Amazônia, Tocantins/Maranhão/Piauí/Bahia/Goiás/Mato Grosso/Minas Gerais e Pantanal do Mato Grosso. Atualmente, grande parte dos animais encontra-se localizada no Pantanal, local em que, desde 1990, a espécie tem dado sinais de recuperação e expansão (PINHO & NOGUEIRA, 2003; ANON, 2004), provavelmente em resposta a programas nacionais de conservação. As demais populações tendem a decrescer, contando com apenas cerca de 1.500 indivíduos, especialmente devido ao desmatamento, queimadas, instalação de hidroelétricas, tráfico e caça (ANON, 2004).

Atualmente, as populações de ararinha de testa vermelha *Ara rubrogenys* encontram-se em declínio e são extremamente pequenas (ROJAS *et al.*, 2012), características que qualificaram a espécie como "em perigo". Originária da Bolívia, atualmente estima-se que existam entre 1.000 a 4.000 exemplares deste psitacídeo, devido especialmente ao desmatamento e aos pesticidas associados à agricultura (ROJAS *et al.*, 2012). Adicionalmente, a espécie é comumente correlacionada ao tráfico de animais silvestres (PITTER & CHRISTIANSES, 1995).

O periquito rico, *Brotozeris tirica*, psitacídeo nativo do Brasil, é típico da Mata Atlântica e ocorre desde os estados de Alagoas e Bahia até o Rio Grande do Sul. Embora seja considerado um periquito comum, a espécie, além de sofrer os efeitos do desmatamento, também sofre grande captura destinada ao comércio ilegal de animais silvestres (COLLAR, 1997; SICK, 1997), fato que a levou a figurar na base de dados do CITES.

Similarmente ao observado para *Anodorhynchus hyacinthinus*, *Cacatua sulphurea* (Cacatuidae) também subiu de nível de ameaça devido a efeitos antrópicos. Até o ano de 1996, esta espécie de cacatua era considerada como "em perigo". Atualmente, devido ao rápido declínio populacional, especialmente associado ao tráfico ilegal (WALKER *et al.*, 2005; IMANSYAH *et al.*, 2005), a espécie encontra-se na categoria "criticamente em perigo". Adicionalmente, o desmatamento associado à agricultura também acentuaram seu declínio (WALKER *et al.*, 2005).

A espécie de Collumbidae *Gallicolumba luzonica* encontra-se, desde 2004, na categoria "quase ameaçada" devido às populações pequenas, cujo declínio refere-se basicamente à caça. Adicionalmente, como comum a outras espécies de aves, o declínio populacional da pomba

apunhalada também está relacionado ao desmatamento, fato associado à expansão da agricultura (GIBBS *et al.*, 2001).

Guaruba guarouba, espécie de psitacídeo encontrado na bacia Amazônica e endêmica das regiões de Tocantins, baixo Xingú e Tapajós, e classificada como "em perigo", tem seu declínio associado a uma grande perda de habitat, especialmente devido à construção de rodovias, e a um intenso tráfico, sendo uma das espécies de aves mais cobiçadas por comerciantes ilegais. Atualmente, a ararajuba ocorre em remanescentes florestais bem conservados. Entretanto, dados mais recentes têm indicado que o número de indivíduos (entre 1.000 e 2.499) pode ser maior do que previamente estimado (HENNESSEY, 2009), o que poderá levar a uma nova classificação da espécie como "vulnerável".

O bicudo *Sporophila maximiliani*, pertencente à família Emberizidae, encontra-se na categoria de "quase ameaçada" devido, especialmente, ao intenso tráfico ilegal e à degradação ambiental. Embora, no Brasil tenha uma vasta distribuição - Amazônia, Brasil Central (Rondônia, Mato Grosso), Nordeste (Alagoas, Bahia) e Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) - a espécie já é considerada rara, ocorrendo em áreas pontuais e dispersas, pois sofre uma constante pressão de captura. Atinge elevado valor no comércio ilegal de fauna silvestre, sendo bastante procurada como ave de gaiola devido a seu canto (OLMOS, 1993; STOTZ *et al.*, 1996).

Espécie passeriforme da família Thraupidae encontrada na bacia Amazônica, o cardeal da Amazônia *Paroaria gularis* vive em matas de várzeas e beiras de rios e, devido à sua plumagem contrastante, tem suas populações em franco declínio devido ao comércio ilegal, sendo uma das aves de gaiola mais procuradas e apreciadas no Brasil (SILVEIRA, 2012). Outra espécie encontrada na região amazônica, a marianinha de cabeça preta *Pionites leucogaster*, encontra-se distribuída do Rio Madeira até o Maranhão (DEL HOYO *et al.*, 1997). Esta espécie de Psittaciformes considerada de "baixa preocupação" até 2009, atualmente é tida como "vulnerável", especialmente devido ao desmatamento e à caça voltada ao comércio de animais silvestres (SOARES-FILHO *et al.*, 2006).

Colocada na categoria "quase ameaçada", *Tinamus solitarius* (Tinamiformes, Tinamidae) pode ser encontrada na mata Atlântica do Brasil, desde Pernambuco até o Rio Grande do Sul, e

também no sul do Mato Grosso (CABOT *et al.*, 1992; SICK, 1993). Seu declínio é associado à sua grande suscetibilidade à fragmentação florestal e ao tráfico ilegal.

As aves silvestres pertencentes aos grupos Psittaciformes e Passeriformes são as mais frequentemente capturadas na natureza e são corriqueiras as apreensões por autoridades ambientais nacionais (WRIGHT *et al.*, 2001), com posterior encaminhamento a Centros de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS), Centros de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) e Criadouros Científicos de Fauna Silvestre. Tais dados puderam ser também constatados para a região de Botucatu (SP), já que estavam disponíveis para o presente estudo diversos Psittaciformes e Passeriformes mantidos junto ao CETAS do Instituto Floravida e ao CEMPAS da UNESP (Tabelas 6 e 7).

Dados adicionais da Polícia Ambiental de Botucatu indicam que, nos anos de 2009, 2010, 2011 e 2012, foram apreendidos, respectivamente, 533, 770, 300, 41 e 1.644 exemplares de diferentes espécies de aves nesta região. Entre as aves mais comumente associadas ao tráfico ilegal na região encontram-se espécies da família Emberizidae, como o trinca ferro (*Saltador similis*) e o canário da terra (*Sicalis flaveola*), da família Turdidae, como o sabiá laranjeira (*Turdus rufiventris*), e da família Psittacidae, como a maitaca verde (*Pionus maximiliani*) e o papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) (Polícia Ambiental de Botucatu, informação pessoal).

Dada sua habilidade de imitar a voz humana, inteligência, beleza e docilidade, os Psittacidae compreendem as aves mais populares e procuradas como animais de estimação no mundo, fato que também as torna as mais comercializadas ilegalmente (RENTAS, 2002). De acordo com SICK (1997), apenas cerca de 5% dos psitacídeos comercializados são provenientes de criação em cativeiro, sendo o restante retirado de seu ambiente natural. Embora a reprodução destes animais seja difícil em cativeiro, existe um crescente aumento de criatórios legalizados no país e o domínio de técnicas de reprodução deve aumentar a oferta de animais a serem comercializados de forma legal. O número de espécies de psitacídeos presentes no Criadouro C.A. e no Criadouro Poços de Caldas (Tabelas 8 e 9) e disponibilizados para o presente estudo evidenciam esta tendência.

De forma similar com o que ocorre em relação ao tráfico ilegal interno no Brasil, espécies de Psittaciformes e Passeriformes são também comumente envolvidas no comércio ilegal

internacional. A presença de espécies não nativas do Brasil - como *Bolborhynchus lineola*, encontrada na Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru e Venezuela, e *Thraupis abbas*, natural de El Salvador, Guatemala, Honduras, México e Nicarágua - junto ao CETAS do Instituto Floravida (Tabela 6) e ao CEMPAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Tabela 7) mostra que espécies exóticas podem estar associadas ao comércio ilegal na região de Botucatu.

Tabela 6: Dados de ameaça de extinção e tráfico ilegal das espécies estudadas oriundas do Projeto Centrofauna, correspondente a um Centro de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS) mantido pela ONG Instituto Floravida (Empresa Anidro do Brasil, Botucatu, SP). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP). IUCN - *International Union for Conservation of Nature (Red List Data, 2013)*, MMA - Ministério do Meio Ambiente (Livro Vermelho das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2008), CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Species Database, 2013)*.

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	IUCN	MMA	CITES
1	Maitaca verde	<i>Pionus maximiliani</i>	Psittaciformes	Psittacidae	LC pop. tende a decrescer	-	+
2	Periquitão maracanã	<i>Aratinga leucophthalma</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
3	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
4	Curica	<i>Amazona amazonica</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
5	Catarina	<i>Bolborhynchus lineola</i>			LC pop. estável	-	+
6	Sabiá laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	Passeriformes	Turdidae	LC pop. estável	-	-
7	Tico tico	<i>Zonotrichia capensis</i>		Emberizidae	LC pop. estável	-	-
8	Azulão	<i>Cyanoloxia brissonii</i>		Cardinalidae	-	-	-
9	Trinca ferro verdadeiro	<i>Saltator similis</i>		Thraupidae	LC pop. tende a decrescer	-	-
10	Cardeal da Amazônia	<i>Paroaria gularis</i>			LC pop. estável	-	+(EB)
11	Bico de prata	<i>Ramphocelus carbo</i>			LC pop. estável	-	-
12	Pomba doméstica	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Columbidae	LC pop. tende a decrescer	-	+
13	Tucanuçu	<i>Ramphastos toco</i>	Piciformes	Ramphastidae	LC pop. tende a decrescer	-	-
14	Anu branco	<i>Guira guira</i>	Cuculiformes	Cuculidae	LC pop. tende a crescer	-	+
15	Beija flor tesoura	<i>Eupetomena macroura</i>	Apodiformes	Trochilidae	LC sem dados pop.	-	+

Categoria da IUCN: LC, *Least Concern* (baixa preocupação).

pop., população; +, presente na respectiva lista; -, ausente na respectiva lista; EB, endêmica do Brasil.

Tabela 7: Dados de ameaça de extinção e tráfico ilegal das espécies estudadas oriundas do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP). IUCN - *International Union for Conservation of Nature (Red List Data, 2013)*, MMA - Ministério do Meio Ambiente (Livro Vermelho das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2008), CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Species Database, 2013)*.

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	IUCN	MMA	CITES
16	Bicudo	<i>Sporophila maximiliani</i>	Passeriformes	Emberizidae	NT pop. tende a decrecer	+	-
17	Galo da campina	<i>Paroaria dominicana</i>		Thraupidae	LC pop. estável	-	-
18	Sanhaço	<i>Thraupis abbas</i>			LC pop. estável	-	-
19	Coruja buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>			LC pop. tende a decrecer	-	+
20	Rolinha roxa	<i>Columbina talpacoti</i>	Columbiformes	Columbidae	LC pop. tende a crescer	-	-
21	Seriema	<i>Cariama cristata</i>	Cariamiformes	Cariamidae	LC pop. estável	-	-
22	Gavião	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitriformes	Accipitridae	LC pop. tende a crescer	-	+
23	Falcão de coleira	<i>Falco femoralis</i>	Falconiformes	Falconidae	LC pop. tende a crescer	-	+
24	Tucanuçu	<i>Ramphastos toco</i>	Piciformes	Ramphastidae	LC pop. tende a decrecer	-	-
25	Periquito rico	<i>Brotogeris tirica</i>	Psittaciformes	Psittacidae	LC pop. estável	-	+(EB)
26	Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>			LC pop. tende a decrecer	-	+

Categorias da IUCN: NT, *Near Threatened* (quase ameaçada); LC, *Least Concern* (baixa preocupação).
pop., população; +, presente na respectiva lista; -, ausente na respectiva lista.

Tabela 8: Dados de ameaça de extinção e tráfico ilegal das espécies estudadas oriundas do Criadouro C.A. (Itatiba, SP). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP). IUCN - *International Union for Conservation of Nature (Red List Data, 2013)*, MMA - Ministério do Meio Ambiente (Livro Vermelho das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2008), CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Species Database, 2013)*.

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	IUCN	MMA	CITES
27	Lóris rubritorquis	<i>Trichoglossus haematodus rubritorquis</i>	Psittaciformes	Psittacidae	LC pop. tende a decrescer	-	+
28	Marianinha de cabeça preta	<i>Pionites melanocephalus</i>			LC pop. estável	-	+
29	Marianinha de cabeça amarela	<i>Pionites leucogaster</i>			VU pop. estável	-	+
30	Cacatua de crista amarela	<i>Cacatua sulphurea</i>		Cacatuidae	CR pop. tende a decrescer	-	+
31	Melro metálico púrpura	<i>Lamprotornis purpureus</i>	Passeriformes	Sturnidae	LC pop. estável	-	-
32	Pomba de fruta perlatus	<i>Ptilinopus perlatus</i>	Columbiformes	Columbidae	LC pop. estável	-	-
33	Pomba de fruta melanospila	<i>Ptilinopus melanospilus</i>			LC pop. estável	-	-
34	Pomba soberba	<i>Ptilinopus superbus</i>			LC pop. estável	-	-
35	Pomba apunhalada	<i>Gallicolumba luzonica</i>			NT pop. tende a decrescer	-	+
36	Pomba asa verde	<i>Chalcophaps indica</i>			LC pop. tende a decrescer	-	-
37	Pomba de fruta chalconota	<i>Ducula aenea paulina</i>			LC pop. estável	-	-
38	Pomba coleira	<i>Streptopelia risoria</i>			-	-	-
39	Turaco persa ou turaco de crista branca	<i>Tauraco leucolophus</i>	Musophagiformes	Musophagidae	LC pop. estável	-	+
40	Turaco de orelha branca	<i>Tauraco leucotis</i>			LC pop. estável	-	+
41	Turaco violeta	<i>Musophaga violacea</i>			LC pop. estável	-	+
42	Macuco	<i>Tinamus solitarius</i>	Tinamiformes	Tinamidae	NT pop. tende a decrescer	-	+

Categorias da IUCN: LC, *Least Concern* (baixa preocupação); VU, *Vulnerable* (vulnerável); CR, *Critically Endangered* (criticamente em perigo); NT, *Near Threatened* (quase ameaçada).
pop., população; +, presente na respectiva lista; -, ausente na respectiva lista.

Tabela 9: Dados de ameaça de extinção e tráfico ilegal das espécies estudadas oriundas do Criadouro Poços de Caldas (Poços de Caldas, MG). ID, número de identificação dos animais junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP). IUCN - *International Union for Conservation of Nature (Red List Data, 2013)*, MMA - Ministério do Meio Ambiente (Livro Vermelho das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2008), CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (Species Database, 2013)*.

ID	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	IUCN	MMA	CITES
43	Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	Psittaciformes	Psittacidae	EN pop. tende a decrescer	+	-
44	Arara vermelha grande	<i>Ara chloropterus</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
45	Araracanga	<i>Ara maçã</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
46	Arara canindé	<i>Ara ararauna</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
47	Macaranã - guaçu	<i>Ara severus</i>			LC pop. estável	-	+
48	Ararinha de testa vermelha	<i>Ara rubrogenys</i>			EN pop. tende a decrescer	-	+
49	Arara azul grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>			EN pop. tende a decrescer	+	+
50	Papagaio campeiro	<i>Amazona ochrocephala</i>			-	-	-
51	Papagaio galego	<i>Alipiopsitta xanthops</i>			NT pop. tende a decrescer	-	-
52	Papagaio moleiro	<i>Amazona farinosa</i>			LC pop. tende a decrescer	-	+
53	Papagaio de peito roxo	<i>Amazona vinacea</i>			EN pop. tende a decrescer	+	+
54	Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>			EN pop. tende a decrescer	+	+(EB)
55	Graúna	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Passeriformes	Icteridae	LC pop. estável	-	-

Categorias da IUCN: EN, *Endangered* (em perigo); NT, *Near Threatened* (quase ameaçada).
pop., população; +, presente na respectiva lista; -, ausente na respectiva lista; EB, endêmica do Brasil.

5.1.2 Análises genéticas

5.1.2.1 Isolamento de DNA

Amostras de DNA foram obtidas de 124 exemplares, pertencentes a 53 espécies de aves de famílias diversas (Tabelas 2 a 5), por meio da utilização de diferentes materiais biológicos (penas adultas, penas em crescimento e sangue) e diferentes técnicas de extração (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, *kit Phire Animal Tissue Direct PCR* e *FTA Classic Card*).

O uso de penas e sangue para isolamento de DNA representa uma forma não destrutiva de amostragem biológica em aves (WAITS *et al.*, 2005; PAULI *et al.*, 2009). Embora invasivas, as coletas de penas e de sangue implicam somente em um pequeno período de estresse aos animais, dado que é necessário realizar a contenção e a manipulação destes. Não foram relatados quaisquer problemas associados a infecções, morte ou alterações no comportamento dos animais utilizados no presente estudo.

As amostras de DNA obtidas de penas em crescimento, utilizando tanto a metodologia que emprega fenol/clorofórmio/álcool isoamílico como o *kit Phire Animal Tissue Direct PCR*, apresentaram valores de 1,8 a 2,1 em comparações de absorbância a 260/280nm. Amostras de DNA isoladas de penas adultas, com ambas metodologias, mostraram valores muito abaixo dos parâmetros ideais, neste mesmo espectro de absorbância. Adicionalmente, embora as penas coletadas tenham apresentado grande variação de tamanho, penas em crescimento, grandes ou pequenas, resultaram em amostras de DNA de melhor qualidade (mais íntegras) e em maior quantidade quando comparadas com penas já adultas (Figura 7). Tal resultado pode ser correlacionado à presença de tecido rico em divisões celulares na região da polpa dérmica das penas em crescimento, característica que tem tornado este material comumente empregado em metodologias não destrutivas para isolamento de DNA de penas de diferentes espécies de aves (TABERLET & BOUVET, 1991; SEGELBACHER, 2002).

Em relação à aplicação de metodologia de isolamento de DNA com o uso de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, penas em crescimento com a região do cálam (base da pena inserida na derme e que contém um pouco de tecido) maior que 1-2 cm forneceram resultados melhores (quantidades de DNA variáveis entre 20-150 ng/μl). Penas com cálamos de menor

tamanho (menor do que 1 cm) mostraram-se não muito adequadas, já que forneceram quantidades reduzidas de DNA (5-10ng/ μ l), o que dificulta sua aplicação em análises moleculares em que há necessidade de utilização de maiores quantidades de DNA.

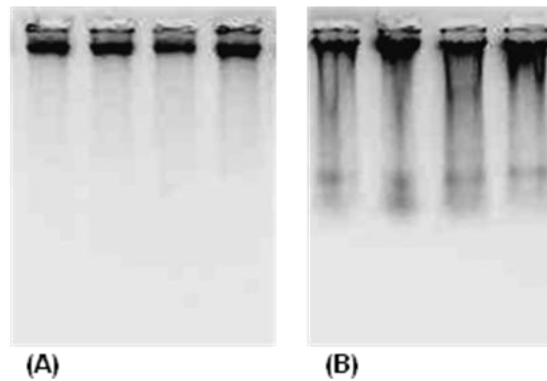


Figura 7: Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando amostras de DNA obtidas a partir de penas em crescimento (A) e de penas adultas (B).

Embora penas adultas tenham gerado DNA de menor qualidade e em menor quantidade, o *kit Phire Animal Tissue Direct PCR* mostrou-se adequado para isolamento de amostras da região do umbílico superior (Figura 8), mesmo em cálamos menores que 1cm. Como nesta região se encontra um pequeno coágulo de sangue remanescente da artéria axial (PROCTOR & LYNCH, 1993), mesmo penas adultas em que a polpa mesenquimal foi completamente reabsorvida do cálamos e em que, portanto, apenas permanece uma polpa queratinizada (HODGES, 1974), podem corresponder a uma alternativa para o isolamento de DNA (HORVÁTH *et al.*, 2005).

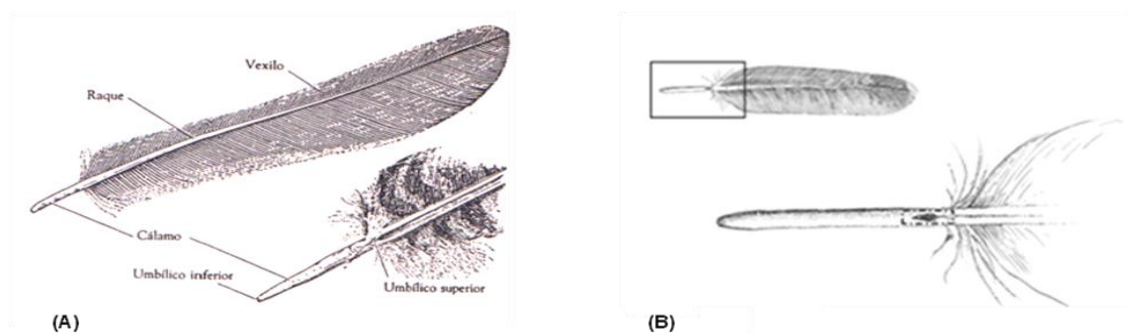


Figura 8: Representações de penas de aves, indicando as regiões do cálamos, umbílico superior e umbílico inferior (A) e do coágulo de sangue presente na região do umbílico superior (B). Modificado de HORVÁTH *et al.* (2005).

As amostras de DNA sangue, todas isoladas a partir de cartões FTA, mostraram-se de ótima qualidade, com valores de 1,8 a 2,1 em comparações de absorbância a 260/280nm ao espectrofotômetro. A presença de produtos químicos que lisam as células associada à presença de produtos que desnaturam proteínas e protegem os ácidos nucleicos de danos de nucleases e de radiações UV, permitem a correta manutenção dos tecidos e posterior extração de amostras de DNA íntegras. (GE Healthcare Life Sciences Application Note 28-9822-24). Além disso, o *kit* permitiu a obtenção de DNA em um tempo extremamente reduzido (cerca de 50-60 minutos) quando comparado ao tempo despendido à obtenção de DNA pelo uso de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (2 dias). Embora amostras de sangue de aves geralmente levem à obtenção de DNA de excelente qualidade e quantidade, já que os eritrócitos destes animais são nucleados sendo, portanto, uma rica fonte de DNA nuclear, a quantidade das amostras de DNA obtidas no presente estudo foi baixa, fato que pode estar associado à utilização de apenas uma gota de sangue de cada animal por meio do corte da unha.

Todas as amostras de DNA obtidas foram amplificadas com sucesso via PCR, evidenciando que tanto as diferentes amostras biológicas como as diferentes metodologias utilizadas foram eficientes para obtenção de quantidades suficientes de DNA para as análises de sexagem molecular.

5.1.2.2 Sexagem molecular

A identificação de machos e fêmeas em diversas espécies de aves pode ser atualmente realizada por meio da denominada “sexagem molecular”, em que se analisa uma determinada porção do genoma que apresenta diferenças entre os sexos. Como as aves apresentam um sistema de determinação sexual do tipo ZZ (machos) / ZW (fêmeas), um segmento de DNA único ao cromossomo sexual W presente unicamente nas fêmeas pode ser considerado um marcador ideal para identificação do sexo nestes animais (MIYAKI *et al.*, 1998).

Um destes marcadores identificados em aves refere-se ao gene *CHD* (cromo-helicase-DNA-ligante) - o gene *CHD-Z* é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo, portanto em ambos os sexos, enquanto o gene *CHD-W* localiza-se no cromossomo W, presente somente nas fêmeas

(GRIFFITHS *et al.*, 1998). Não há evidências de recombinação entre estes dois genes e nenhuma cópia autossômica foi identificada (KAHN & QUINN, 1999). Embora em algumas aves os íntrons destes genes possuam tamanhos muito similares, como evidenciado em avestruz e emu (Ratitas), na maioria das espécies o tamanho do gene *CHD* é um pouco maior no cromossomo W, comparado ao tamanho deste gene presente no cromossomo Z, devido à presença de bases adicionais em uma região de íntron (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Diferentes conjuntos de oligonucleotídeos foram desenvolvidos para serem utilizados em PCR para amplificação de segmentos dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* em um grande número de espécies de aves, de forma a identificar diferenças de tamanho nos íntrons destes genes (ELLEGREEN, 1996; GRIFFITHS *et al.*, 1996; ELLEGREN & SHELDON, 1997; GRIFFITHS *et al.*, 1998; FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 1999). O conjunto de oligonucleotídeos mais comumente utilizado para identificação do sexo em aves refere-se aos *primers* denominados P2 e P8 (GRIFFITHS *et al.*, 1998) que se anelam a regiões conservadas de éxons dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* e amplificam uma região de íntron que difere em tamanho entre os dois genes, resultando na identificação de um único fragmento de DNA em machos (genótipo homozigoto) e de dois fragmentos distintos em fêmeas (genótipo heterozigoto) (GRIFFITHS *et al.*, 1998).

Dado o exposto, no presente trabalho, a identificação do sexo de exemplares de espécies de aves pertencentes a diferentes ordens e famílias foi feita por meio da amplificação dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* utilizando os *primers* P2 e P8 em PCR. Para todos os 124 exemplares analisados, de 53 espécies diferentes, pertencentes às ordens Psittaciformes (famílias Psittacidae e Cacatuidae), Passeriformes (famílias Turdidae, Emberezidae, Cardinalidae, Thraupidae, Sturnidae e Icteridae), Columbiformes (família Columbidae), Piciformes (família Ramphastidae), Cuculiformes (família Cuculidae), Apodiformes (família Trochilidae), Cariamiformes (família Cariamidae), Accipitriformes (família Accipitridae), Falconiformes (família Falconidae), Musophagiformes (família Musophagidae) e Tinamiformes (família Tinamidae) (Tabelas 2 a 5), foi possível gerar produtos de amplificação e visualizar um ou dois fragmentos de DNA em gel de agarose 2%. Dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos foram evidenciados para fêmeas e um único fragmento de DNA foi evidenciado para machos (Figuras 9 e 10).

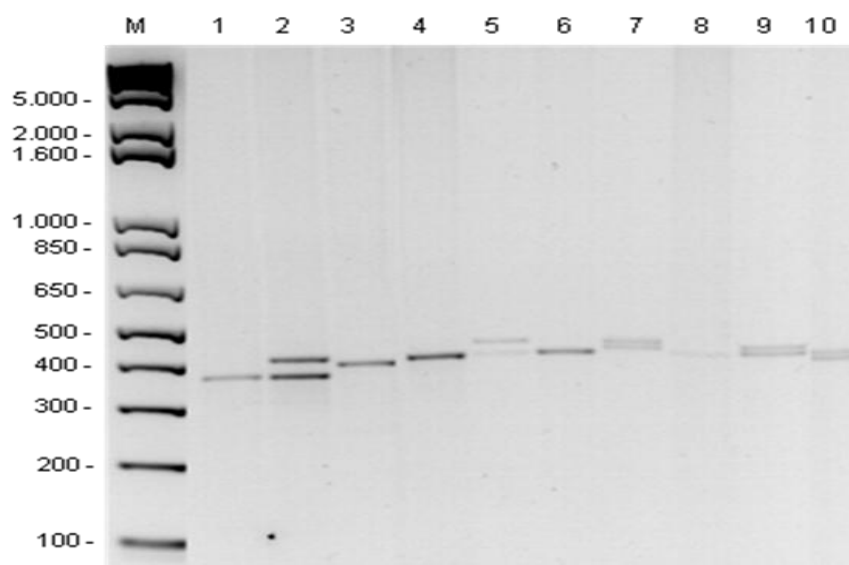


Figura 9: Produtos de PCR, relativos à amplificação de genes *CHD-Z* e *CHD-W* em diferentes espécies de aves, visualizados em gel de agarose 2%. 1. *Saltator similis* (trinca ferro - macho), 2. *Turdus rufiventris* (sabiá laranja - fêmea), 3. *Pionus maximiliani* (maritaca - macho), 4. *Aestiva aestiva* (papagaio verdadeiro - macho), 5. *Aratinga leucophthalmus* (periquitão maracanã - fêmea), 6. *Loris rubritorquis* (loris - macho), 7. *Aestiva aestiva* (papagaio verdadeiro - fêmea), 8. *Elanus leucurus* (gavião - macho), 9. *Falco femoralis* (falcão de coleira - fêmea), 10. *Gnorimopsar chopi* (pássaro preto - fêmea). M, marcador de peso molecular de 1Kb (indicações em pares de bases).

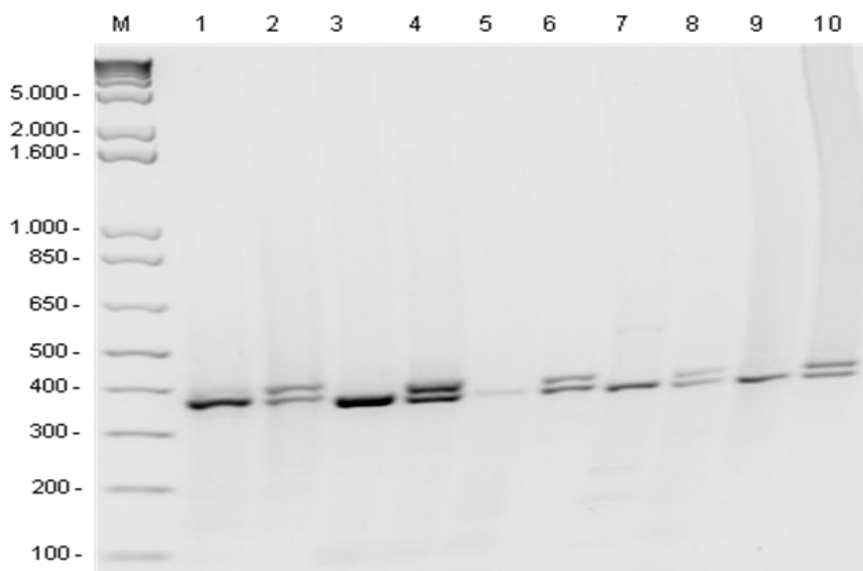


Figura 10: Produtos de PCR, relativos à amplificação de genes *CHD-Z* e *CHD-W* em diferentes espécies de aves, visualizados em gel de agarose 2%. 1. *Guaruba guarouba* (ararajuba - macho), 2. *Guaruba guarouba* (ararajuba - fêmea), 3. *Ara chloroptera* (arara vermelha - macho), 4. *Ara chloroptera* (arara vermelha - fêmea), 5. *Ara macao* (araracanga - macho), 6. *Ara macao* (araracanga - fêmea), 7. *Ara ararauna* (arara canindé - macho), 8. *Ara ararauna* (arara canindé - fêmea), 9. *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara azul - macho), 10. *Anodorhynchus hyacinthinus* (arara azul - fêmea). M, marcador de peso molecular de 1Kb (indicações em pares de bases).

Os resultados positivos obtidos confirmam o descrito inicialmente por GRIFFITHS *et al.* (1996, 1998) de que o conjunto de *primers* P2 e P8 é realmente adequado para amplificação de segmentos de DNA de diferentes tamanhos associados aos genes *CHD-Z* e *CHD-W*, o que permite a realização da sexagem molecular com precisão em um grande número de espécies de aves. Diversos outros trabalhos, envolvendo distintas aves também evidenciaram resultados eficazes de determinação do sexo utilizando a metodologia proposta por GRIFFITHS *et al.* (1998) (MIYAKI *et al.*, 1998; ANCIÃES & DEL LAMA, 2002; FARIA *et al.*, 2007; VUCICEVIC *et al.*, 2012).

Embora a identificação do sexo em aves possa ser realizada por meio de várias técnicas, como laparoscopia, dosagem de esteróides e cariotipagem, estas envolvem procedimentos muitas vezes extremamente invasivos, que causam grande nível de estresse nos animais, demandam treinamento técnico muito específico e nem sempre resultam em dados plenamente confiáveis. A laparoscopia requer anestesia e o procedimento deve ser realizado por um cirurgião veterinário. Além disso, os animais necessitam de cuidados pós-operatórios. A sexagem por meio da análise de esteróides é demorada e os níveis hormonais são variáveis tanto em indivíduos adultos, pois são dependentes das condições reprodutivas dos animais, como em embriões em diferentes estágios de desenvolvimento. Procedimentos citogenéticos que visam a análise cariotípica demandam tempo e geralmente metáfases apropriadas são somente obtidas após várias tentativas devido à necessidade de padronização das preparações celulares diretas ou das culturas celulares (GRIFFITHS *et al.*, 1998). Desta forma, a sexagem de aves por meio de análises de DNA, além de conferir um alto grau de confiabilidade ao resultado, possui outras vantagens em relação às demais técnicas, como o menor estresse e riscos de danos aos animais e possibilidade de ser aplicada em qualquer fase do desenvolvimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que foi possível implementar, junto ao Laboratório de Genética Animal (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP), a metodologia de sexagem molecular de aves. Embora as análises tenham sido restritas a alguns animais encontrados junto a quatro centros conservacionistas, pode-se considerar que tais resultados positivos sirvam de base para a implementação futura de um serviço corriqueiro de sexagem molecular de aves.

Para cada um dos indivíduos analisados no presente trabalho, foi emitido um laudo de diagnóstico de sexagem molecular (Anexo II). Neste laudo, consta o nome científico e o nome comum da espécie, o tipo de amostra biológica para isolamento de DNA, o nome do proprietário do animal (ou local em que o animal encontra-se alocado) e o resultado, ou seja, qual o sexo do animal. Além disso, este laudo também pode incluir informações de identificação dos animais, como número de anilha, quando pertinente. Os resultados obtidos apresentam alta confiabilidade, fator comprovado pela repetição da análise de sexagem de um mesmo indivíduo e pela utilização de amostras de DNA controle em PCR.

Laudos de sexagem molecular de todos os animais analisados foram encaminhados ao Centro de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS) mantido pela ONG Instituto Floravida (Empresa Anidro do Brasil, Botucatu, SP), ao Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP), ao Criadouro C.A. (Itatiba, SP) e ao Criadouro Poços de Caldas (Poços de Caldas, MG), que mantiveram parceria com o Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP para realização do presente trabalho.

Em aves, nem sempre é possível identificar o gênero somente pela observação de características morfológicas e/ou comportamentais. A correta identificação do sexo pode ser difícil até mesmo em espécies que apresentam dimorfismo sexual, já que tais características muitas vezes são sutis e/ou aparecem somente após o período de maturidade sexual (POUGH & HARVEY, 1999). Desta forma, dados de sexagem em aves são extremamente importantes em estudos de ecologia animal, comportamento e estrutura populacional e, especialmente, no manejo e conservação de espécies (RASO & WERTHER, 2004). No caso de aves em cativeiro para as quais são desenvolvidos programas de reprodução, muitos destes com fins conservacionistas, a sexagem é fundamental com o intuito de manter juntos machos e fêmeas em um mesmo viveiro ou gaiola. A correta formação de casais é especialmente difícil em espécies de aves que não apresentam dimorfismo sexual externo aparente, como ocorre em Psittacidae e Ramphastidae.

Programas de reprodução em cativeiro também podem auxiliar na redução do comércio clandestino de animais silvestres, à medida que exista a possibilidade de aquisição de animais de maneira lícita e confiável. Tal fato tem sido incentivado pelo IBAMA, por meio das Portarias 117 e

118, de 15 de outubro de 1997, que normatizam a criação em cativeiro de espécies nativas e a comercialização de animais vivos e abatidos e incentivam a criação legal de animais em criadouros conservacionistas (ALLGAYER & CZIULIK, 2007).

Desta forma, entende-se que os dados de sexagem molecular de espécies de aves obtidos no presente trabalho (Tabela 10) e que foram encaminhados aos quatro centros conservacionistas possam melhor subsidiar programas de recuperação, manutenção e reprodução em cativeiro e de soltura ou reintrodução desenvolvidos nestes locais, com especial importância para formação de casais potencialmente reprodutores.

Tabela 10: Dados de sexagem molecular associados às instituições de origem dos animais analisados: (A) Projeto Centrofauna-CETAS; (B) CEMPAS-FMVZ-UNESP; (C) Criadouro C.A; (D) Criadouro Poços d Caldas.

Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	No. total de indivíduos	No. de machos e instituição de origem	No. de fêmeas e instituição de origem
Ararajuba	<i>Guaruba guaruba</i>	Psittaciformes	Psittacidae	2 (D)		
Arara vermelha grande	<i>Ara chloropterus</i>			2 (D)		
Araracanga	<i>Ara macao</i>			2 (D)		
Arara canindé	<i>Ara ararauna</i>			2 (D)		
Ararinha de testa vermelha	<i>Ara rubrogenys</i>			1 (D)		
Maracanã - guaçu	<i>Ara severus</i>			2 (D)		
Arara azul grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>			2 (D)		
Maitaca verde	<i>Pionus maximiliani</i>			8 (A)		
Periquitão maracanã	<i>Aratinga leucophthalma</i>			4 (A)		
Papagaio verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>			8 (A) 8 (B)		
Papagaio campeiro	<i>Amazona achrocephala</i>			2 (D)		
Papagaio moleiro	<i>Amazona farinosa</i>			2 (D)		
Papagaio de peito roxo	<i>Amazona vinacea</i>			2 (D)		
Chauá	<i>Amazona rhodocorytha</i>			2 (D)		
Papagaio galego	<i>Alipiopsitta xanthops</i>			2 (D)		
Periquito rico	<i>Brotogeris tirica</i>			5 (B)		
Marianinha de cabeça preta	<i>Pionites melanocephalus</i>			2 (C)		

Marianinha de cabeça amarela	<i>Pionites leucogaster</i>			4 (C)		
Curica	<i>Amazona amazonica</i>			1 (A)		
Catarina	<i>Bolborhynchus lineola</i>			3 (A)		
Lóris rubritorquis	<i>Trichoglossus haematodus rubritorquis</i>			1 (C)		
Cacatua de crista amarela	<i>Cacatua sulphurea</i>		Cacatuidae	1 (C)		
Sabiá laranjeira	<i>Turdus rufiventris</i>	Passeriformes	Turdidae	4 (A)		
Grauna	<i>Gnorimopsar chopi</i>		Icteridae	2 (D)		
Tico tico	<i>Zonotrichia capensis</i>		Emberizidae	2 (A)		
Bicudo	<i>Sporophila maximilliani</i>			1 (B)		
Azulão	<i>Cyanoloxia brissonii</i>		Cardinalidae	2 (A)		
Melro metálico púrpura	<i>Lamprotornis purpureus</i>		Sturnidae	1 (C)		
Trinca ferro verdadeiro	<i>Saltator similis</i>		Thraupidae	6 (A)		
Cardeal da Amazônia	<i>Paroaria gularis</i>			1 (A)		
Bico de prata	<i>Ramphocelus carbo</i>			3 (A)		
Galo de campina	<i>Paroaria domenicana</i>			2 (B)		
Sanhaço	<i>Thraupis abbas</i>			1 (B)		
Coruja buraqueira	<i>Athene cunicularia</i>			1 (B)		
Pomba doméstica	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Columbidae	2 (A)		
Pomba de fruta perlatus	<i>Ptilinopus perlatus</i>			1 (C)		
Pomba de fruta melanospila	<i>Ptilinopus melanospilus</i>			1 (C)		
Pomba soberba	<i>Ptilinopus superbus</i>			1 (C)		
Pomba apunhalada	<i>Gallicolumba luzonica</i>			1 (C)		
Pomba asa verde	<i>Chalcophaps indica</i>			1 (C)		
Pomba de fruta chalconata	<i>Ducula aenea paulina</i>			1 (C)		
Pomba coleira	<i>Streptopelia risoria</i>			1 (C)		
Rolinha roxa	<i>Columbina talpacoti</i>			1 (B)		
Tucanuçu	<i>Ramphastos toco</i>	Piciformes	Ramphastidae	8 (A) 2 (B)		
Anu branco	<i>Guira guira</i>	Cuculiformes	Cuculidae	1 (A)		
Beija flor tesoura	<i>Eupetomena macroura</i>	Apodiformes	Trochilidae	1 (A)		
Seriema	<i>Cariama cristata</i>	Cariamiformes	Cariamidae	1 (B)		

Gavião	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitriformes	Accipitridae	1 (B)		
Falcão de coleira	<i>Falco femoralis</i>	Falconiformes	Falconidae	2 (B)		
Turaco persa ou turaco de crista branca	<i>Tauraco leucolophus</i>	Musophagiformes	Musophagidae	1 (C)		
Turaco de orelha branca	<i>Tauraco leucotis</i>			1 (C)		
Turaco violeta	<i>Musophaga violacea</i>			1 (C)		
Macuco	<i>Tinamus solitarius</i>	Tinamiformes	Tinamidae	1 (C)		

5.1.2.3 Caracterização de segmentos de DNA associados aos genes *CHD*

A amplificação de fragmentos de DNA associados aos genes *CHD* em aves de distintas ordens e famílias permitiu identificar diferenças no tamanho de fragmento destes genes entre espécies diferentes, tanto em machos como em fêmeas (Figura 9), conforme já descrito também para outras espécies (GRIFFITHS *et al.*, 1998; GRIFFITHS, 2000; FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 2000; ANCIÃES & DEL LAMA, 2002). Para as espécies analisadas no presente trabalho, o tamanho do segmento do gene *CHD-Z* amplificado variou de cerca de 360 a 530 pares de bases (pb) e o tamanho do fragmento associado ao gene *CHD-W* amplificado variou de aproximadamente 400 a 580 pb.

Com o objetivo de caracterizar os polimorfismos de comprimento nos genes *CHD*, alguns fragmentos amplificados que apresentaram maior diferença de tamanho entre espécies foram selecionados para serem clonados e, posteriormente, sequenciados. Fragmentos de DNA associados aos genes *CHD-Z* de *Bolborhynchus lineola* (Psittaciformes, Psittacidae), *Columba livia* (Columbiformes, Columbidae) e *Falco femoralis* (Falconiformes, Falconidae), que apresentaram diferenças de tamanho facilmente visualizadas em gel de agarose 2% (Figura 11) foram caracterizados quanto à sua sequência nucleotídica. Para tanto, cinco clones de cada fragmento foram obtidos e, a partir destes, foram geradas sequências nucleotídicas consenso. A Figura 12 evidencia as sequências nucleotídicas consenso geradas para cada uma das três espécies analisadas e a Figura 13 mostra o alinhamento destas sequências. Comparações entre as sequências parciais dos genes *CHD-Z* destas espécies indicam uma similaridade de 76,08%

entre *C. livia* e *F. femoralis*, 69,97% entre *B. lineola* e *F. femoralis* e 65,21% entre *B. lineola* e *C. livia*.

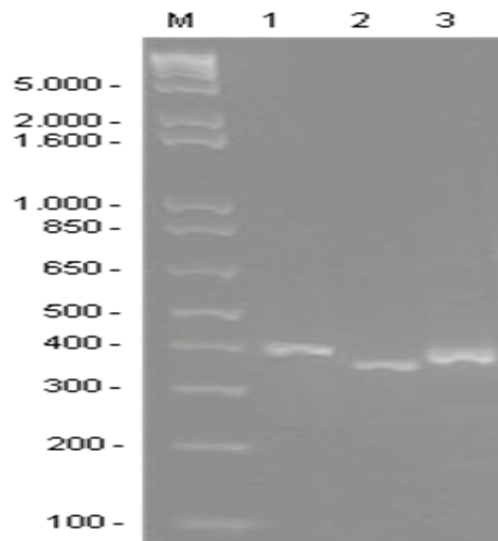


Figura 11: Produtos de PCR, relativos à amplificação de genes *CHD-Z*. 1. *Bolborhynchus lineola* (catarina), 2. *Columba livia* (pomba comum), 3. *Falco femoralis* (falcão de coleira). M, marcador de peso molecular de 1Kb (indicações em pares de bases).

(A)

TCTGCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCGCGAGGAATAGTTCGTGGTCTCCACGTTTTCTTGGTCGTTTTCTTCTGAGATGGAGTCACTATCAGATCCAGAATATCT
TCTGCTCCTACTGTGTCTCCTTTCACTTCCATTAAACCTGATCTGGAATTTCAAGATTAAGTAGTTCAAAGCTATGTGACTAAAACATTTTTTAATGTGTATCTAGCCTG
TCAAAAATTAGGGAGAGAGTAGGTGTGGAGGGTGTATATGTGAAAATCACACAACCCAAAAGTACAAGCCAAAAGAAGAGTAATAACAAACCAACCAACCA
ACCATCACCACCAACAAAAACAAAGTTAATTGGTCAAACCCAGAGATACCTGTTTTGCACAGTTCCTCATCCTTGGGAG 405 pb

(B)

GCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCGAGGAATGGTTCGTGGTCTTCCACGTTTTTTGGCCGTTTTCTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGTATCTTCTG
CTCCTACTGCGCCTTCCTTCACTTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTTCAAGATAAGTAGTTCAAAGCTATGCGATTGACAAACACAGGTCAAGTTTTGCCTAACCTGTC
AAAAATACGTGTTTCAGAAAACGGAAAAACCCCTAAAAAACAAACCCCAACAACATCCCAACAACTAAACCAACAGCAACACAAAAGCACAAAGTCAATCA
GAACCAAGACACWCCTGTTTTGCACAGTTTCTCATCCTTGGGAGA 368 pb

(C)

TCTGCATCGCTAAATCCTTTGATATTTTCGAGGAATAGTTCGTGGTCTTCCACGTTTTTTGGCCGTTTTCTTCTGAGATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGTATCTT
CTGCTCCTACTGCGCCTCCCTTCACTTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTTCAAGATATGCAGTTCAAAGCCAGATGATTAACAAACATAAAATAAATTTTGCCTACTCT
GAAAAAATATGTGTTTCAGAAAAGTGGGAAAAAACCCCAACCCGACACAACAACCAACCAACCAATCAACAGCAAAATAAAAGAACAAGTCAGTAAGAAC
TGTAACAGTAAAAAAGAAACAGTAAGAAGTAAAAAACACACCTGTTTTGCACAGTTCCTCATCCTTGGGAG 403 pb

Figura 12: Sequências nucleotídicas consenso relativas a uma região parcial dos genes *CHD-Z* de *Bolborhynchus lineola* (A), *Columba livia* (B) e *Falco femoralis* (C).

```

B    ---GCATCGCTAAATCCTTTAATATTTTCTCGAGGAATGGTTCGTGGTCTTCCACGTTTT
C    TCT.....G.....A.....
A    TCT.....G.....A.....G.....

B    TTGGCCGTTTCTTTCTGATATGGAGTCACTATCAGATCCAGAGTATCTTCTGCTCCTA
C    .....G.....
A    C...T.....G.....A.....

B    CTGCGCCTTCCTTCACTTCCATTAAAGCTGATCTGGAATTTTCAGAATAAGTAGTTCAAAG
C    .....C.....AG...T.C.....
A    ...T.T..C.T.....C.....T.....

B    CTATGCGATTGACAAACACAGGTCAAGTTTTCCTAACCTGTCAAAAATACGTGTTTCAGA
C    ...GAT...A.....T.AA.A..T.....CT...AA.....T.....
A    .....T..C.A.A.C.TTTTTT.A.T..G..AT...G.....TA.G.AGAGAG

B    AAACGGAAAAACCCCTAAAAAACAAAACCCCAACAACAATCCCCAACAACTAAACCAAC
C    ...GT.GG...-----...CC.C.....G.....CAA...C.....-...T....
A    T.GGT.TGG.GGGTG.C.T.TGTG....T.AC....CCAAAAGT....G.C...AG..G

B    AGCAACACAAAAG--CACAAGTCAATCAGAACC-----
C    .....T.....A.....G.A.....TGTAACAGTAAAAAAAAAAAAAGAAACA
A    ..T..T.AC...CCAA..C.AC...C..TC...ACCAACAAAAACAAAG-----TTAA

B    -----AAGACACACCTGTTTTGCACAGTTTCTCATCCTTGGGAGA    368 pb
C    GTAAGAAGTAAA..A.C.....C.....-    403 pb
A    TTGGTCAAACCCC...G.T.....C.....-    405 pb

```

Figura 13: Alinhamento das sequências nucleotídicas consenso relativas a uma região parcial dos genes *CHD-Z* isolados de *Bolborhynchus lineola* (A), *Columba livia* (B) e *Falco femoralis* (C). Hífens indicam gaps e pontos indicam similaridade de bases.

As sequências nucleotídicas obtidas também foram utilizadas em análises comparativas com sequências depositadas em bancos de dados. Análises BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no National Center for Biotechnology Information (NCBI) confirmaram um alto nível de identidade com sequências de DNA destas mesmas espécies ou de outras espécies de aves filogeneticamente relacionadas (Tabela 11).

O fragmento de DNA associado ao gene *CHD-Z* isolado de *Bolborhynchus lineola*, uma espécie de psitacídeo, mostrou-se composto por 405 pares de bases. Maiores níveis de identidade nucleotídica foram observados para genes *CHD* de diversas outras espécies de Psittacidae, como *Myiopsitta monachus* (caturrita), *Platycercus eximius* (rosela), *Poicephalus meyeri* (papagaio meyer), *Pionites melanocephalus* (marianinha da cabeça preta), *Aratinga auricapilla* (jubacanga) e *Deroptyus accipitrinus* (papagaio anacã) (Tabela 11).

Em relação à região do gene *CHD-Z* caracterizada para *Columba livia* (Columbidae), composta por 368 pares de bases, foi verificada uma maior similaridade com sequências nucleotídicas destes gene já descritas para a própria espécie, para uma outra espécie do mesmo gênero - *Columba pulchricollis* (pomba cinzenta) - e para uma espécie desta mesma família - *Streptopelia tranquebarica* (rola dos olhos vermelhos) (Tabela 11).

Quando comparado às sequências nucleotídicas do NCBI, o gene isolado do Falconidae *Falco femoralis*, composto por 403 pares de bases, mostrou maior identidade nucleotídica com outras espécies pertencentes ao mesmo gênero, como *Falco peregrinus* (falcão peregrino), *Falco tinnunculus* (falcão comum) e *Falco rusticolus* (falcão gerifalte) (Tabela 11). Foi também observada uma alta similaridade com uma sequência nucleotídica de *Cathartes aura* (urubu de cabeça vermelha), espécie pertencente à ordem Accipitriformes e família Cathartidae (Tabela 11), grupo filogeneticamente próximo dos falconídeos.

Tabela 11: Níveis de similaridade entre as sequências de DNA associadas ao gene *CHD-Z* caracterizadas para as espécies *Bolborhynchus lineola*, *Columba livia* e *Falco femoralis* e sequências nucleotídicas depositadas no banco de dados NCBI - *National Center for Biotechnology Information*.

Espécie em estudo	COMPARAÇÕES COM DADOS DO NCBI						
	Nome Popular	Nome Científico	Ordem	Família	Número de Acesso no Gene Bank	Índice de similaridade (%)	Tamanho do fragmento de DNA (pb)
<i>Bolborhynchus lineola</i>	Caturrita	<i>Myiopsitta monachus</i>	Psittaciformes	Psittacidae	JX460802.1	96	361
	Rosela	<i>Platycercus eximius</i>			AF288513.1	95	364
	Papagaio meyer	<i>Poicephalus meyeri</i>			JX460798.1	96	350
	Marianinha da cabeça preta	<i>Pionites melanocephalus</i>			JX460796.1	95	358
	Jubacanga	<i>Aratinga auricapilla</i>			FJ913851.1	95	359
	Papagaio anacã	<i>Derophtus accipitrinus</i>			FJ913844.1	94	355
<i>Columba livia</i>	Pomba comum	<i>Columba livia</i>	Columbiformes	Columbidae	GU289184.1	99	370
	Pomba cinzenta	<i>Columba pulchricollis</i>			GU289186.1	98	370
	Rola dos olhos vermelhos	<i>Streptopelia tranquebarica</i>			GU289188.1	98	370
	Falcão peregrino	<i>Falco peregrinus</i>	Falconiformes	Falconidae	AB096154.1	99	363
	Falcão comum	<i>Falco tinnunculus</i>			AB096156.1	99	366

<i>Falco femoralis</i>	Falcão gerifalte	<i>Falco rusticolus</i>			JF926683.1	93	370
	urubu de cabeça vermelha	<i>Cathartes aura</i>	Accipitriformes	Cathartidae	JX460792.1	97	370

pb, pares de bases.

Os genes *CHD* pertencem a uma família gênica composta por um domínio organizador-modificador de cromatina (*chromo*), um domínio helicase / ATPase SNF2-relacionado e um domínio de ligação (*binding*) ao DNA. Tais domínios levaram à denominação do gene (*chromo helicase DNA-binding*). Estudos funcionais em organismos modelos indicam que este gene altera a estrutura da cromatina, facilitando assim a expressão de outros genes. Análises das sequências nucleotídicas dos genes *CHD* de diferentes espécies de aves evidenciaram que estes são altamente conservados. Alterações nas sequências de nucleotídeos encontradas nos genes *CHD* são geralmente associadas a trocas na terceira base dos códons dos éxons, ou seja, mutações sinônimas, que não alteram a sequência de aminoácidos na proteína CHD (FRIDOLFSSON & ELLEGREN, 2000). Dada a função desse gene, este alto nível de conservação é esperado em seus segmentos codificantes já que estes sofrem grande pressão de seleção para manutenção de sua estrutura.

Por outro lado, embora íntrons também possam conter áreas sob pressão de seleção, como elementos regulatórios da transcrição (ROSSI & CROMBRUGGHE, 1987), estes são geralmente seletivamente neutros. Como as regiões não codificantes encontram-se sob menores pressões seletivas, estas podem sofrer uma taxa de mutação mais rápida, resultando em variações que são fixadas (LYNCH, 2002). Como no presente trabalho os *primers* utilizados em PCR amplificaram uma região de íntron do gene *CHD*, as mutações de bases e os diferentes tamanhos encontrados nos segmentos de DNA de *Bolborhynchus lineola*, *Columba livia* e *Falco femoralis* caracterizados refletem tais características destes segmentos gênicos não codificantes. Apesar das variações observadas, foi possível identificar uma maior similaridade na sequência nucleotídica intrônica de algumas espécies, resultado congruente com suas relações filogenéticas.

5.2 CAPÍTULO 2

5.2.1 Divulgação científica

5.2.1.1 Levantamento de dados

Antes de se iniciar a elaboração de um projeto, é necessário se obter informações a respeito dos tópicos que este irá englobar, de forma que os dados coletados servirão de base para um desenvolvimento mais adequado da proposta. A aplicação de questionários configura-se como uma das formas de realizar este tipo de levantamento destinado a identificar realidades estruturadas e conceitos junto a um ou mais grupos populacionais. Os dados destes questionários podem ser obtidos na forma de perguntas, feitas diretamente aos entrevistados, ou por meio de preenchimento pessoal (PINA, 2007).

Desta maneira, no presente trabalho, foi inicialmente feito um levantamento de dados acerca dos princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à conservação biológica. Este levantamento, realizado em diferentes grupos amostrais por meio da aplicação de um questionário específico (Anexo I), de preenchimento pessoal, visou a coleta de dados sobre o nível de informação/compreensão da população universitária sobre o tema abordado. A utilização dos grupos amostrais teve como objetivo identificar conceitos prévios e caracterizar a qualidade e a quantidade de informações de alunos de mestrado (Grupo Amostral 1), alunos de doutorado (Grupo Amostral 2), docentes (Grupo Amostral 3) e técnicos administrativos (Grupo Amostral 4) da UNESP (Campus de Botucatu, SP) e que, portanto, possuem distintos níveis de formação.

O questionário foi encaminhado, via e-mail, a 500 pessoas e foram recebidos 296 questionários preenchidos, o que totaliza 59,2% do total encaminhado. As respostas colhidas foram analisadas qualitativamente e/ou quantitativamente, de forma comparativa dentro de cada grupo e entre os diferentes grupos amostrais. Com base nos dados obtidos, foram gerados gráficos que melhor evidenciam os resultados. Valores específicos relacionados aos dados dos gráficos apresentados encontram-se indicados nas tabelas constantes do Anexo IV.

As análises descritivas das variáveis qualitativas (sexo e profissão/formação) levantadas no presente estudo foram feitas por meio do teste de Qui-Quadrado. Em relação à variável sexo, 134 pessoas do sexo masculino e 162 pessoas do sexo feminino responderam ao questionário (Figura 14). Em relação à variável profissão/formação, foram obtidas respostas ao questionário de 89 pessoas do Grupo Amostral 1, 96 pessoas do Grupo Amostral 2, 90 pessoas do Grupo Amostral 3 e 21 pessoas do Grupo Amostral 4 (Figura 15).

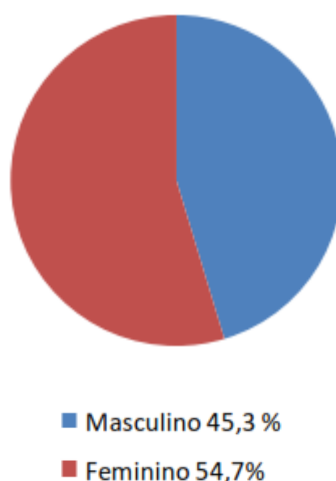


Figura 14: Gráfico que evidencia as porcentagens de questionários respondidos em relação à variável qualitativa associada ao sexo.

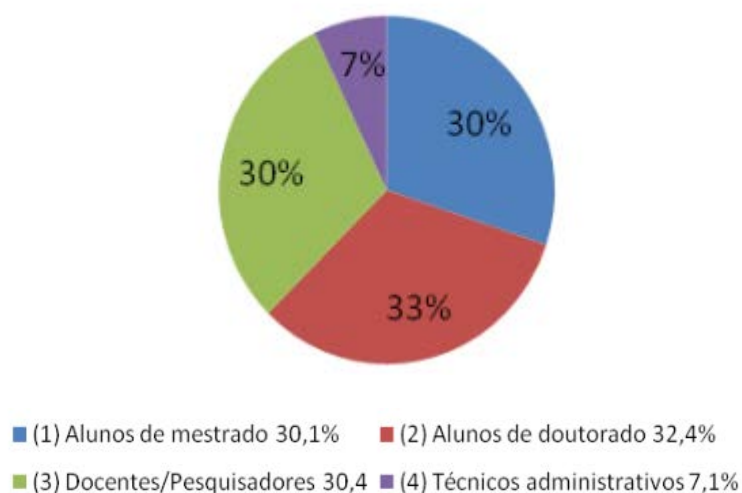


Figura 15: Gráfico que evidencia as porcentagens de questionários respondidos em relação à variável qualitativa associada à profissão/formação.

Embora tenham sido recebidos questionários de pessoas vinculadas todos os programas de pós-graduação amostrados, 22,6% das respostas não continha tal informação (Figura 16). Mesmo que consideremos que o grupo composto por técnicos administrativos realmente não tenha tal vínculo e que alguns docentes podem não ministrar disciplinas ou supervisionar projetos de mestrado e/ou doutorado, um número considerável de pessoas ligadas à pós-graduação não

descreveu tal vínculo. A maior porcentagem (20,3%) dos formulários retornados foram respondidos por pessoas vinculadas ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), provavelmente por terem maior contato com a área a que este se refere, o que permite maior segurança para elaboração das respostas. O Programa de Pós-Graduação em Biometria teve o menor índice de participantes (3,4%), talvez por este ser de área mais distinta e, ao contrário dos demais programas de pós-graduação, mais relacionado à área de ciências exatas e não de biológicas.

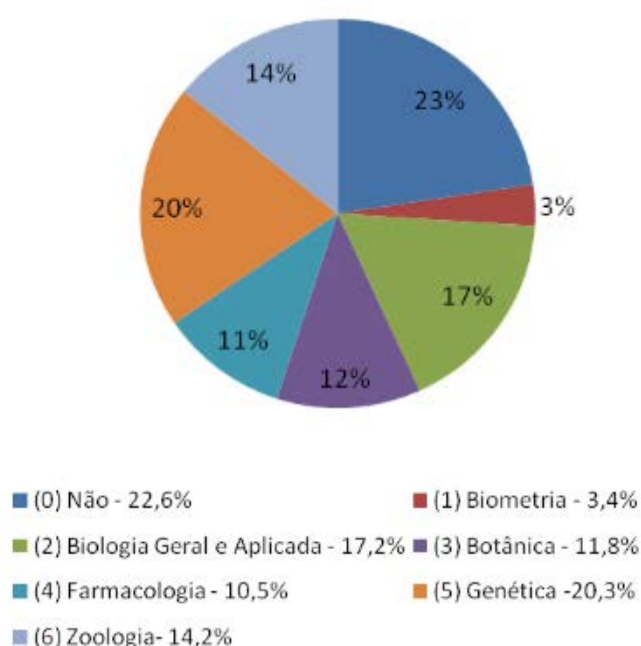


Figura 16: Gráfico que evidencia as porcentagens de questionários respondidos em relação a vínculo com programa de pós-graduação do Instituto de Biociências da UNESP. A porcentagem de questionários que não dispunham da informação de vínculo está discriminada como "não".

Similarmente ao dado de discriminação de vínculo com programa de pós-graduação, muitas pessoas não informaram a qual departamento estão vinculadas. A Figura 17 discrimina o número e a porcentagem de questionários respondidos em relação ao vínculo dos grupos amostrais aos 13 departamentos do Instituto de Biociências da UNESP. Embora não havia sido planejado analisar dados de vínculo de departamentos não associados ao Instituto de Biociências,

o presente trabalho incluiu dados de vínculo à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP, já que esta informação constou em um dos questionários preenchidos. Este fato provavelmente está associado à realização de projeto de pesquisa em conjunto entre o Instituto de Biociências e a FMVZ. Os departamentos que se destacaram em termos de maior número de pessoas que responderam ao questionário foram Zoologia (14,2%), seguidos de Morfologia e Botânica (aproximadamente 12%), e Genética e Farmacologia (aproximadamente 10%).

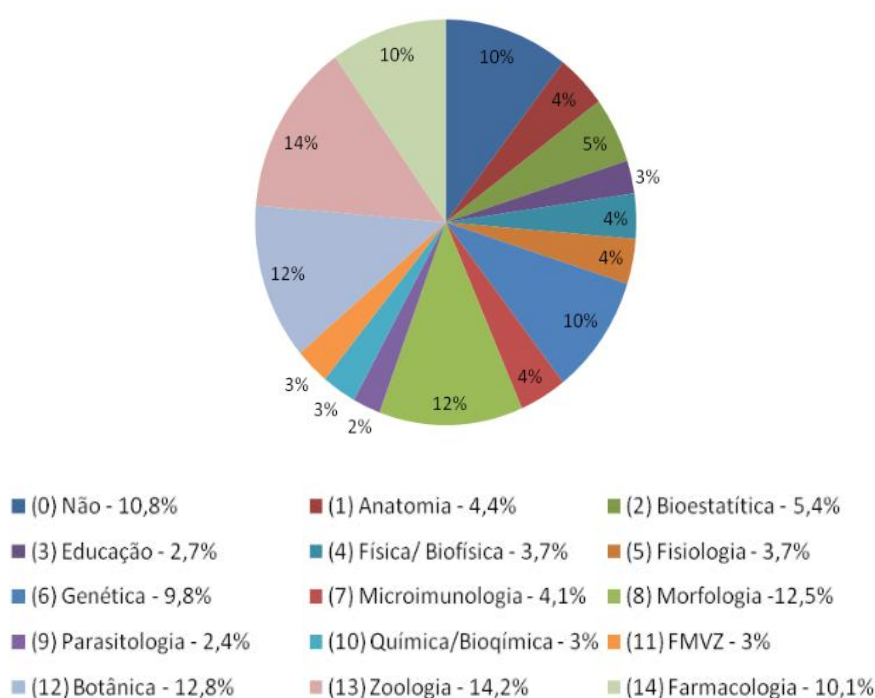


Figura 17: Gráfico que evidencia as porcentagens de questionários respondidos em relação a vínculo com departamentos do Instituto de Biociências ou à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP. A porcentagem de questionários que não dispunham da informação de vínculo está discriminada como "não".

Outras variáveis analisadas referem-se à discriminação de alunos de mestrado, doutorado, docentes e técnicos administrativos em relação ao nível de informação/compreensão sobre o tema genética forense associada à conservação biológica, dado evidenciado pela análise estatística das respostas às cinco questões contidas no questionário elaborado. Os resultados destes diferentes segmentos profissionais/ocupacionais foram também discriminados em relação

ao vínculo aos programas de pós-graduação e aos departamentos do Instituto de Biociências da UNESP.

A pergunta no. 1 ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?") foi elaborada porque, mesmo tendo um foco específico, aborda tópicos mais amplos (crimes e questões jurídicas, tráfico de animais, identificação de espécies animais e plantas, testes de paternidade, identificação do sexo dos animais) discriminados nas alternativas da própria questão. Nesta questão, todas as alternativas são corretas. Dado que 131 pessoas assinalaram todos os itens, o que corresponde a 44,25% do total que respondeu ao questionário, entende-se que a maioria não possui um conhecimento acerca das diversas possibilidades de atuação de profissionais da área de genética forense (Figura 18).

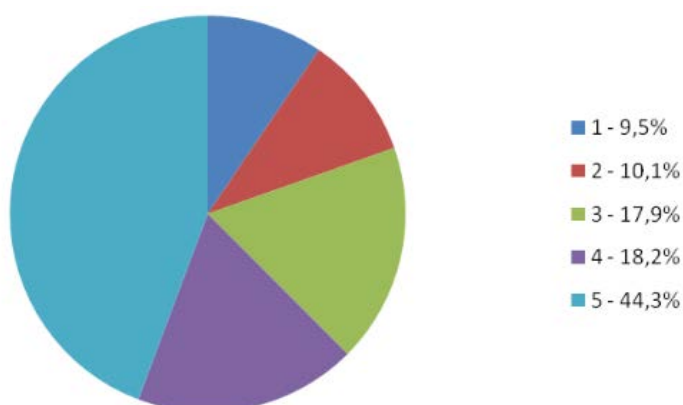


Figura 18: Gráfico que evidencia as porcentagens do número de alternativas assinaladas para a questão número 1 do questionário ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?").

Uma análise adicional foi também realizada para a questão no. 1, especificamente em relação à alternativa "tráfico de animais", já que este tópico é diretamente associado à parte experimental do presente trabalho. Evidenciou-se que 60,8% (180 pessoas) assinalaram a alternativa referente a este item, o que demonstra que a maioria possui conhecimento da inter-relação entre genética forense e tráfico ilegal de animais. Análises estatísticas com o teste de ANOVA referentes a comparações entre as profissões/ocupações e entre os programas de pós-

graduação indicaram diferenças significativas entre os grupos amostrais analisados. Alunos de doutorado mostraram maior conhecimento em relação ao item "tráfico de animais" da questão no. 1, já que 75% destes assinalaram esta alternativa como correta. O segmento técnico administrativo mostrou menor conhecimento deste tema (47,6%) (Figura 19). Em relação aos programas de pós-graduação, pessoas vinculadas ao programa de Genética apresentaram os maiores índices de acerto para a associação entre o item "tráfico de animais" e a atuação do profissional da área de genética forense (81,7% de acerto) (Figura 20). O índice de acerto para esta correlação foi extremamente reduzido em relação aos questionários vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Biometria (20%) (Figura 20). Os dados levantados provavelmente são associados às áreas de conhecimento dos dois programas de pós-graduação em questão.

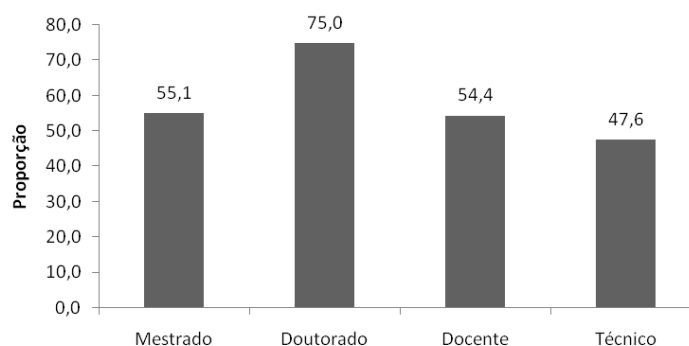


Figura 19: Gráfico de contingência entre profissão/formação e a alternativa "tráfico de animais" da questão número 1 do questionário ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?").

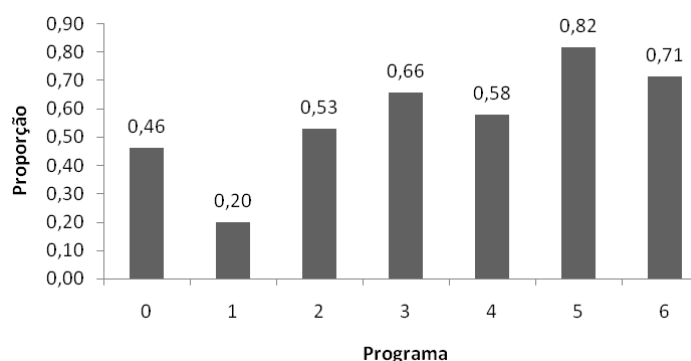


Figura 20: Gráfico de contingência entre programa de pós-graduação e a alternativa "tráfico de animais" da questão número 1 do questionário ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?"). Vínculo não informado (0), PPG Biometria (1), PPG Biologia Geral e Aplicada (2), PPG Botânica (3), PPG Farmacologia (4), PPG Genética (5) e PPG Zoologia (6).

A questão número 2 ("Em qual(is) organismo(s) é possível trabalhar com genética forense?") foi elaborada de forma a demonstrar a possibilidade de realização de análises genéticas forenses em diferentes organismos e que, portanto, a área forense não é restrita a seres humanos. Nesta questão, não houve diferença significativa, entre os diferentes grupos amostrados, em relação ao número de alternativas assinaladas como resposta - a maioria das pessoas (83,1%) que responderem ao questionário marcaram os três itens (humanos, animais e plantas) (Figura 21), sendo esta a resposta mais completa e, portanto, considerada correta. Portanto, todos os grupos amostrais analisados possuem informações sobre a possibilidade de se trabalhar com organismos de diferentes grupos na área de genética forense.

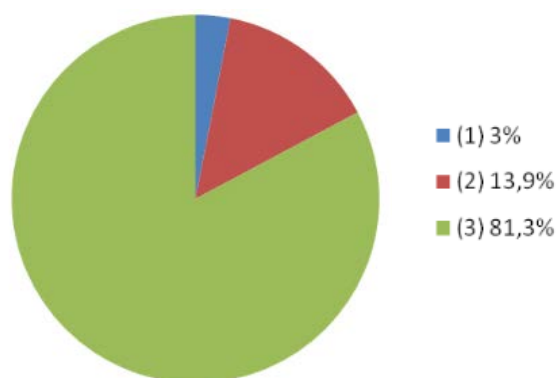


Figura 21: Gráfico que evidencia as porcentagens do número de alternativas assinaladas para a questão número 2 do questionário ("Em qual(is) organismo(s) é possível trabalhar com genética forense?").

A questão número 3 ("Qual(is) área(s) envolve(m) estudos forenses?") relaciona-se à extensão do campo forense, muito mais amplo do que somente análises jurídicas e biológicas. Aproximadamente 40% das pessoas que responderam o questionário mostraram conhecimento da amplitude das áreas associadas a estudos forenses, já que assinalaram todas as cinco alternativas como corretas (áreas de Química, Biologia, Matemática/Estatística, Psicologia/Psiquiatria e Computação) (Figura 22). Assim, detecta-se que a maioria das pessoas não possui um conhecimento da vasta interdisciplinaridade da área forense.

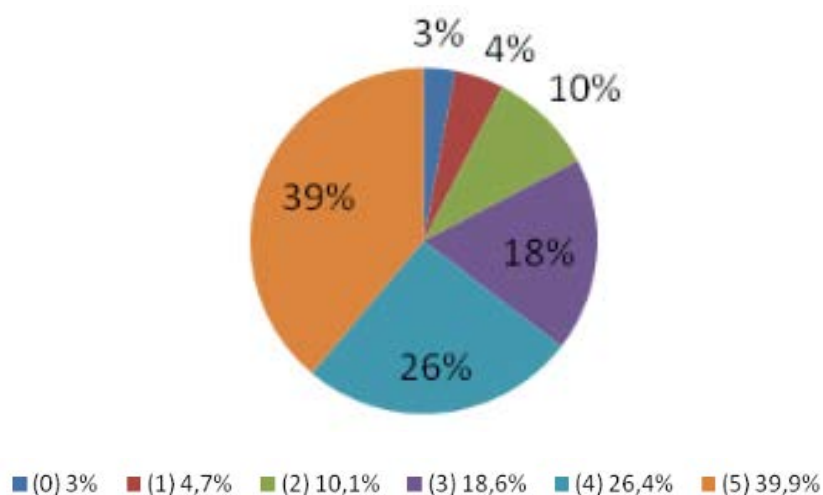


Figura 22: Gráfico que evidencia as porcentagens do número de alternativas assinaladas para a questão número 3 do questionário ("Qual(is) área(s) envolve(m) estudos forenses?").

Diretamente associada à parte experimental do presente trabalho, a questão número 4 ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?") demonstrou que 37,5% das pessoas que responderam o questionário possuem informações completas dos diferentes tipos de amostras (impressão digital, sangue, saliva, sêmen, penas, pelos e fezes) que podem ser usadas como fontes primárias para obtenção de informações genéticas que subsidiem análises forenses (Figura 23).

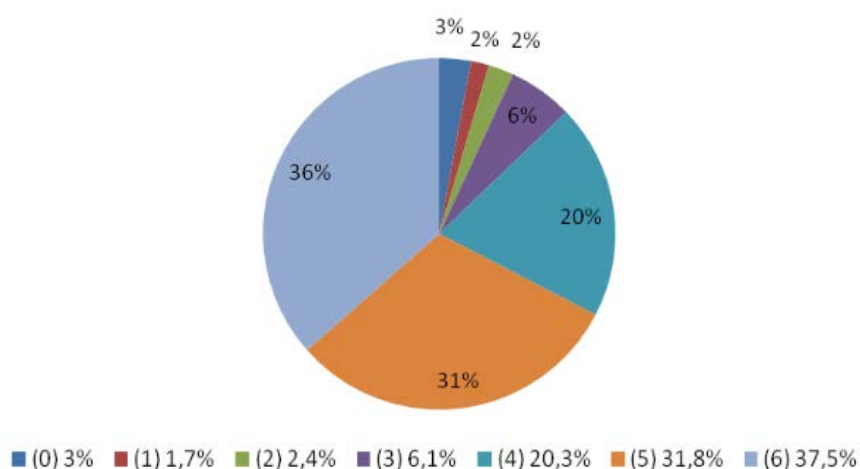


Figura 23: Gráfico que evidencia as porcentagens do número de alternativas assinaladas para a questão número 4 do questionário ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?").

Duas alternativas da questão número 4 (sangue e penas) foram consideradas mais importantes para o presente trabalho já que estão diretamente associadas às amostras biológicas utilizadas como fontes para obtenção de DNA para posterior análise de sexagem molecular em diferentes espécies de aves. Desta forma, estes dois itens foram também analisados separadamente. Os resultados indicaram que 88,5% das pessoas amostradas assinalaram a alternativa "penas". Comparações múltiplas entre os diferentes segmentos profissionais e entre os diferentes programas de pós-graduação foram realizados pelo teste de ANOVA e mostraram diferenças significativas entre os grupos amostrais. Em relação às profissões/formações, alunos de doutorado (94,8%) demonstraram melhor conhecimento de que penas podem ser utilizadas como amostras biológicas em análises genéticas forenses. O segmento técnico administrativo obteve 85,7% de acerto em relação a este item da questão número 4 (Figura 24). Em relação aos programas de pós-graduação, os indivíduos vinculados ao programa de Genética apresentaram os maiores índices de acerto (96,7%) para a possibilidade de uso de penas em análises genéticas forenses. O índice de acerto das pessoas vinculadas ao Programa de Pós-Graduação em Biometria para esta alternativa da questão 4 foi o mais reduzido (80%) (Figura 25). Os dados levantados provavelmente são associados às próprias áreas de conhecimento dos dois programas de pós-graduação em questão.

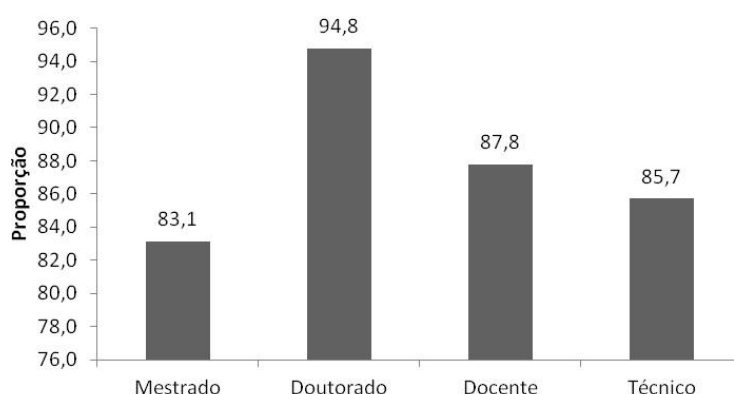


Figura 24: Gráfico de contingência entre profissão/formação e a alternativa "penas" da questão número 4 do questionário ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?").

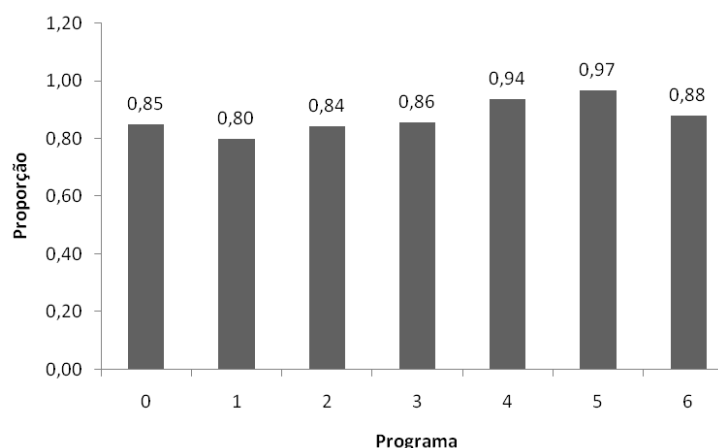


Figura 25: Gráfico de contingência entre programa de pós-graduação e a alternativa "penas" da questão número 4 do questionário ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?"). Vínculo não informado (0), PPG Biometria (1), PPG Biologia Geral e Aplicada (2), PPG Botânica (3), PPG Farmacologia (4), PPG Genética (5) e PPG Zoologia (6).

Assim como a questão número 4, a pergunta número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?") também é diretamente associada à parte experimental do presente trabalho. Todas as alternativas desta questão (Combatendo o tráfico de animais silvestres, Conservando a biodiversidade, Reduzindo os riscos de extinção em espécies, Fornecendo ferramentas que auxiliem na identificação de espécies e Auxiliando na identificação de produtos comercializados ilegalmente), consideradas corretas, foram assinaladas em 28,4% dos questionários (Figura 26). Este baixo índice de acerto indica que a população amostrada não possui informação correta das diversas aplicações da genética da conservação.

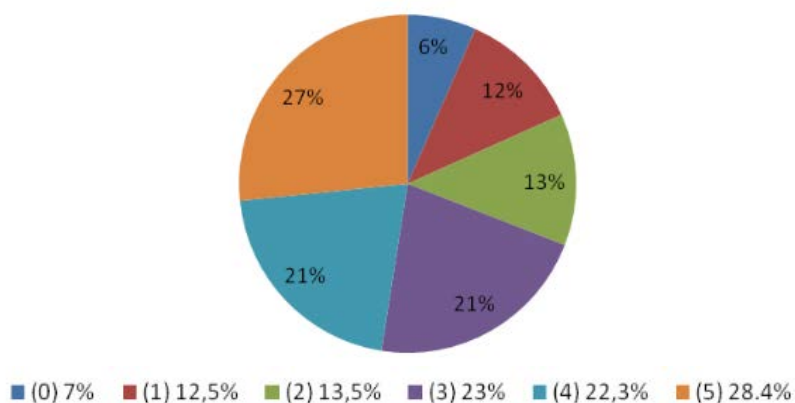


Figura 26: Gráfico que evidencia as porcentagens do número de alternativas assinaladas para a questão número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?").

De forma a correlacionar as respostas da questão 5 ao objetivo do presente trabalho de elaborar um material de divulgação científica sobre crimes ambientais e tráfico/comércio ilegal de aves, os dados da alternativa "combatendo o tráfico de animais" dessa questão foram também analisados separadamente. Somente 129 pessoas (43,6%) que responderam ao questionário marcaram essa alternativa como verdadeira, o que indica deficiência de informações sobre este tipo de crime. Adicionalmente, comparações entre as profissões/formações e entre os programas de pós-graduação também foram realizadas por meio do teste de ANOVA, indicando diferenças significativas entre os segmentos amostrados. Alunos de doutorado (52,1%) assinalaram com maior frequência a alternativa em questão. O menor índice de acerto deste item foi observado para o segmento técnico administrativo (23,8%) (Figura 27). O mesmo tipo de análise comparativa, realizada entre os programas de pós-graduação, evidenciou um maior nível de conhecimento sobre a relação entre a área forense e o combate de tráfico de animais entre as pessoas vinculadas ao Programa de Pós-Graduação de Genética (51,7%). O menor índice de acerto em relação à alternativa "combatendo o tráfico de animais" da questão 5 foi verificado para o grupo amostrado do Programa de Pós-Graduação em Biometria (30%) (Figura 28). Os dados levantados possivelmente são associados às próprias áreas de conhecimento dos dois programas de pós-graduação em questão.

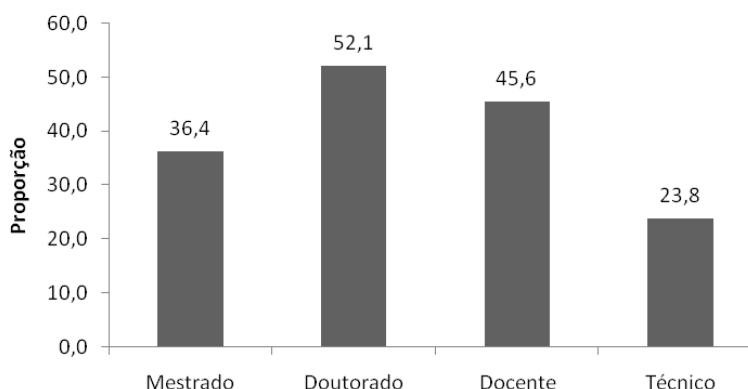


Figura 27: Gráfico de contingência entre profissão/formação e a alternativa "combatendo o tráfico de animais" da questão número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?").

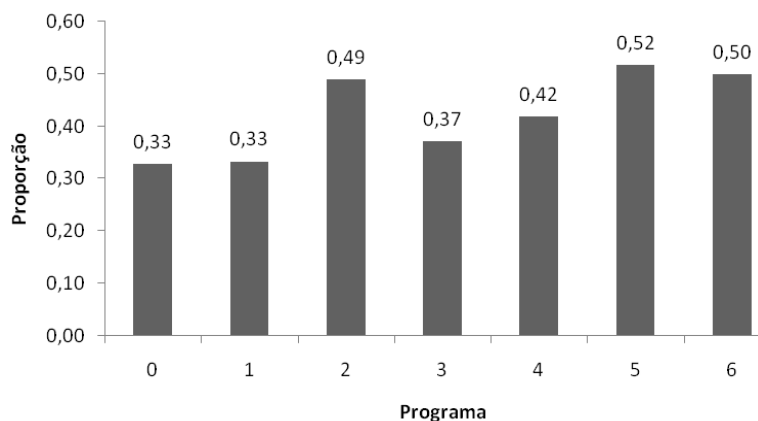


Figura 28: Gráfico de contingência entre programa de pós-graduação e a alternativa "combatendo o tráfico de animais" da questão número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?"). Vínculo não informado (0), PPG Biometria (1), PPG Biologia Geral e Aplicada (2), PPG Botânica (3), PPG Farmacologia (4), PPG Genética (5) e PPG Zoologia (6).

As análises estatísticas dos questionários preenchidos mostraram, de forma geral, que alunos de doutorado e pessoas vinculadas ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) possuem melhor conhecimento sobre os princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à conservação biológica. Dentro desse contexto, estes mesmos segmentos amostrados também demonstraram maior informação sobre tráfico de animais. O segmento técnico administrativo amostrado demonstrou menor conhecimento sobre os tópicos abordados no questionário. Tais resultados refletem não somente o nível de educacional dos participantes da pesquisa como também sua área de formação. Apesar disso, os dados levantados acerca de todos os segmentos de profissão/formação e todos os vínculos a diferentes programas de pós-graduação amostrados evidenciam que existem falhas acerca da compreensão dos princípios e aplicações das áreas forense e de conservação genética e também sobre o tráfico ilegal de animais. Desta forma, entende-se que estes dados, embora tenham sido obtidos junto a uma amostra populacional específica, podem ser extrapolados para outros grupos populacionais.

5.2.1.2 *Folder* informativo

O resultado obtido a partir dos questionários serviu para demonstrar a importância de produzir um material de divulgação científica sobre os princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à conservação biológica, com ênfase no tráfico de animais silvestres. De forma a elaborar um material de fácil compreensão, contendo um texto com linguagem direcionada até mesmo ao público leigo, e que atraia a atenção, contendo ilustrações e pequenos textos em destaque, foi elaborado um *folder* informativo (Anexo III). Visando abranger uma comunidade mais ampla do que a amostrada no presente trabalho, este *folder* deverá ser distribuído não somente para alunos, docentes e técnicos administrativos do Instituto de Biociências da UNESP como também para outros segmentos populacionais. Como o Departamento de Genética desse instituto já vem, desde 2007, realizando atividades de divulgação científica para professores e estudantes da rede pública e particular de ensino básico, optou-se por ampliar estas atividades por meio da entrega do *folder* elaborado às cerca de 30 escolas da rede estadual de ensino público da regional de Botucatu. Este material visa, além da aprendizagem, um alerta contra o tráfico ilegal de animais silvestres, especialmente as aves, pois entende-se que, por meio da educação, é possível compreender e transformar o mundo. Adicionalmente, ao se fazer divulgação científica no ensino básico, é possível constituir, conseqüentemente, uma população adulta com maior nível de informação.

De forma ainda mais ampla, o material de divulgação científica elaborado pode tanto servir como instrumento de maior consciência social sobre a atividade científica, seu papel e importância atuais para a sociedade, como pode ser um instrumento para a desmistificação da opinião pública sobre a ciência e o que vem sendo realizado junto a universidades e centros de pesquisa (ALBAGLI, 1996). Assim, a divulgação das pesquisas científicas para o público leigo, quando possível, deveria ser vista como parte das responsabilidades dos pesquisadores, de modo semelhante à publicação de suas pesquisas em revistas especializadas.

A distribuição do *folder* elaborado poderá contribuir para uma educação científica de melhor qualidade em nosso país, formação de profissionais mais qualificados, e melhor consolidação da universidade como instituição de ensino, pesquisa e extensão. Além disso, a

proposta de divulgação científica desenvolvida, articulada entre universidade e sociedade, serve como auxílio à implementação de políticas nacionais para a área de educação básica, incluindo a missão institucional da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES de aplicar a experiência adquirida na graduação e pós-graduação para melhorar a qualidade do ensino básico do país.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados apresentados no presente trabalho, pôde-se concluir que:

1. Pequenas alíquotas de sangue e tanto penas em crescimento como penas adultas representam materiais biológicos adequados à obtenção, de forma não-destrutiva, de amostras de DNA de diferentes espécies de aves para uso em PCR.
2. Os *primers* P2 e P8 são eficazes para amplificação de segmentos de DNA associados aos genes *CDH-Z* e *CDH-W* de um grande número de espécies de aves pertencentes a diferentes ordens e famílias.
3. A metodologia de sexagem molecular realizada permitiu gerar perfis genéticos sexo-específicos e, portanto, identificar com segurança machos e fêmeas de diversas espécies de aves.
4. Variações de tamanho e na sequência nucleotídica dos genes *CHD-Z*, associadas a uma região de íntron, ocorrem entre diferentes espécies de aves; os níveis identidade genética desta região podem ser correlacionados a relações filogenéticas entre as espécies.
5. O Laboratório de Genética Animal do Instituto de Biociências da UNESP possui atualmente condições técnicas para iniciar prestações de serviços associadas à emissão de laudos de sexagem molecular de aves.
6. Os princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à temática de conservação biológica não são claros à população.

Dada a importância da correta identificação de machos e fêmeas em espécies de aves, especialmente aquelas que não apresentam dimorfismo sexual aparente, os resultados obtidos podem ser considerados de grande potencial para subsidiar programas conservacionistas de recuperação, manutenção e reprodução de aves em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução destes animais. Adicionalmente, o material de divulgação gerado, na forma de um *folder*, poderá contribuir para compreensão geral da população acerca de princípios, aplicações e metodologias da área de genética forense associada à conservação biológica, com ênfase no tráfico de animais silvestres. Tais medidas poderão resultar no combate e/ou na diminuição dos efeitos do tráfico e comércio ilegais de aves.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAGLI, S. Divulgação Científica: informação científica para a cidadania? *Ciência e Informação* 25: 396-404, 1996.
- ALLGAYER, M.C, CZIULIK, M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31: 344-350, 2007.
- ANCIÄES, M., NASSIF, D.L.S. Sex identification in pin-tailed manakins (*Illicura militaris*: Pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies. *Ornitologia Neotropical* 13: 159-165, 2002.
- ARAUJO, A.C.B., BEHR, E.R., LONGUI, S.J., MENEZES, P.T.S., KANIESKI, M.R. Diagnóstico sobre a avifauna apreendida e entregue espontaneamente na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Biosciences* 8: 279-284, 2010.
- AVISE, J., HAMRICK, J. Introduction: the scope of conservation genetics. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York, USA, 1996.
- BENCKE, G.A. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Series Zoology* 100: 4, 2010.
- BRANCO, M.A. *Políticas públicas e serviços públicos de gestão e manejo da fauna silvestre nativa resgatada. Estudo de caso*. Prefeitura da Cidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2008.
- CABOT, J. Order Tinamiformes. In: *Handbook of the birds of the world*. v.1, p.112-138. (J. delHoyo, A. Elliot, and J. Sargatal, eds.). Lynx Edicions, Barcelona, 1992.
- CANDOTTI, E. *Ciência na educação popular. O papel do cientista na educação científica*, 1999.

- CARVALHO, G., HAUSER, L. Advances in molecular analysis of fish population structure. *Italian Journal of Zoology* 65: 21-33, 1998.
- CAVALCANTI, M.L.F. Avifauna no Campus I da UEPB em Campina Grande - PB. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 5: 10, 2004.
- CAVALCANTI, R.B. Bird species richness and conservation in the cerrado region of central Brazil. *Studies in Avian Biology* 19: 244-249, 1999.
- CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). Disponível em <<http://www.ib.usp.br/cbro>> (acessado em março de 2013).
- CHANG, H.W., CHOU, T.C., GU, D.L. An improved PCR method for gender identification of eagles. *Molecular and Cellular Probes* 22: 184-188, 2008.
- CLUBB, S.L. The pet bird industry - past, present and future. In: *International Conference on Zoological and Avian Medicine*. Hawaii, p. 233-242, 1987.
- COLLAR, N.J. Family Psittacidae (Parrots). In: *Handbook of the birds of the world*, 1997.
- DEAN, W. *A ferro e fogo - a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira*. Companhia das Letras, São Paulo, SP, Brasil, 1995.
- DEL HOYO J., ELLIOT, A., SARGATAL, J. *Handbook of Birds of the World*. v1. Lynx Editions, Barcelona, 1992.
- DUAN, W., FUERST, P.A. Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes. *Journal of Heredity* 92: 392-397, 2001.
- ELLEGREN, H., SHELDON, B.C. New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 255-259, 1997.
- EZAZ, T., STIGLEC, R., VEYRUNES, F., MARSHALL, J.A. Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* 16: 736-743, 2006.
- FARIA, L.P., CARRARA, L.A., RODRIGUES, M. Sexual size dimorphism in henna-capped foliage-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 24: 12-26, 2007.
- FERREIRA, C.M., GLOCK, L. Diagnóstico preliminar sobre a avifauna traficada no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 12: 21-30, 2004.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Genética*. 3ª. ed. EMBRAPA-CENARGEM, Brasília, Brasil, 1998.
- FITZGERALD, S. *International Wildlife Trade: Whose business is it?* World Wildlife Foundation. Baltimore, USA, 1989.

- FRIDOLFSSON, A.K., ELLEGREN, H. Molecular evolution of the avian *CDH1* genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics* 155: 1903-1912, 2000.
- GIBBS, D.; BARNES, E.; COX, J. Pigeons and Doves: *A guide to the Pigeons and Doves of the World*. New Haven, Connecticut, Yale University Press, USA, 2001.
- GIOVANINI D. Diagnóstico del comercio ilegal de la fauna brasileña. In: *Actitudes hacia la fauna en Latinoamérica*. Human Society Press, Washington, USA, 1998.
- GOODWIN, W., LINACRE, A., HADI, S. *An introduction to forensic genetics*. England, 2007.
- GRANDO, A.P. *Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2002.
- GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C., GELBARTH, W.M. *Introdução à Genética*. 7ª. ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.
- GRIFFITHS, R. Sex identification in birds. *Seminars on Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 14-26, 2000.
- GRIFFITHS, R., DAAN, S., DUKSTRA, C. Sex identification in birds using two genes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 263: 1251-1256, 1996.
- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M.C., ORR, K., DAWSON, R.J.G. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075, 1998.
- GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature sensitive mutations. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 39: 439-446, 1974.
- HARRIS, M.B., TOMAS, W., MOURÃO, C.J., GUIMARÃES, E., SONODA, F., FACCHINI, E. Challenges to safeguard the Pantanal wetlands, Brazil: threats and conservation initiatives. *Conservation Biology* 19: 714-720, 2005.
- HERNANDEZ, T. F. E., CARVALHO, S. M. *O tráfico de animais silvestres no Estado do Paraná*, 2006.
- HORVÁTH, M.B., MARTÍNEZ-CRUZ, B., NEGRO, J.J., KALMÁR, L., GODOY, J.A. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* 36: 84-88, 2005.
- IBAMA - Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Quantitativo de espécimes recebidos nos Núcleos de Fauna e Cetas em 2002*. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/fauna/trafico/downloads/dados_2002>, 2002.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Lista das espécies da fauna ameaçada de extinção*. Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil, 2003.

- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. *Lista das espécies da fauna ameaçada de extinção*. Relatório de atividades das ASM - Áreas de Soltura e Monitoramento de Animais Silvestres, 2006.
- IMANSYAH, M.J., D.G., ANGGORO, N. YANGPATRA, A. Distribution and characteristics of nesting tree of the Yellow Crested Cockatoo (*Cacatua sulphurea*) on Komodo Island in the Komodo National Park. CRES Komodo Project. Report (Laporan) no. 4, 2005.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature. Diretrizes para a reintrodução. 41º Encontro, Suíça, 1995.
- IUCN - International Union for Conservation of Nature. *Red list of threatened species*. Disponível em <<http://www.redlist.org>> (acessado em fevereiro de 2013).
- JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S. L. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-79, 1985.
- JOBLING, M.A., GILL, P. *Encoded evidence: DNA in forensic analysis*, 2004.
- JUPIARA, A., ANDERSON, C. Rio é o centro internacional de traficantes de animais. *O Globo*, 21 de julho, Rio de Janeiro, 1991.
- KLEMMANN-JUNIOR, L.; SCHERER, P.; MONTEIRO, T.M.; RAMOS, F.M.; DE ALMEIDA, R. Mapeamento da distribuição e conservação do chauá (*Amazona rhodocorytha*) no estado do Espírito Santo, Brasil. *Ornitologia Neotropical* 19: 183-196, 2008.
- KRUSKAL, W.H., WALLIS, W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47: 583-621, 1952.
- LACAVA, U. *Tráfico de Animais Silvestres no Brasil: Um Diagnóstico Preliminar*. WWF, Brasília, Brasil, 2000.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401, 1989.
- LOPES, J.C. *O Tráfico de animais silvestres no Brasil*, 2006.
- LOPES, L.E. Biologia comparada de *Suiriri affinis* e *Suiriri islerorum* (Aves: Tyrannidae) no cerrado do Brasil central. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2004.
- LOPES, P.R.D. Comércio de animais silvestres. *Bioikos* 5: 49-56, 1991.
- LYNCH, M. Intron evolution as a population-genetic process. *PNAS* 99: 6118-6123, 2002.
- MARINI, M.A., GARCIA, F.I. Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade* 1: 95-102, 2005.
- MARINI, M.A., MARINHO, S.J. Translocação de aves e mamíferos: teoria e prática no Brasil. In: Rocha C.F.D., Bergallo H.G., Van Sluys M., Alves M.A.S. (eds.). *Biologia da conservação*.

Programa de ecologia, manejo e conservação de ecossistemas do sudeste do Brasil. Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2005.

MITTERMEIER, RA, PÁDUA, MTJ., BLANCK, J. Conservation in the Pantanal of Brazil. *Oryx* 24: 103-112, 1990.

MITTERMEIER, R.A. *Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations*. CEMEX, Agrupación Serra Madre, S.C., Mexico, 1997.

MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., BROOKS, J.D., PILGRIM, W.R., KONSTANT, G.A.B., FONSECA, A., KORMOS, C. Wilderness and biodiversity conservation. *Proceedings of the National Academy of Science* 100: 10309-10313, 2003.

MIYAKI C.Y., GRIFFITHS R., ORR K., NAHUM L.A., PEREIRA S.L., WAJNTAL A. (1998) Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive populations studies. *Zoo Biology* 17: 415-423, 1998.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos sulinos*. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF), Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil, 2000.

MODI, W.S., CREWS, D. Sex chromosomes and sex determination in reptiles. *Genomes and Evolution* 15: 660- 665, 2005.

MULLIS, K. FALOONA, S., SAIKI, G., ERLICH H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 51: 263-273, 1986.

NATURESERVE - *InfoNatura: birds, mammals, and amphibians of Latin American (Web application)*. Versão 3.2. Arlington, Virginia, USA. Disponível em <<http://www.natureserve.org.infonatura>>, 2004.

NORBERTO, G. *Tráfico de animais silvestres x educação*. Disponível em: <http://www.zoo.ba.gov.br/upload/pdf/artigo_gerson.pdf>, 2009

NUNES, P.B., BARRETO, A.S., FRANCO, E.Z. Subsídios à ação fiscalizatória no combate ao tráfico de aves silvestres e exótica em Santa Catarina. *Ornithologia* 5: 26-33, 2012.

OLMOS, F. The birds of Serra da Capivara National Park. *Bird Conservation International* 3: 2136, 1993.

PAPAVERO, N. *Essays on the history of neotropical dipterology*. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1971.

PAULI, J.N., WHITEMAN, J.P., RILEY, M.D., MIDDLETON, A.D. Defining noninvasive approaches for sampling of vertebrates. *Conservation Biology* 24: 349-352, 1999.

- PEREIRA, G.A. e BRITO, M.T. Diversidade de aves silvestres comercializadas nas feiras livres da região metropolitana de Recife, Pernambuco. *Atualidades Ornitológicas* 126: 14, 2005.
- PINHO, J.B., NOGUEIRA, F.M.B. Blue macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*) reproduction in the northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Ornitologia Neotropical* 14: 29-38, 2003.
- POUGH, F.H., JANIS, C.M.E, HEISER, J.B. *A Vida dos Vertebrados*. 3ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, SP, Brasil, 2003.
- POUGH, F.H., HARVEY, A. *A vida dos vertebrados*. 2ª. ed., Editora Atheneu, São Paulo, SP, Brasil, 1999.
- PRIMACK, R.B., RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Londrina, PR, Brasil, 2001.
- PROCTOR, N., LYNCH, P. *Manual of Ornithology*. Yale University Press, New Haven, N.J, USA, 1993.
- RAMOS, P.S., BASTOS, E., MANNAN, R. W. Polymerase chain reaction in single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*. *Molecular and Cellular Probes* 12: 1-4, 2009.
- RASO, T.F., WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia* 56: 187-192, 2004.
- REDFORD, K. H. The empty forest. *Bioscience* 42: 6, 1992.
- RENTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres - 1º. *Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre*. Brasília, Brasil, 2002.
- RIBEIRO, L.B, SILVA, M.G. O comércio ilegal põe em risco a diversidade das aves no Brasil. *Ciência e Cultura* 59: 4-5, 2007.
- ROJAS, A., Yucra, E., Vera, I., Requejo, A., Tella, J.L. A new population of the globally endangered red-fronted macaw *Ara rubrogenys* unusually breeding in palms. *Birds Conservation International* 6: 1-4, 2012.
- SABINO, J., PRADO, P.I. *Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil*, COBIO/MMA, Brasília, Brasil, 2003.
- SABINO, J., PRADO, P.I.K.L. *Vertebrados*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil, 2004.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, New York, USA, 2001.
- SEGELBACHER, G., CUSHMAN, S.A., EPPERSON, B.K. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conservation Genetics* 11: 375-385, 2010.
- SCHARTL, M. Sex chromosome evolution in non-mammalian, vertebrates. *Current Opinion on Genetics and Development* 14: 634-641, 2004.

- SHELDON, B.C. Sex allocation: At the female's whim. *Current Biology* 9: 487-489, 2009.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira, uma introdução*. Editora Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 1985.
- SICK, H. *Birds in Brazil: A natural history*. Princeton University Press. Princeton, USA, 1993.
- SICK H. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997.
- SILVA, J.M.C. Birds of the Cerrado region, South America. *Steenstrupia* 21: 69-92, 1995.
- SILVA, J.M.C., BATES M.J. Biogeographic patterns and conservation in South American cerrado: a tropical savanna hotspot. *Bioscience* 52: 225-233, 2002.
- SILVA J.M.C., SOUZA M.A., BIEBER A.G.D., CARLOS C.J. Aves da Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. In: Leal I.R., Tabarelli M., Silva J.M.C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2003.
- SILVA, L.A.F., PASSOS, N.S. *DNA Forense*. 2 edição. Editora EDUFAL, 2006.
- SILVEIRA, L.F. Mundo das Aves. Os Cardeais Brasileiros. *Cães e Cia* 399: 44-45, 2012.
- SNYDER, N., MCGOWAN, P., GILARDI, J., GRAJAL, A. *Parrots: status survey and conservation action plan 2000-2004*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2000.
- SOARES-FILHO, B.S. Modeling conservation in the Amazon basin. *Nature* 440: 520-523, 2006.
- SOULÉ, M.E., WILCOX, B.A. *Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, 1980.
- STRAUBE, F.C. Johann Natterer (1787-1843): naturalista-maior do Brasil. *Nattereria* 1: 4-13, 2000.
- STOTZ, F.D., Fitzpatrick, J.W., Parker, T.A., Moskovits, D.A. *Neotropical Birds, Ecology and Conservation*. University of Chicago Press, USA, 1996.
- SUZUKI, D.T., GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H. *Introdução à Genética*. 7ª.edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.
- TABERLET, P. BOUVET, J. A single plucked feather as a source of DNA for BIRD genetic studies. *Auk* 108: 959-969, 1991.
- TELL, L.A., LASLEY, B.L. An Automated Assay for Fecal Estrogen Conjugates in the Determination of sex in Avian Species. *Zoo Biology* 10: 361-367, 1991
- TOUFEXIS, A. All God's creatures priced to sell. *Time* 142: 36-41, 1993.
- TUBELIS, D.P., TOMAS, W.M. Bird species of the Pantanal wetland, Brazil. *Ararajuba* 11: 5-37, 2003.

- ULLER, T., PEN, I., WAPSTRA, E. The evolution of sex ratios and sex determining systems. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 6, 2007.
- VANNUCCI-NETO, R. Aves Silvestres em Cativeiro: Considerações Gerais. Tráfico de Aves. *O Curumim* 95: 4 -5, 2000.
- VANZOLINI, P.E. A contribuição zoológica dos primeiros naturalistas viajantes no Brasil. *Revista USP - Dossiê Brasil dos Viajantes* 30: 191-238, 1996.
- VOOREN, C.M., BRUSQUE, L.F. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Zona Costeira e Marinha: diagnóstico sobre aves do ambiente costeiro do Brasil, 1999. Disponível em <<http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/aves>>.
- VUCICEVIC, M., STEVANOV-PAVLOVIC, M., STEVANOVIC, J., BOSNJAK, J., GAJIC, B., ALEKSIC, N., STANIMIROVIC, Z. Sex determination in 58 bird species and evaluation of *CHD* gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoological Biology* 2: 1-13, 2012.
- WANJTAL, A. SILVEIRA, F.L. A soltura de aves contribui para sua conservação. *Atualidades Ornitológicas* 98, 2000.
- WEBB, J. *Procecuting wildlife traffickers: important cases, many tools, good results*. 1ª. Conferência Sul Americana Sobre o Comércio Ilegal de Fauna Silvestre. Brasília, Brasil, 2001.
- WRIGHT, T.F. Nest poaching in neotropical parrots. *Conservation Biology* 15: 710-720, 2001.

ANEXOS

ANEXO I - QUESTIONÁRIO ELABORADO PARA LEVANTAMENTO DE DADOS DAS ÁREAS DE GENÉTICA FORENSE E CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA

Sexo: Feminino () Masculino ()

Idade: _____

Profissão: _____

Grau de instrução:

() Graduação - Em andamento () / Finalizado () Curso: _____

() Pós-Graduação - Em andamento () / Finalizado () Programa: _____

() Docente - Departamento: _____

() Assistente de Suporte Acadêmico - Departamento: _____

Área de atuação: _____

EM CADA UMA DAS QUESTÕES ABAIXO, ASSINALE UMA OU MAIS DE UMA ALTERNATIVA.

1) Onde pode atuar o especialista em genética forense?

- () Crimes e questões jurídico-policiais
- () Tráfico de animais
- () Identificação de espécies animais e plantas
- () Testes de paternidade
- () Identificação do sexo de animais

2) Em qual(is) organismo(s) é possível trabalhar com genética forense?

- () Humanos
- () Animais
- () Plantas

3) Qual(is) área(s) envolve(m) estudos forenses?

- () Química
- () Biologia
- () Matemática/Estatística
- () Psicologia/Psiquiatria
- () Computação

4) Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?

- () Impressão digital
- () Sangue
- () Saliva
- () Sêmen
- () Penas
- () Pelos
- () Fezes

5) A genética forense pode estar associada a uma área da biologia, chamada Genética da Conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?

- () Combatendo o tráfico de animais silvestres
- () Conservando a biodiversidade
- () Reduzindo os riscos de extinção em espécies
- () Fornecendo ferramentas que auxiliem na identificação de espécies
- () Auxiliando na identificação de produtos comercializados ilegalmente

ANEXO II - LAUDO DE SEXAGEM MOLECULAR EMITIDO PELO LABORATÓRIO DE GENÉTICA ANIMAL DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DA UNESP

LABORATÓRIO DE GENÉTICA ANIMAL

Sexagem Molecular de Aves

Através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com amplificação de segmentos de DNA específicos dos cromossomos sexuais Z e W, foi determinado o sexo da seguinte ave:

Espécie: *Athene cunicularia*

Amostra: PENA

Nome Comum: Coruja buraqueira

Data de Coleta: 13/09/2011

Proprietário: CEMPAS

SEXO: MACHO

Confiabilidade: 99,9%

Identificação:

Data de Emissão: 08/11/2011

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko

Docente Responsável

Departamento de Genética

Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista

Bianca Picado Gonçalves

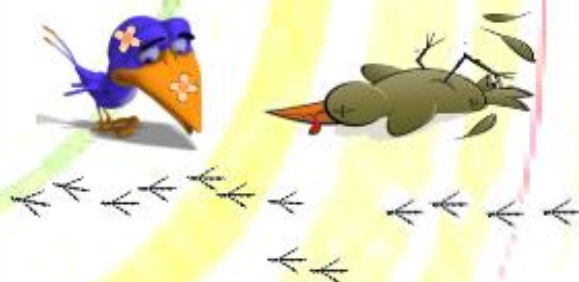
Discente Responsável

ANEXO III - FOLDER DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA ELABORADO PARA CONSCIENTIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ACERCA DA PROBLEMÁTICA ASSOCIADA AO TRÁFICO ILEGAL DE AVES E DA APLICAÇÃO DA GENÉTICA FORENSE NA ÁREA DE CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA



VOCÊ SABIA QUE...

Muitas aves apreendidas pela Polícia Ambiental ou pelo IBAMA foram vítimas de maus tratos e sofreram estresse. Estas aves necessitam ser alojadas, alimentadas e precisam receber cuidados médicos-veterinários.



Depois, devem ser encaminhadas a zoológicos, criadouros científicos, comerciais ou conservacionistas para sua manutenção e reprodução em cativeiro e posterior reintrodução na natureza.



Para os programas de reprodução em cativeiro darem certo, é comum formar casais.

QUEM É MACHO E QUEM É FÊMEA ?

Nem sempre é fácil identificar o sexo das aves pois várias espécies não apresentam **dimorfismo sexual**, ou seja, não possuem características externas diferentes entre machos e fêmeas.



Existe uma área de pesquisa, chamada **Genética da Conservação**, que utiliza dados genéticos para auxiliar a conservação das espécies. Alguns dados genéticos podem ser usados para se identificar o sexo das aves.

COMO A GENÉTICA PODE IDENTIFICAR O SEXO DAS AVES ?



O sexo das aves pode ser identificado por meio de uma análise do DNA, chamada "sexagem molecular".

Na sexagem molecular, se analisa uma região do DNA que tem diferenças entre machos e fêmeas.

Estas diferenças estão relacionadas a uma segmento de DNA dos cromossomos sexuais das aves.

MACHO — FÊMEA



As fêmeas têm dois cromossomos sexuais diferentes (ZW) e os machos possuem dois cromossomos sexuais iguais (ZZ).

Neste teste genético, não é necessário machucar nenhuma ave. Para isolar o DNA, basta usar uma pena de cada animal.



Para obter laudos de sexagem molecular de aves, procure um serviço registrado e autorizado pelo IBAMA.

A Genética da Conservação, associada à área forense (que trata de questões judiciais), pode ajudar a solucionar crimes ambientais e auxiliar o combate ao tráfico de aves por meio da identificação de espécies e verificação do local de origem de animais traficados.

CONHEÇA NOSSA LEI:

CRIMES CONTRA ANIMAIS SILVESTRES SÃO INAFIANÇÁVEIS

A nossa legislação prevê **pena de prisão** para quem "matar, perseguir, caçar, apanhar, coletar, utilizar espécimes da fauna silvestre, nativos ou em rotas migratórias, sem a devida permissão, licença ou autorização da autoridade competente em desacordo com a obtida" " (Art. 29 da Lei de Crimes Ambientais - Lei 9605/98).

VOCÊ PODE DENUNCIAR!

Em casos de suspeita de captura ou comércio ilegal de animais silvestres, entre em contato com a

Polícia Ambiental de sua cidade ou pelo telefone 0800-113560. A denúncia pode ser anônima.



Realização:

Bianca Picado Gonçalves

Adriane Pinto Wasko

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências, UNESP



Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico

Apoio:



REDE NACIONAL DE
EDUCAÇÃO E CIÊNCIA
Novos Talentos da Rede Pública



C A P E S

Programa de Apoio a Projetos Extracurriculares: Investindo em Novos Talentos da Rede de Educação Pública para Inclusão e Desenvolvimento da Cultura Científica

awasko@ibb.unesp.br

(14) 38800364

ANEXO IV - TABELAS AUXILIARES REFERENTES ÀS VARIÁVEIS ANALISADAS DO QUESTIONÁRIO

Tabela I: Variável qualitativa associada ao sexo, referente ao número de questionários respondidos.

Sexo	No. de Questionários Respondidos	Porcentagem (%)
Masculino	134	45,3
Feminino	162	54,7

Tabela II: Variável qualitativa associada à profissão/formação, referente ao número de questionários respondidos.

Profissão/Formação	No. de Questionários Respondidos	Porcentagem (%)
Alunos de mestrado (Grupo Amostral 1)	89	30,1
Alunos de doutorado (Grupo Amostral 2)	96	32,4
Docentes (Grupo Amostral 3)	90	30,4
Técnicos Administrativos (Grupo Amostral 4)	21	7,1

Tabela III: Variável associada a vínculo com programa de pós-graduação (PPG) do Instituto de Biociências da UNESP, referente ao número de questionários respondidos.

Programa de Pós-Graduação	No. de Questionários Respondidos	Porcentagem (%)
PPG em Biometria	10	3,4
PPG em Biologia Geral e Aplicada	51	17,2
PPG em Ciências Biológicas (Botânica)	35	11,8
PPG em Farmacologia	31	10,5
PPG Ciências Biológicas (Genética)	60	20,3
PPG em Zoologia	42	14,2
ausência de informação	67	22,6

Tabela IV: Variável associada a vínculo com departamentos do Instituto de Biociências e com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, referente ao número de questionários respondidos.

Departamento	No. de Questionários Respondidos	Porcentagem (%)
Anatomia	13	4,4
Bioestatística	16	5,4
Educação	8	2,7
Física/Biofísica	11	3,7
Fisiologia	11	3,7
Genética	29	9,8
Micro-Imunobiologia	12	4,1
Morfologia	37	12,5
Parasitologia	7	2,4
Química/Bioquímica	9	3,0
FMVZ	1	0,3
Botânica	38	12,8
Zoologia	42	14,2
Farmacologia	30	10,1
ausência de informação	32	10,8

Tabela V: Variável associada à questão número 1 do questionário ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?"), referente ao número de alternativas assinaladas.

Total de alternativas assinaladas	No. de Respostas	Porcentagem (%)
1	28	9,5
2	30	10,1
3	53	17,9
4	54	18,2
5	131	44,3

Tabela VI: Valores de contingência entre profissão/formação e a alternativa "tráfico de animais" da questão número 1 do questionário ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?").

Profissão/Formação	Respostas			p-valor QQ	Porcentagem (%)
	Alternativa não assinalada	Alternativa assinalada	Total		
Aluno de Mestrado	40	49	89	0,005	55,1
Aluno de Doutorado	24	72	96		75,0
Docente	41	49	90		54,4
Técnico Administrativo	11	10	21		47,6
Total	116	180	296		60,8

Tabela VII: Valores de contingência entre programas de pós-graduação e a alternativa "tráfico de animais" da questão número 1 do questionário ("Onde pode atuar o especialista em genética forense?").

Programa de Pós-Graduação	Respostas			p-valor QQ	Porcentagem (%)
	Alternativa não assinalada	Alternativa assinalada	Total		
Biometria	8	2	10	0,005	20,0
Biologia Geral e Aplicada	24	27	51		52,9
Botânica	12	23	35		65,7
Farmacologia	13	18	31		58,0
Genética	11	49	60		81,7
Zoologia	12	30	42		71,4
Vínculo não informado	36	31	67		46,2
Total	116	180	296		60,8

Tabela VIII: Variável associada à questão número 2 do questionário ("Em qual(is) organismo(s) é possível trabalhar com genética forense?"), referente ao número de alternativas assinaladas.

Total de alternativas assinaladas	No. de Respostas	Porcentagem (%)
1	9	3,0
2	41	13,9
3	246	83,1

Tabela IX: Variável associada à questão número 3 do questionário ("Qual(is) área(s) envolve(m) estudos forenses?"), referente ao número de alternativas assinaladas.

Total de alternativas assinaladas	No. de Respostas	Porcentagem (%)
0	1	0,3
1	14	4,7
2	30	10,1
3	55	18,6
4	78	26,4
5	118	39,9

Tabela X: Variável associada à questão número 4 do questionário ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?"), referente ao número de alternativas assinaladas.

Total de alternativas assinaladas	No. de Respostas	Porcentagem (%)
0	1	0,3
1	5	1,7
2	18	6,1
3	60	20,3
4	94	31,8
5	111	37,5

Tabela XI: Valores de contingência entre profissão/formação e a alternativa "penas" da questão número 4 do questionário ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?").

Profissão/Formação	Respostas			p-valor QQ	Porcentagem (%)
	Alternativa não assinalada	Alternativa assinalada	Total		
Aluno de Mestrado	15	74	89	0,063	83,1
Aluno de Doutorado	5	91	96		94,8
Docente	11	79	90		87,8
Técnico Administrativo	3	18	21		85,7
Total	34	262	296		88,5

Tabela XII: Valores de contingência entre programas de pós-graduação e a alternativa "penas" da questão número 4 do questionário ("Qual(is) material(is) pode(m) ser utilizado(s) em análises de genética forense?").

Programa de Pós-Graduação	Respostas			p-valor QQ	Porcentagem (%)
	Alternativa não assinalada	Alternativa assinalada	Total		
Biometria	2	8	10	0,183	80,0
Biologia Geral e Aplicada	8	43	51		84,3
Botânica	5	30	35		85,7
Farmacologia	2	29	31		93,5
Genética	2	58	60		96,7
Zoologia	5	37	42		88,1
Vínculo não informado	10	57	67		85,1
Total	34	262	296		88,5

Tabela XIII: Variável associada à questão número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?"), referente ao número de alternativas assinaladas.

Total de alternativas assinaladas	No. de respostas	Porcentagem (%)
0	2	0,7
1	37	12,5
2	39	13,2
3	68	23,0
4	66	22,3
5	84	28,4

Tabela XIV: Valores de contingência entre profissão/formação e a alternativa "combatendo o tráfico de animais" da questão número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?").

Profissão/Formação	Respostas			p-valor QQ	Porcentagem (%)
	Alternativa não assinalada	Alternativa assinalada	Total		
Aluno de Mestrado	56	33	89	0,043	36,4
Aluno de Doutorado	46	50	96		52,1
Docente	49	41	90		45,6
Técnico Administrativo	16	5	21		23,8
Total	167	129	296		43,6

Tabela XV: Valores de contingência entre programas de pós-graduação e a alternativa "combatendo o tráfico de animais" da questão número 5 do questionário ("A genética forense pode estar associada a uma área de biologia, chamada genética da conservação. Como a genética da conservação pode ajudar em casos forenses?").

Programa de Pós-Graduação	Respostas			p-valor QQ	Porcentagem (%)
	Alternativa não assinalada	Alternativa assinalada	Total		
Biometria	7	3	10	0,315	30,0
Biologia Geral e Aplicada	26	25	51		49,0
Botânica	22	13	35		37,1
Farmacologia	18	13	31		41,9
Genética	29	31	60		51,7
Zoologia	21	21	42		50,0
Vínculo não informado	45	22	67		32,8
Total	167	128	296		43,2

ANEXO V - MANUSCRITO PUBLICADO NA REVISTA "SAÚDE, ÉTICA E JUSTIÇA", INSTITUTO OSCAR FREIRE, FACULDADE DE MEDICINA DA USP.

Gonçalves BP, Wasko AP (2013) Genética da conservação aplicada ao tráfico ilegal de aves. Saúde, Ética e Justiça (Volume Especial - Anais do IV Congresso Brasileiro de Genética Forense) 18: 75-79.

Genética da conservação aplicada ao tráfico ilegal de aves

Conservation genetics applied to birds illegal trade

Bianca Picado Gonçalves^{1*}, Adriane Pinto Wasko²

¹ Bióloga, Professora Assistente Doutora do Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP.

² Bióloga, Aluna de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências, UNESP.

* Este trabalho é relacionado à revisão bibliográfica da dissertação de mestrado da aluna Bianca Picado Gonçalves

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: Adriane Pinto Wasko, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, CEP 18618-970. E-mail: awasko@ibb.unesp.br

RESUMO: Entre os animais silvestres envolvidos em tráfico/comércio ilegal no Brasil, as aves compreendem um dos grupos mais atingidos, especialmente devido a características como canto e colorido das penas. Atualmente, análises genéticas compreendem uma das formas mais eficazes de gerar dados para solucionar e minimizar os resultados de crimes ambientais e comércio ilegal de animais silvestres. Uma das análises genéticas que podem ser utilizadas com o intuito de subsidiar programas conservacionistas associados ao tráfico ilegal de aves refere-se à sexagem molecular, dado que neste grupo de vertebrados nem sempre é possível identificar o gênero por meio de caracteres morfológicos. A sexagem molecular pode ser feita com base em amostras de DNA obtidas de diferentes fontes, como penas e sangue, e posterior amplificação de regiões dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* (*chromo helicase-DNA binding*). Os dados de perfis genéticos sexo-específicos servem de subsídio a programas conservacionistas de manutenção e/ou reprodução em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução dos animais em ambiente natural.

DESCRIPTORIOS: Aves; Sexagem; Genética da Conservação; Tráfico.

ABSTRACT: Birds represent the greater part of the animals associated to illegal trade/commerce in Brazil, specially due to some characteristics as song and feathers colors. Nowadays, genetic analyses comprehend one of the most efficient approaches to generate data in order to solve and minimize the results of environmental crimes and illegal trade of wild animals. In birds, one of the genetic survey that can be used to subsidize conservation plans associated to illegal trade refers to molecular sexing, since it is not possible to identify the gender in some avian species based on morphological characters. The molecular sexing can be performed using DNA from different samples, as feathers and blood, and further amplification of the *CHD-Z* e *CHD-W* (*chromo helicase-DNA binding*) gene regions. The sex-specific genetic profiles can support conservation programs of captive maintenance and/or reproduction and subsequent release or reintroduction of the animals on wild environment.

KEYWORDS: Birds; Sexing; Conservation Genetics; Trade.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma extraordinária biodiversidade, apresentando o maior número de espécies conhecidas de mamíferos, peixes dulcícolas, anfíbios e plantas superiores. Além disso, abriga uma das mais diversas avifaunas do mundo, sendo o número de espécies estimado em cerca 1.800. Adicionalmente, aproximadamente 240 espécies de aves são endêmicas, tendo uma distribuição geográfica restrita ao Brasil^{1,2}. Apesar desta grande diversidade de aves em todos os biomas brasileiros, intervenções humanas, especialmente associadas à destruição e/ou fragmentação de habitats e mudanças climáticas, têm tido impactos negativos nas populações, uma vez que diminuem a disponibilidade de recursos e modificam as condições de seus ambientes^{3,4}.

Os resultados desses impactos podem ser claramente visualizados pelo número de espécies de aves ameaçadas de extinção, sendo o Brasil o país que apresenta o maior número de espécies neotropicals categorizadas como "criticamente em perigo", "em perigo" ou "vulnerável"^{5,6}. Adicionalmente, o tráfico ilegal de animais silvestres (naturais de determinado país ou região, pertencentes às espécies nativas, migratórias, aquáticas ou terrestres, que tenham a sua vida ou parte dela ocorrendo naturalmente dentro dos limites do território nacional e suas águas jurisdicionais), definido pela retirada de espécimes de vida livre para que possam ser comercializados, é também responsável pela ameaça de diversas espécies de aves no Brasil⁷.

TRÁFICO DE ANIMAIS SILVESTRES

Estima-se que o comércio ilegal de animais silvestres movimenta anualmente de 10 a 20 bilhões de dólares no mundo⁸, sendo considerado a terceira maior atividade ilegal, após os tráficos de armas e narcóticos⁹. Devido especialmente a sua grande biodiversidade, o Brasil é responsável por cerca de 10 a 15% do valor total mundial do tráfico de animais silvestres. Este tráfico é estruturado sobre uma rede formada por um emaranhado de rotas para o escoamento de animais no interior do Brasil e também para fora do país¹⁰. Nas Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país, ocorre um expressivo número de ocorrências de captura de animais silvestres que são posteriormente destinados a centros urbanos por intermédio de meios ilegais. Estes

animais são levados principalmente para a região Sudeste, em especial São Paulo e Rio de Janeiro, de onde, muitas vezes, partem para abastecer o comércio ilegal internacional^{11,12}. Segundo Giovanini¹³, existem quatro modalidades básicas de comércio ilegal de animais silvestres no país - (1) animais para colecionadores particulares e zoológicos - o mais cruel dos tipos de tráfico da vida selvagem, pois prioriza principalmente as espécies mais ameaçadas; (2) animais para fins científicos (biopirataria) - neste grupo, encontram-se as espécies que fornecem substâncias químicas que servem como base para a pesquisa e produção de medicamentos, movimentando altos valores; (3) animais para *pet shops* - modalidade que mais incentiva o tráfico de animais silvestres no Brasil, tendo como objetivo final a população em geral; (4) produtos de fauna - usados para fabricar adornos e artesanatos, como couros, peles, penas, garras e presas, entre outros.

Entre os diversos animais que têm sido envolvidos em crimes ambientais no país e apreendidos por órgãos de fiscalização, as aves compreendem um dos grupos mais atingidos, especialmente devido a seu alto valor de mercado associado ao canto e ao exuberante colorido das penas¹⁴. Estima-se que as aves correspondam a 80% das espécies mais associadas ao tráfico ilegal, sendo os Psittaciformes (como periquitos, papagaios e maritacas) e Passeriformes (como canário da terra, trinca ferro e cardeal da Amazônia) os grupos mais comumente apreendidos por autoridades ambientais como o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis)^{15,16}. Em tais apreensões, é comum constatar métodos não adequados de transporte dos animais, sem água e sem alimento, e procedimentos de cegar, amarrar as asas, quebrar o osso externo e pintar as penas dos animais, e até mesmo matar os pais para facilitar a captura dos filhotes, o que resulta em um alto número de mortes^{17,18,19}.

Com base nas leis e decretos associados a crimes contra animais silvestres, os órgãos de fiscalização, frente a um delito, normalmente autuam o infrator e apreendem os animais. Os animais apreendidos necessitam ser inicialmente alojados, alimentados e receber cuidados médicos-veterinários, especialmente devido os maus tratos e ao estresse a que foram submetidos. Posteriormente, há necessidade de serem incluídos em programas de manutenção e/ou reprodução em cativeiro e posterior soltura ou reintrodução¹⁹. Tais medidas podem ser realizadas por Centros de Recepção, Triagem e Reabilitação de Animais Silvestres (CETAS), Centros de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) e Criadouros Científicos de Fauna Silvestre, cujos objetivos relacionam-se a fins conservacionistas.

CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA E ANÁLISES GENÉTICAS

O crescente impacto de atividades humanas associadas à destruição de habitats e ao tráfico de animais silvestres tem levado a uma alarmante perda da biodiversidade presente em nosso planeta. Esforços no sentido de reverter ou minimizar os efeitos deste processo são ainda insuficientes e necessariamente devem envolver iniciativas integradas por campos tão diversos quanto a economia, política, ciências sociais e muitas áreas das ciências biológicas, as quais compõem uma ciência relativamente nova conhecida como biologia da conservação²⁰. Inserida no contexto da biologia da conservação, encontra-se o campo da genética da conservação, cujos estudos baseiam-se atualmente sobretudo em análises moleculares²¹.

A identificação e caracterização de marcadores do genoma nuclear iniciou-se com análises de polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA, obtidos por meio do tratamento do DNA com enzimas de restrição, gerando padrões de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)²². Adicionalmente, a PCR (*Polymerase Chain*

Reaction)²³ permitiu a descrição de outros marcadores moleculares, incluindo classes de seqüências repetitivas de DNA, como os microssatélites, e de seqüências polimórficas amplificadas ao acaso (RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*)²⁴. Atualmente, os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*)²⁵ representam os marcadores mais amplamente utilizados nas áreas de genética forense e populacional, dado que encontram-se distribuídos por todos o genoma e geralmente apresentam um alto grau de polimorfismo. Estes possuem a vantagem de ser co-dominantes, o que permite a identificação de heterozigotos, e podem ser analisados por meio de sua amplificação, via PCR, utilizando *primers* específicos complementares às seqüências únicas que os flanqueiam²⁴. Recentemente, uma outra classe de marcador molecular, denominado de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), ou seja, polimorfismo criado por uma mutação de ponto, resultante da substituição de um nucleotídeo por outro levando ao surgimento de diferentes alelos, vem sendo cada vez mais utilizada em análises de genética forense e conservacionista, dado seu alto grau de polimorfismo entre diferentes indivíduos tanto no DNA nuclear como no DNA mitocondrial²⁶.

Análises forenses e conservacionistas podem, portanto, ser baseadas em análises de DNA no sentido de subsidiar problemas de questionamentos jurídico-policiais associados à conservação da biodiversidade. Estas duas vertentes apresentam uma correlação direta, no sentido de gerar dados que auxiliem, especialmente, a resolução de incertezas taxonômicas, determinação do sexo de indivíduos, minimização da perda de diversidade genética, determinação de graus de parentesco, definição de rotas de tráfico e delineamento de estratégias de recuperação de espécies e/ou populações.

SEXAGEM MOLECULAR EM AVES

A correta determinação do sexo de indivíduos é extremamente importante para elaboração e implementação de programas de manutenção e/ou reprodução em cativeiro, reintrodução ou soltura e para estudos comportamentais. Em aves, a determinação do sexo tem especial importância, dado que aproximadamente 30% das espécies não apresentam dimorfismo sexual externo que permita a diferenciação morfológica entre machos e fêmeas. Além disso, mesmo em espécies que apresentam dimorfismo sexual tais características muitas vezes são sutis ou aparecem somente após o período de maturidade sexual, o que dificulta a correta identificação do gênero²⁷.

Embora o sexo em aves possa ser determinado por meio de análises laparoscópicas, de esteróides fecais ou cariotípicas, tais metodologias apresentam diversas desvantagens. O exame de laparoscopia envolve grande manipulação dos animais e riscos cirúrgicos. A razão entre estrógeno e testosterona, utilizada na análise de esteróides fecais, não é altamente confiável para determinação do sexo. Por último, embora a sexagem por meio de análises cariotípicas seja adequada em aves, já que cromossomos sexuais ZW e ZZ são encontrados em fêmeas e machos, respectivamente, esta demanda grande tempo e é difícil em espécies que possuem cromossomos sexuais praticamente idênticos²⁸.

Desta forma, a denominada "sexagem molecular" representa atualmente a forma mais eficiente de determinação do sexo em um grande número de espécies de aves. Esta pode ser feita com base em amostras de DNA obtidas de diferentes fontes, como penas e sangue que representam formas não-destrutivas de amostragem biológica em aves^{29,30}. Embora invasivas, as coletas de penas e de sangue implicam somente em um pequeno período de estresse aos animais, dado que é necessário realizar a contenção e a manipulação destes. Posteriormente, é realizada análise de regiões dos genes *CHD-Z* e

CHD-W (*chromo helicase-DNA binding*), localizados nos cromossomos sexuais, para geração de perfis genéticos sexo-específicos.

O gene *CHD-W* localiza-se no cromossomo W e, portanto, encontra-se somente nas fêmeas, e o gene *CHD-Z* é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo em ambos os sexos³¹. Desta forma, a identificação do gênero pode ser realizada por meio da utilização da técnica de PCR, empregando um único conjunto de *primers* que se anelam a regiões conservadas de éxons dos genes *CHD-Z* e *CHD-W* e amplificam uma região de íntron que difere em tamanho entre os dois genes, resultando na identificação de um fragmento de DNA em machos (genótipo homozigoto) e de dois fragmentos distintos em fêmeas (genótipo heterozigoto)^{31,32,33}. O resultado, visualizado em gel de agarose ou poli(acrilamida), demonstra que para as fêmeas, que possuem dois cromossomos sexuais diferentes, são identificados dois fragmentos de DNA, enquanto para os machos é identificado somente um fragmento (Figura 1). As maiores vantagens desta metodologia referem-se a sua simplicidade, baixo custo, amostragem minimamente invasiva aos animais e uso de quantidades reduzidas de DNA²⁸.

Laudos de sexagem molecular podem ser obtidos junto a serviços registrados e autorizados pelo IBAMA e, na área de genética forense associada à conservação biológica, compreendem uma das principais medidas para que se obtenha sucesso em proposições de estratégias de formação de grupos ou casais objetivando a reprodução em cativeiro e/ou uma posterior soltura ou reintrodução monitorada de indivíduos, casais ou descendentes na natureza.

CONCLUSÕES

Captura, caça, aprisionamento, transporte, compra e venda de animais silvestres, nativos ou em rota migratória, sem permissão da autoridade competente, é crime previsto na Lei Federal dos Crimes Ambientais no. 9605/98. Esta dispõe sobre as sanções penais e administrativas para os infratores, prevendo pena de prisão de seis meses a um ano, além de multa para quem desrespeitá-la. Apesar disso, a captura e o comércio ilegal de animais silvestres já contribuem extensivamente para a ameaça de várias espécies de aves ou populações encontradas no Brasil, como o papagaio-de-peito-roxo *Amazona vinacea*, a arara-azul-grande *Anodorhynchus hyacinthinus*, a ararajuba *Guaruba guarouba* e o bicudo *Oryzoborus maximiliani*⁶.

Por outro lado, o comércio de animais silvestres nascidos em cativeiro é também previsto em Lei Federal (Portaria 118-N/MMA-IBAMA de 15/10/1997), com o intuito de estimular a reprodução de espécies mais procuradas em criadouros regulamentados para que estes atendam as demandas do mercado, desvalorizando, assim, as ações do tráfico. Embora a reprodução de aves em cativeiro seja difícil, a utilização de dados genéticos, como os de análise de grau de parentesco e de sexagem molecular, podem subsidiar planos de formação de casais. Desta forma, a obtenção de filhotes de aves em cativeiro poderá não somente fomentar programas conservacionistas de soltura e reintrodução na natureza como também aumentar a oferta de animais a serem comercializados de forma legal no país.

REFERÊNCIAS

1. Sabino J, Prado PIKL. Vertebrados. Ministério do Meio Ambiente; 2004.
2. CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos) Disponível em <<http://www.ib.usp.br/cbro>> (acessado em março de 2013).

3. Primack RB, Rodrigues E. *Biologia da conservação*. Londrina, PR, Brasil; 2001.
4. Segelbacher G, Cushman SA, Epperson BK, Fortin M-J, Francois O, Hardy OJ, Holderegger R, Taberlet P, Waits LP, Manel S. Applications of landscape genetics in conservation biology: concepts and challenges. *Conserv Genet*. 2010;11:375-385.
5. Collar NJ. Family Psittacidae (Parrots). In: *Handbook of the birds of the world*. Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J, editors. Barcelona, Espanha: Lynx Edicions; 1997.
6. IUCN - International Union for Conservation of Nature. IUCN red list of threatened species. Disponível em <<http://www.redlist.org>> (acessado em abril de 2013).
7. Marini MA, Garcia FI. Conservação de aves no Brasil. *Megadiversidade*. 2005;1:95-102.
8. Norberto G. Tráfico de animais silvestres x educação. Disponível em <http://www.zoo.ba.gov.br/upload/pdf/artigo_gerson.pdf>
9. Webb J. Prosecuting wildlife traffickers: important cases, many tools, good results. [Apresentado a 1ª. Conferência Sul Americana Sobre o Comércio Ilegal de Fauna Silvestre, Brasília, Brasil, 2001].
10. Hernandez TFE, Carvalho SM. O tráfico de animais silvestres no Estado do Paraná. *Acta Sci Hum Soc Sci Maringá*. 2006; 28:257-266.
11. Jupiara A, Anderson C. Rio é o centro internacional de traficantes de animais. *O Globo*. 1991; 21 de julho, Rio de Janeiro.
12. RENCTAS - Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres. 1º. Relatório Nacional sobre o Tráfico de Fauna Silvestre. Brasília, Brasil: Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestres; 2002.
13. Giovanini D. Diagnóstico del comercio ilegal de la fauna brasileña. In: *Actitudes hacia la fauna en Latinoamérica*. Washington, USA: Human Society Press; 1998.
14. Pereira GA, Brito MT. Diversidade de aves silvestres comercializadas nas feiras livres da região metropolitana de Recife, Pernambuco. *Atual Ornitol*. 2005;126:14.
15. Araujo ACB, Behr ER., Longui SJ, Menezes PTS, Kanieski MR. Diagnóstico sobre a avifauna apreendida e entregue espontaneamente na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Braz J Biosc*. 2010;8:279-284.
16. MMA - Ministério do Meio Ambiente. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos sulinos. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF). Brasília, Brasil: Ministério do Meio Ambiente; 2012.
17. Lopes PRD. Comércio de animais silvestres. *Bioikos*. 1991;5:49-56.

18. Toufexis A. All God's creatures priced to sell. *Time*. 1993;142:36-41.
19. Branco MA. Políticas públicas e serviços públicos de gestão e manejo da fauna silvestre nativa resgatada. Estudo de caso. Prefeitura da Cidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil; 2008.
20. Soulé ME, Wilcox BA. *Conservation Biology. An evolutionary-ecological perspective*. Sunderland: Sinauer Associates; 1980.
21. Avise JC. Introduction: the scope of conservation genetics. In: *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York, USA; 1996.
22. Grodzicker T, Willians J, Sharp P, Sambrook J. Physical mapping of temperature sensitive mutations. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1974;39:439-446.
23. Mullis K, Faloona S, Saiki G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*. 1987;51:263-273.
24. Ferreira ME, Grattapaglia D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em genética*. 3ª. ed. Brasília, Brasil: EMBRAPA-CENARGEM; 1998.
25. Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of adinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*. 1989;44:397-401.
26. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *An introduction to forensic genetics*. England: John Wiley & Sons Ltda; 2007.
27. Pough FH, Janis CME, Heiser JB. *A vida dos vertebrados*. 3a. edição. São Paulo, Brasil: Editora Atheneu; 2003.
28. Miyaki CY, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira SL, Wajntal A. Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive populations studies. *Zoo Biol*. 1998;17:415-423.
29. Waits LP, Paetkau D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *J Wildlife Management*. 2005;69:1419-1433.
30. Pauli JN, Whiteman JP, Riley MD, Middleton AD. Defining noninvasive approaches for sampling of vertebrates. *Cons Biol*. 1999;24:349-352.
31. Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG. A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol*. 1998;7:1071-1075.
32. Fridolfsson AK, Ellegren H. Molecular evolution of the avian *CDH1* genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics*. 2000;155:1903-1912.

33. Griffiths R. Sex identification in birds. *Seminars on Avian and Exotic Pet Medicine*. 2000;9:14-26.

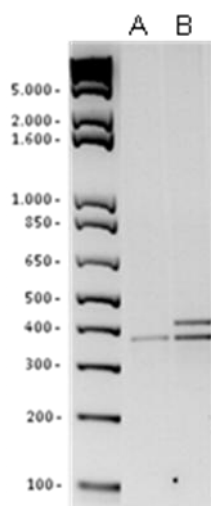


Figura 1: Perfis genéticos sexo-específicos para machos (A) e fêmeas (B) de espécies de aves, relativos à amplificação de genes *CHD-Z* e *CHD-W*, visualizados em gel de agarose 2%. À esquerda, marcador de peso molecular de 1Kb (indicações em pares de bases).