

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA
SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL

TÁLIA MISSEN TREMORI

Botucatu – SP

Julho 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA
SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL

TÁLIA MISSEN TREMORI

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

Orientadora: Profª Drª Noeme Sousa Rocha
FMVZ – UNESP – Botucatu

Orientador: Prof. Dr. Julio López-Abán

Facultad de Farmácia – USAL - Salamanca

Coorientadora: Profª Drª Cintia Fridman Rave

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Fernández Soto

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Tremori, Tália Missen.

Identificação criminal de espécies da fauna silvestre por DNA mitocondrial e implicação na saúde pública / Tália Missen Tremori. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Noeme Sousa Rocha

Coorientador: Cintia Fridman Rave

Coorientador: Pedro Fernández Soto

Capes: 50502000

1. Tripanossomose. 2. Zoonoses. 3. Saúde pública. 4. Crime contra o meio ambiente. 5. Perícia (Exame técnico).

Palavras-chave: Crimes contra a fauna; Perícia veterinária; Saúde pública; *Tripanossomíase americana*; Zoonoses.

Nome do Autor: Tália Missen Tremori

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha

Presidente e Orientadora

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

Prof. Dr. Julio López Abán

Orientador

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

Prof. Dr. Eduardo Massad

Membro Titular

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

Dra. Angela Maria Branco

Membro Titular

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

Prof. Dr. Antonio Juan García Fernández

Membro Titular

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

Profa. Dra. Ana Cristina Tasaka

Membro Suplente

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

Profa. Dra. Selene Daniela Babboni

Membro Suplente

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

Dra. María Belén Vicente

Membro Suplente

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

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

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

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

Aos animais.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Confúcio

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT.....	02
RESÚMEN.....	03
CAPÍTULO I	
1. Introdução.....	04
2. Revisão de literatura.....	05
3. Objetivos gerais.....	17
3.1. Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO II	
<i>Trypanosoma cruzi</i> in Brazilian wildlife trafficking reservoir competence by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay.....	19
CAPÍTULO III	
Avaliação da qualidade de material genético obtido de amostras forenses e identificação de espécies da fauna silvestre brasileira por DNA mitocondrial.....	29
CAPÍTULO IV	
<i>Hair analysis of mammals of Brazilian wildlife for forensic purposes.....</i>	45
CAPÍTULO V	
<i>Forensic genetic and hair analysis as a tool for Jaguar (<i>Panthera onca</i>) identification.....</i>	57
CAPÍTULO VI	
1. Discussão geral	66
2. Conclusões gerais.....	68
3. Conclusiones.....	68
4. Referências bibliográficas.....	70
Anexos.....	80

TREMORI, T. M. **Identificação criminal de espécies da fauna silvestre por DNA mitocondrial**. Botucatu, 2018. 80 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

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

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

TREMORI, T. M. **Criminal wildlife species identification by mitochondrial DNA**. Botucatu, 2018. 80 pages. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

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

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

TREMORI, T. M. **Identificación criminal de especies de la fauna silvestre por DNA mitocondrial**. Botucatu, 2018. 80 páginas. Tesis (Doctorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMÉN

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biodiversidade

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

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

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

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

2.2. Saúde Pública

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

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

Através de técnicas moleculares pode ser realizado o diagnóstico de enfermidades zoonóticas em animais silvestres, algo relevante, considerando que grande parte destes animais podem servir como reservatórios de doenças de importância para a saúde pública. A saúde humana e animal estão intimamente ligadas, as doenças infecciosas sejam elas emergentes ou reemergentes apresentam vários fatores contributivos, por exemplo,

distribuição geográfica, meio ambiente, exposições ou modificações genéticas, política, economia, adaptação dos microrganismos, entre outros (ASHFORD, 2003; DASZAK, 2008; FAO; WHO, 2014; PESAVENTO; MURPHY, 2014; DE SOUZA GODOI et al., 2017).

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

2.3. Legislação

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

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

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

O artigo 5º da Lei 5.517, de 23 de outubro de 1968 que trata do exercício da profissão do Médico Veterinário, relata que “é competência privativa legal a peritagem sobre animais, identificação, defeitos, vícios, doenças, acidentes e exames técnicos em questões judiciais; perícias, exames e pesquisas reveladoras de fraudes ou operações dolosas em animais inscritos em competições desportivas e em exposições agropecuárias; perícias para fins administrativos, de crédito e seguro; e exames toxicológicos e sanitários em produtos industriais de origem animal”.

2.4. Perícia Veterinária

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

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

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

Um perito pode ser oficial, designado pelo juiz (perito judicial), louvado ou ainda com a denominação de assistente técnico (quando presta serviços para uma das partes envolvidas no processo) (GARCIA DA COSTA FILHO, 2011). A perícia pode ser feita de maneira direta ou indireta e, segundo o artigo 158 do Código de Processo Penal (CPP), quando a infração deixar vestígios é

indispensável a realização do exame de corpo de delito, não podendo supri-lo a confissão do acusado. Um profissional capacitado pode atuar em diferentes áreas dentro da perícia veterinária, sendo: evolução e avaliação de rebanhos, avaliação de animais e seus rendimentos, arbitragem de valores, diagnóstico de lesões, identificação de animais, identificação de fraudes, custos de produção pecuária, determinação de sexo, idade, raça, espécie, inventário, necropsia de animais segurados, identificação de produtos e subprodutos de origem animal, exames médico veterinário legal, determinação de imperícia, verificação de parentesco, revelação de fraudes dolosas, bestialismo e zoofilia, intoxicação e envenenamentos, avaliação no valor econômico em animais exóticos, trânsito nacional e internacional de animais, produtos de origem animal e medicamentos de uso animal (COOPER, 1998; MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; NEWBERY; COOKE; MARTINEAU, 2016).

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

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

2.5. Medicina Legal Comparada

A Medicina Legal constitui do uso dos conhecimentos médicos para cumprimento das leis, sendo portanto considerada uma intersecção entre os conhecimentos do direito e da medicina (BONACCORSO, 2005; GARCIA DA

COSTA FILHO, 2011). Para o conceito de Medicina Legal Comparada extrapola-se muitos conceitos, métodos e padrões usados na Medicina Legal Humana. A aplicação de métodos semelhantes, com adaptações podem se adequar ao contexto da Medicina Veterinária e ser extremamente contributiva para a elucidação de crimes com envolvimento de animais, por exemplo o uso dos conceitos de traumatologia forense, entomologia forense, toxicologia forense, entre outros (MORAITIS; SPILIOPOULOU, 2010; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; KAFADAR; KAFADAR, 2015).

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

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

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

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

O médico veterinário deve estar preparado para lidar com casos que se enquadram em diferentes categorias: crimes de crueldade contra animais, bem estar animal, comércio ilegal de animais silvestres e exóticos, ou casos cíveis em que, por exemplo, busca-se uma recompensa, os quesitos podem variar entre o tipo de caso e ocorrer diferenças conforme a autoridade que solicitou o exame. Verificar se uma morte suspeita trata-se de um processo criminoso ou não é uma grande responsabilidade do legista que irá realizar a necropsia do cadáver (MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; KARSTEN et al., 2017)

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

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

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

2.6. Tráfico , Contrabando e Descaminho

Tendo em vista o artigo 334 do Código Penal (CP) e os artigos 29, 30 e 31 da Lei 9505/1995, se faz necessário conceituar e diferenciar essas entidades. Dessa maneira, entende-se por tráfico a prática habitual de entrada e saída de algo, via comércio ilegal de produtos, pessoas e animais. Já o

contrabando se refere à entrada de um produto falso ou original em um determinado país (REIS et al., 2016).

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

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

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

2.7. Identificação

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

As técnicas atualmente disponíveis incluem uso da fotodocumentação, morfologia, genética forense e também a identificação por meio de pelos. A maneira mais utilizada ao longo dos anos foi através da morfologia, utilizando-se a anatomia comparada (BOSMALI et al., 2012).

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

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

2.8. Genética Forense

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

Tecnologias de genética molecular são adequadas para detectar e fornecer evidências em investigações criminais, estas técnicas são de grande utilidade para casos de comércio ilegal de espécies selvagens. Dentre todos os métodos disponíveis, muitos ainda não possuem aplicação forense, porém as

pesquisas visam avançar e sustentar a utilização nestes casos. Para a realização de testes genéticos confiáveis é necessário estabelecer dentro do laboratório rígidos padrões de qualidade, como a calibração periódica dos equipamentos, coleta adequada do material, e procedimentos que minimizem as chances de troca acidental, ou proposital de amostras (ALACS et al., 2010; MWALE et al., 2017).

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

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

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

Das técnicas de genética molecular para o uso forense podemos utilizar DNA ou ácido ribonucleico (RNA). Quanto ao DNA podemos subdividir em nDNA e mtDNA, sendo que a maioria pode ser utilizada nestes dois tipos de

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

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

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

2.9. Identificação por DNA mitocondrial

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

A região do mtDNA denominada, Citocromo b, tem sido utilizado há bastante tempo em estudos sobre a biologia evolutiva dos animais. Além do mais essa técnica se aplica para diagnosticar doenças genéticas que podem

estar expressas nas mitocôndrias (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; DAWNAY et al., 2007).

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

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

2.11. Loop-mediated isothermal amplification

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

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

A técnica *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)* foi desenvolvida como um método molecular que possui alta sensibilidade, sendo capaz de amplificar várias cópias de DNA em até uma hora a uma concentração mínima de 0,5ng/µl, em condições isotermas (BESUSCHIO et al., 2017; CEVALLOS et al., 2017).

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

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

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Ampliar os estudos na área de Medicina Veterinária Forense relacionada ao tráfico, contrabando e descaminho de animais e sua implicação na saúde pública.

3.2. Objetivos específicos

Em amostras de animais silvestres:

- avaliar a significância da técnica de identificação de espécies por meio de pelos e desta maneira validar a técnica de identificação de animais oriundos tráfico através dos pelos;

- identificar as espécies através da técnica de DNA barcoding;
 - determinar a prevalência de *Trypanosoma cruzi* através da técnica de loop-mediated isothermal amplification.

CAPÍTULO 2

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

Normas aos autores disponível em:

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

ISSN 1935-2727

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

Tália Missen Tremori^{1,2*}, Pedro Fernández-Soto², María Belén Vicente², Antonio Muro Alvarez², Cintia Fridman Rave³, Julio López-Abán², Noeme Sousa Rocha¹

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

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

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

*email: talia_missen@hotmail.com

ABSTRACT

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

CAPÍTULO 3

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

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

ISSN 1617-1381

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

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

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

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

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

Sérvio TJ Reis, *Official Police and PhD*, FMVZ, UNESP, Brazil

Ana CF Pinto, *Prof Ass. Dr*, FMVZ, USP, Brazil

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

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

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

Abstract

Animal trafficking, smuggling and illegal trade comprise as the third most common illegal activity in the world. Biodiversity and environmental imbalance affects and increases the risk of extinction of several endangered species. The taxonomic identification of wildlife is a routine process of forensics expert. The aim of this research is to identify species from the wild fauna by mitochondrial

DNA. Were analyzed 17 samples from muscle and skin. A preserved region from mtDNA (600 base pair) was sequenced and compared to the Barcode of Life Database (BOLD) and Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in order to do the specie identification. The identification could be effective in most cases. Sometimes the quality of genetic samples affect the analysis and can make it difficult. This is one of the attributions of the veterinarian on animal expertise to help justice to reduce environmental crimes.

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

CAPÍTULO 4

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

Normas aos autores disponível em:

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

ISSN 2161-7597

HAIR ANALYSIS OF MAMMALS OF BRAZILIAN WILDLIFE FOR FORENSIC PURPOSES

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

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

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

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

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

*Email: talia_missen@hotmail.com

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

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

Received: **** *, **

Accepted: **** *, **

Published: **** *, **

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

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



Open Access

Abstract

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

Keywords

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

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Methods

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

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

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

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

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

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

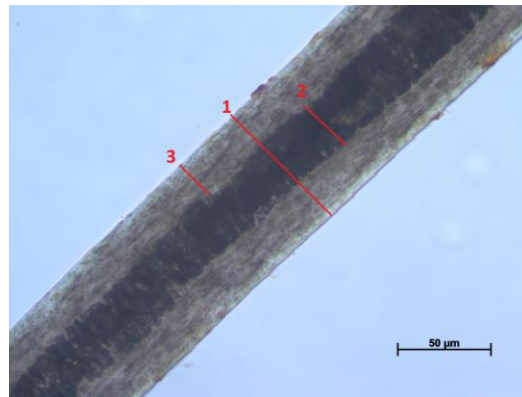


Figure 1. Optical microscopy hair of a brown howler monkey (*Alouatta guariba*). 1 - overall diameter; 2 – medulla diameter; 3 – cuticle overall distance diameter/medulla diameter. 400x.

3. Results

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

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

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

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

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

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

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

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

Species	Hair Length (cm)	Medulla Diameter (μm)	Overall Diameter (μm)	Ratio Overall Diameter/Medulla ^a
Brown Howler Monkey	4,0	28,369	72,057	2,540
Pampas deer	6,3	90,438	131,307	1,452
Forest Rabbit	3,0	39,084	79,035	2,022
Jaguar	0,7	57,714	82,342	1,427
White-eared Opossum	5,5	59,516	114,575	1,925
Cougar	2,3	26,625	47,814	1,796
Giant Anteater	3,0	82,989	251,595	3,032
Northern Tiger Cat	1,8	58,417	69,153	1,183782
Cutia	2,2	93,505	124,240	1,328699

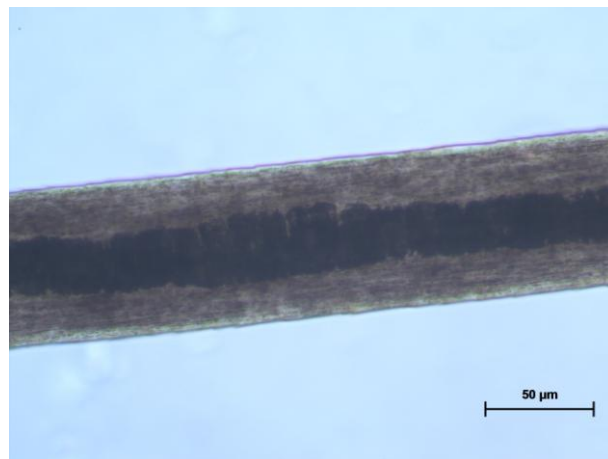


Figure 2. Optical microscopy of a brown howler monkey (*Alouatta guariba*) medulla hair. 400x.

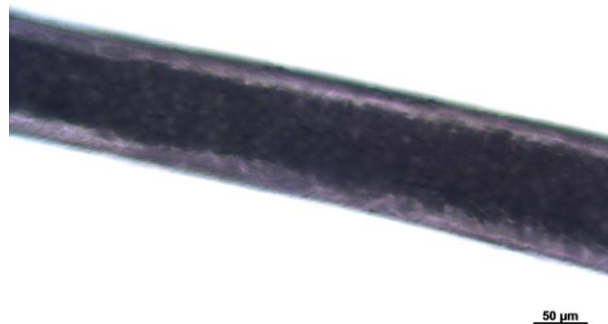


Figure 3. Optical microscopy of a Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) medulla hair. 200x.

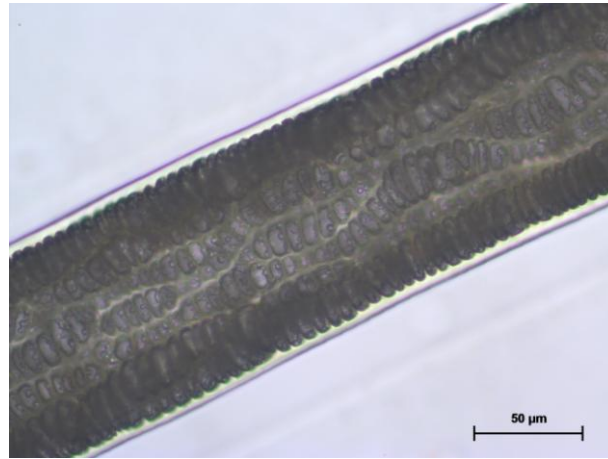


Figure 4. Optical microscopy of a forest rabbit (*Sylvilagus brasiliensis*) medulla hair. 400x.

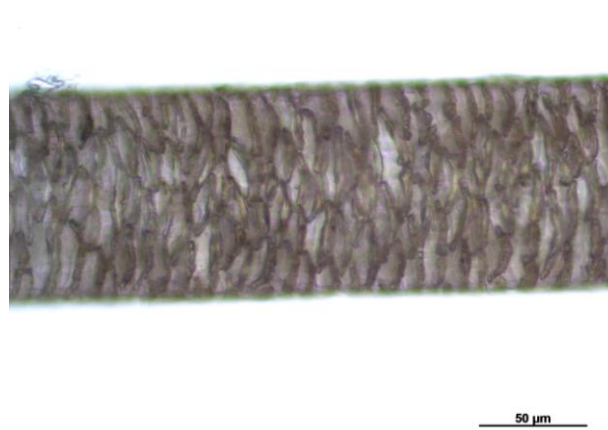


Figure 5. Optical microscopy of a forest rabbit (*Sylvilagus brasiliensis*) hair scales. 400x.

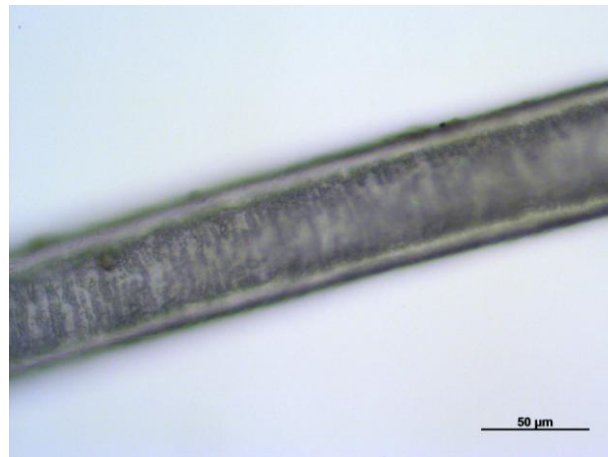


Figure 6. Optical microscopy of a Cougar (*Puma concolor*) medulla hair. 400x.

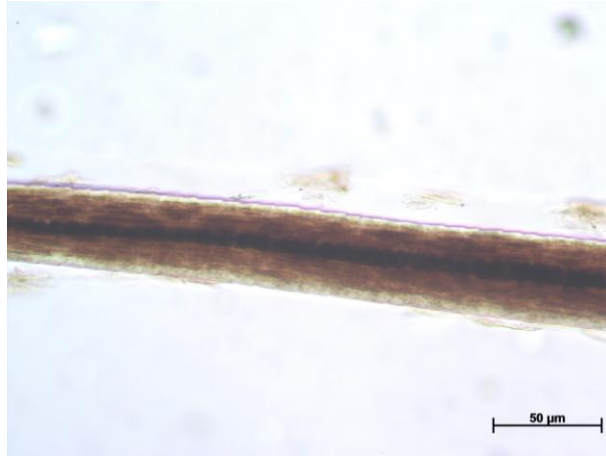


Figure 7. Optical microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) medulla hair. 400x.

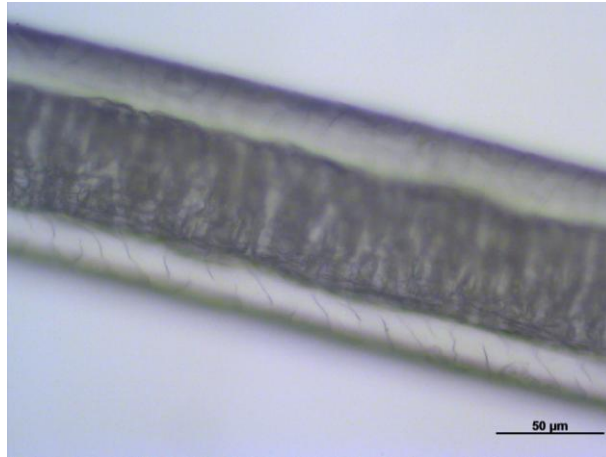


Figure 8. Optical microscopy of a White-eared Opossum (*Didelphis albiventris*) medulla and hair scales. 400x.

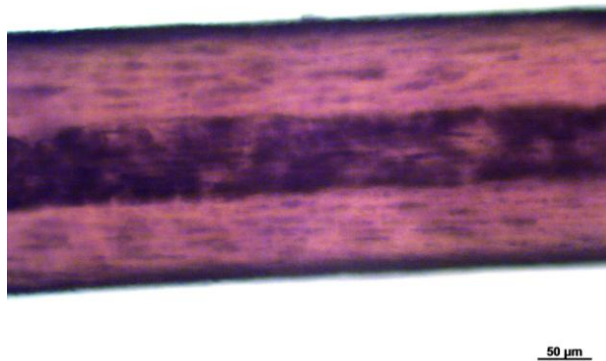


Figure 9. Optical microscopy of a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) medulla hair. 200x.

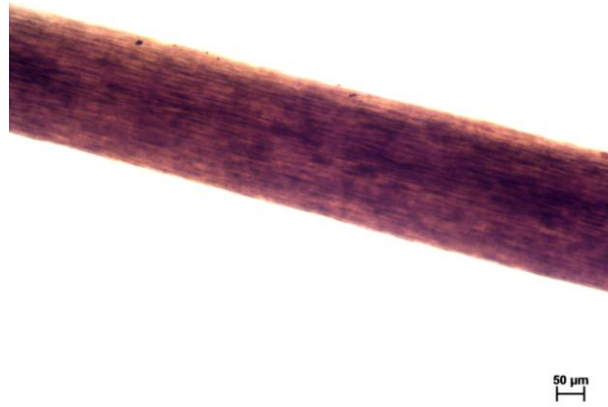


Figure 10. Optical microscopy of a Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) hair scales. 100x.

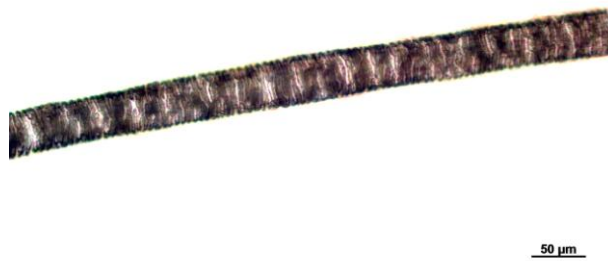


Figure 11. Optical microscopy banded hair of a Northern Tiger cat (*Leopardus tigrinus*), showing scales and pigment. 200x.



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



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



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

4. Discussion and Conclusion

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

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

References

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

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

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

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

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

1 **CAPÍTULO 5**

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

4 Normas aos autores disponível em:

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

6

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

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

9

10

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

13

14

15 **Tália Missen Tremori^{1,5*}, Mari Maki Siria Godoy Cardena², Bianca Picado**
 16 **Gonçalves³, Claire Gwinnet⁴, Julio López-Abán⁵, Cintia Fridman Rave², Noeme**
 17 **Sousa Rocha¹**

18

19

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

20

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

23

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

26

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

29

30 ⁵ Faculty of Pharmacy, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Av. Lco. Mendéz Nieto, s/n,
 31 37007, Salamanca, Spain.

32

33

32 **ABSTRACT**

Aims: To identify specie of one material from police apprehension by mitochondrial DNA and hair.
Presentation case: A preserved region from mtDNA was sequenced and compared to the DNA database (GenBank) in order to do the genetic identification. To hair analysis has been used optical microscopy in 100, 200 and 400x and photographs has been taken by the software “AxioVision”. To

* Tel.: +55 14 998277318

E-mail talia_missen@hotmail.com

measurements has been employed the program “Image J” and hair identification has been completed by compared analysis. The association between forensic genetic and trichology techniques could identify the *Panthera onca* with 100% similarity in this case

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

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

34

35

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

36

37

1. INTRODUCTION

38

39

40

41

42

43

44

45

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

46

47

48

49

50

51

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

52

53

54

55

56

57

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

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

58

59

60

61

62

63

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

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

64

65

66

67

68

69

70

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

71

72

73

74

75

76

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

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

2. PRESENTATION OF CASE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

137 138 **3. DISCUSSION**

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

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

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

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

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

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

167 168 **4. CONCLUSION**

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

174 175 **ACKNOWLEDGEMENTS**

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

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

184 **COMPETING INTERESTS**

185

186 Authors have declared that no competing interests exist.

187

188

189

190 **REFERENCES**

191

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

248

249

250

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

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

253 ^a forward; ^b reverse.

254

255

256

257

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

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

258

259

260

261

262

Table 03. Complete data from tissue DNA quantitation by Nanovue

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

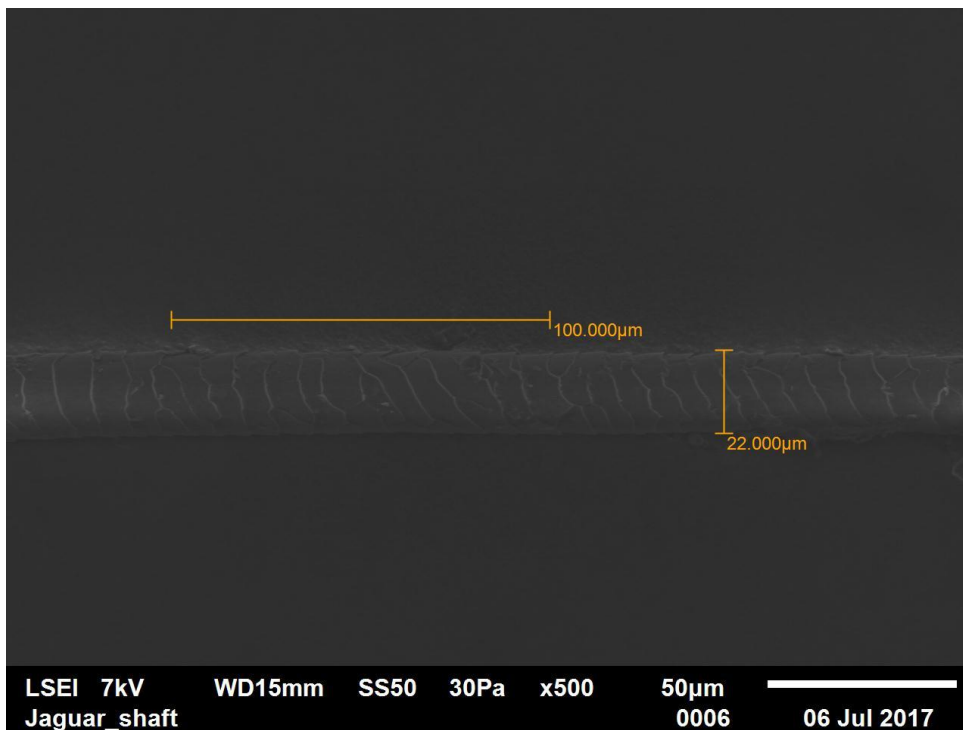
263

264
265
266

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

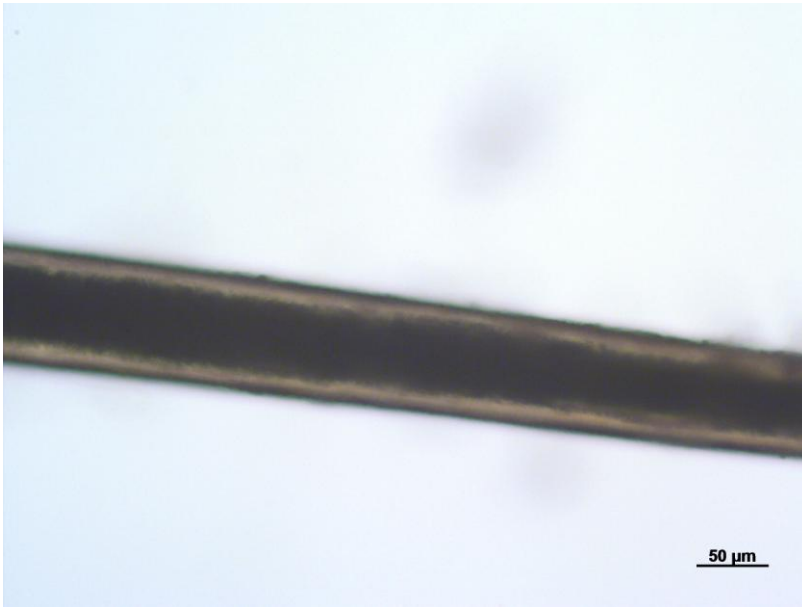
(A) <i>Panthera onca</i>
AAAATGAAAAGCGCGCCGCGAGCGCGACGCGGAAGAAGGCTCTAATTTCTCAACCGAA CTAACTGGGAAAAGGCAGCTATTAGGGGAGACAGATTTATAAGTAGAGGGGACCGCAAGCCT GTAATAATCTTCTTCATAGTGAGCCTATCATGATAGGAGGATACGGAAACTGATAGGTCCAAAA ACGATTGGGGCTCCCGACATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATGAGCTTCTGACTCCTCCCTC CATCTTTCTTACTTTTGGCTCGCATCATCTATGGTAGAGGCTGGAGCAGGGACTGGGTGGACAG TATACCCACCTCTAGCCGGTAACCTAGCTCATGCAGGGGCATCCGTAGATATAACTATTTTTTC ACTGCACCTGGCAGGTGTCTCCTCAATCCTAGGTGCTATTAATTTTATTACTACTATAATCAATA TAAAACCCCTGTTTATATCCCAATATCAAACACCCCTGTTTGTCTGATAGGTTTTAATCACTGC TGTATTACTACTTCTATCACTGCCCTCTTAGCACCACGCATCACTATACTACTGACAGATCGA AATCTAAACACCACATTTTTTTGACCCCGCCCGAGGAGGGGATCCTATCTCATATCAACACCT ATACTGATATTTTTGGCACTG 653bp
(B) <i>Panthera onca</i>
TATTAGAGGCACTGCCTGCCAGTGACATCAGTTAAACGGCCGCGGTATCCTGACCGT GCAAAGGTAGCATAATCATTGTTCCCTTAAATAGGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGGCTT TACTGTCTTACTTCCAATCCGTGAAATTGACCTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATATGACAATA AGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAACCGACCCAAAGAGATCTTGATAATCAACCGACA GGGATAACATACCTCTACCATGGGCCGACAATTTAGGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAACA ACCTCCGAGTGATTTAAATCTAGACTAACTAGTCGAAAGTACTACATCACTTATTGATCCAAAA CTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCCTATTTTAGAGTCCATATCGA CAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCCGATGGTGCAGCAGCTATCAAAGG TTCGTTTGTTCACGATTAAGTCCTACGTGATCT 540bp

267
268



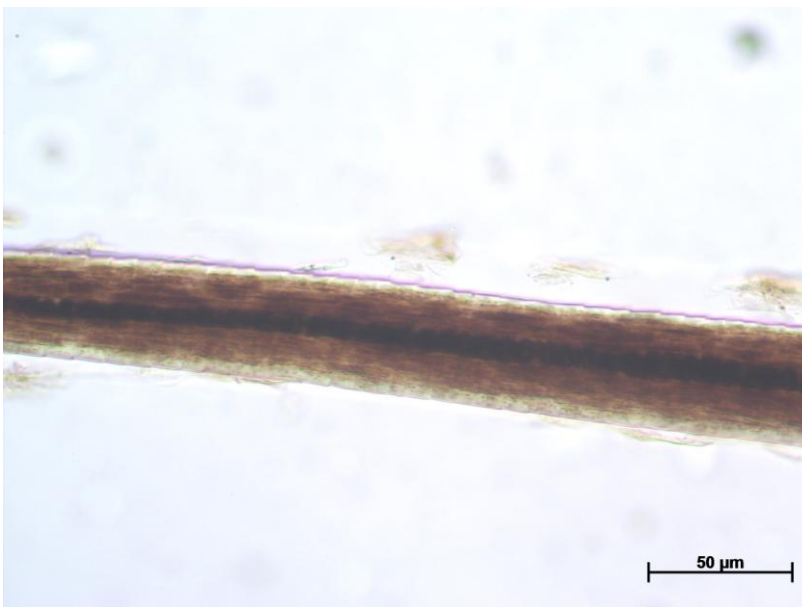
269
270
271
272

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



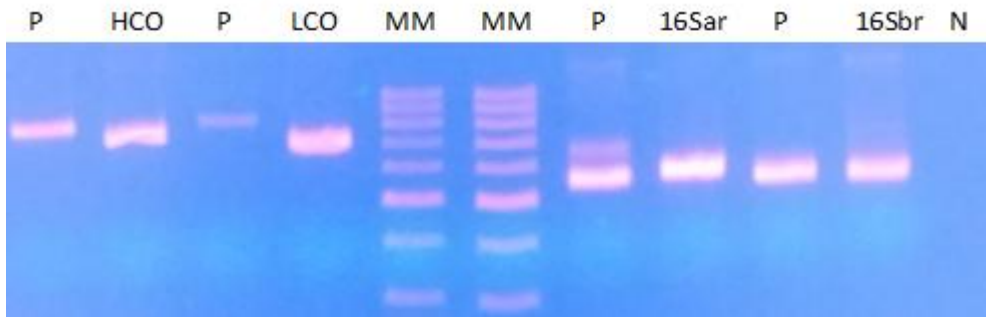
273
274 **Figure 02.** Optical microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) hair, showing medulla. (200x).
275 Intermediate trabecular fimbriated medulla pattern.

276
277
278

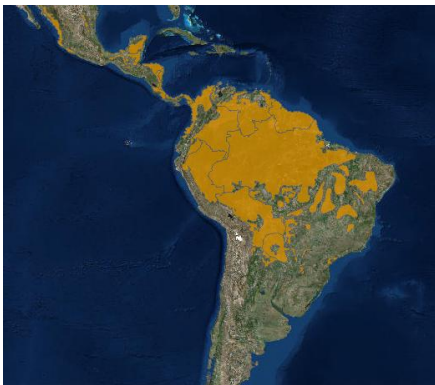


279
280 **Figure 03.** Optical microscopy of a Jaguar (*Panthera onca*) hair, showing medulla. (400x). Narrow
281 trabecular fimbriated medulla pattern.

282
283
284



285
286 **Figure 04:** PCR verification. P, positive control primer; HCO, LCO, 16Sar/16Sbr, sample analysis,
287 MM, molecular markers de 100pb; N, negative control.
288
289
290



291
292 **Figure 05:** Distribution of Jaguar (*Panthera onca*) on the world (13).
293
294

CAPÍTULO 6

1. DISCUSSÃO GERAL

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

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

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

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

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

É plausível a realização de mais estudos de morfologia dos pelos para certificar valores em mais espécies e em maior número de indivíduos. Seria de grande interesse também a medição de outros fatores dos pelos além dos relatados nesse estudo, para maior especificação e detalhamento do processo (SILVA, 2001; MIRANDA et al., 2014; TREMORI et al., 2014).

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

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

A positividade demonstrada no exame de LAMP para *Trypanosoma cruzi* nas amostras abre portas para mais estudos na área para identificação de hospedeiros, reservatórios e compreensão de como o parasito se comporta (GÜRTLER; CARDINAL, 2015; CEVALLOS et al., 2017; HODO et al., 2018). Além disso, torna-se relevante à implantação de conjuntos de políticas e normas operacionais rígidas para proteger os animais e também todo o contexto em que se inserem, ou seja, o meio ambiente, do qual faz parte também o ser humano. Trata-se de uma condição que permita prevenir, controlar, reduzir e/ou eliminar riscos inerentes às atividades que comprometam a saúde humana, animal e o meio ambiente, denominada saúde única (GOULD et al., 2013; CARDOSO et al., 2017).

A premissa por mais estudos futuros para determinar se a atividade ilícita (comércio ilegal de animais) pode estar relacionada com disseminação de enfermidades zoonóticas causadas por parasitas é necessária, visto os

resultados observados (ESCH; PETERSEN, 2013; VALLAT et al., 2013; TOMASSONE et al., 2018).

A utilização de análises de risco de doenças pode funcionar de maneira eficaz quando utiliza-se as tecnologias disponíveis e os conhecimentos científicos, porém é uma assunto muito amplo e com frequentes descobertas que tornam a pesquisa com animais silvestres um tema atual e sobretudo relevante (ESCH; PETERSEN, 2013; POLAK; SMITH-BLACKMORE, 2014; MERIGUETI et al., 2017).

2. CONCLUSÕES GERAIS

O estudo, sobretudo, demonstrou como é possível realizar a identificação dos animais oriundos de tráfico, contrabando e descaminho, e suas dificuldades para análises tricológicas e genéticas, devido principalmente a obtenção das amostras e recursos necessários, as técnicas devem adequar-se o máximo possível para facilitar a rotina dos profissionais da área e, conseqüentemente preservar a ameaçada fauna brasileira.

Os danos provocados pela caça ilegal, tráfico e contrabando de animais podem ser diretos e indiretos, possuem importante implicação ambiental através do levantamento de evidências genéticas forenses sobre a identificação de animais e análise de risco de doenças de caráter zoonótico causadas por parasitos.

3. CONCLUSIONES GENERALES

El estudio ha demostrado que se puede llevar a cabo la identificación de animales en ruta de tráfico, contrabando, aunque hayan dificultades para analices de pellos y también genéticas, la principal razón es la manera como se hace la obtención de las muestras y los recursos disponibles que se necesita. Las técnicas deben tener una mejor adecuación para ayudar los profesionales que trabajan con la amenazada fauna brasileña.

Los daños provocados por la caza ilegal, tráfico y contrabando de animales pueden ser directos o indirectos, tiene gran implicación en el medio ambiente con la recogida de evidencias genéticas forenses para identificación de animales y análisis de riesgo de enfermedades zoonóticas causadas por parásitos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ALACS, E. A.; GEORGES, A.; FITZSIMMONS, N. N.; ROBERTSON, J. DNA Detective: A Review of Molecular Approaches to Wildlife Forensics. **Forensic Science, Medicine, and Pathology**, v. 6, n. 3, p. 180–194, 2010.
- AN, J.; LEE, M. yeong; MIN, M. S.; LEE, M. H.; LEE, H. A Molecular Genetic Approach for Species Identification of Mammals and Sex Determination of Birds in a Forensic Case of Poaching from South Korea. **Forensic Science International**, v. 167, n. 1, p. 59–61, 2007.
- ASHFORD, R. W. When Is a Reservoir Not a Reservoir ? Invasive Mycobacterium Marinum Infections. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 11, p. 1495–1496, 2003.
- BELLIS, C.; ASHTON, K. J.; FRENEY, L.; BLAIR, B.; GRIFFITHS, L. R. A Molecular Genetic Approach for Forensic Animal Species Identification. **Forensic Science International**, v. 134, n. 2–3, p. 99–108, 2003.
- BESUSCHIO, S. A.; LLANO MURCIA, M.; BENATAR, A. F.; MONNERAT, S.; CRUZ MATA, I.; PICADO DE PUIG, A.; CURTO, M. de los Á.; KUBOTA, Y.; WEHRENDT, D. P.; PAVIA, P.; MORI, Y.; PUERTA, C.; NDUNG’U, J. M.; SCHIJMAN, A. G. Analytical Sensitivity and Specificity of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Kit Prototype for Detection of Trypanosoma Cruzi DNA in Human Blood Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2017.
- BONACCORSO, N. S. Aplicação Do Exame de Dna Na Elucidação De Crimes. **Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 1–193, 2005.
- BOSMALI, I.; GANOPOULOS, I.; MADESIS, P.; TSAFTARIS, A. Microsatellite and DNA-Barcode Regions Typing Combined with High Resolution Melting (HRM) Analysis for Food Forensic Uses: A Case Study on Lentils (*Lens Culinaris*). **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 141–147, 2012.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.013>>.
- BOUSINI, S.; ATHANASIOU, L. V.; SPANAKOS, G.; NTOUSI, D.; DOTSIKA, E.; BISIA, M.; PAPADOPOULOS, E. Phlebotomine Sandflies and Factors Associated with Their Abundance in the Leishmaniasis Endemic Area of Attiki, Greece. **Parasitology Research**, p. 1–7, 2017.

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

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

CARDOSO, S. D.; FARACO, C. B.; DE SOUSA, L.; DA GRAÇA PEREIRA, G. History and Evolution of the European Legislation on Welfare and Protection of Companion Animals. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 19, p. 64–68, 1 May 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1558787817300485>>.

Acesso em: 2 jun. 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DANDRIEUX, J. R. S.; SACCHINI, F.; HARMS, G.; GLOBOKAR, M.; BALZER,

H. J.; PANTCHEV, N. Canine Leishmania Infantum Infection: An Imported Case in UK after Staying in the Canary Islands. **Parasitology Research**, n. December 2011, p. 1–4, 2017.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FROSCH, C.; DUTSOV, A.; GEORGIEV, G.; NOWAK, C. Case Report of a Fatal Bear Attack Documented by Forensic Wildlife Genetics. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 4, p. 342–344, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.009>>.

GALETTI, M.; MOLEÓN, M.; JORDANO, P.; PIRES, M. M.; GUIMARÃES, P.

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

GARCIA DA COSTA FILHO, P. E. Medicina Legal e Criminalística. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 1, n. 1, p. 45, 2011. Disponível em: <<http://www.rbc.org.br/ojs/index.php/rbc/article/view/33>>.

GERDIN, J. A.; MCDONOUGH, S. P. Forensic Pathology of Companion Animal Abuse and Neglect. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 994–1006, 2013. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985813488895>>.

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

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

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

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

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

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

- HODO, C. L.; WILKERSON, G. K.; BIRKNER, E. C.; GRAY, S. B.; HAMER, S. A. Trypanosoma Cruzi Transmission Among Captive Nonhuman Primates, Wildlife, and Vectors. **EcoHealth**, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10393-018-1318-5>>.
- IMAI, K.; TARUMOTO, N.; AMO, K.; TAKAHASHI, M.; SAKAMOTO, N.; KOSAKA, A.; KATO, Y.; MIKITA, K.; SAKAI, J.; MURAKAMI, T.; SUZUKI, Y.; MAESAKI, S.; MAEDA, T. Non-Invasive Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis by the Direct Boil Loop-Mediated Isothermal Amplification Method and MinION™ Nanopore Sequencing. **Parasitology International**, v. 67, n. 1, p. 34–37, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.03.001>>.
- INTERPOL. **Environmental Compliance and Enforcement Committee Advisory Board - Impact Report 2015 - 2017**. [s.l: s.n.].
- IYENGAR, A. **Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review** **Journal for Nature Conservation**, 2014. .
- JOHNSON, R. N.; WILSON-WILDE, L.; LINACRE, A. Current and Future Directions of DNA in Wildlife Forensic Science. **Forensic Science International: Genetics**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.007>>.
- KAFADAR, S.; KAFADAR, H. The Medico-Legal Evaluation of Injuries from Falls in Pediatric Age Groups. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 31, p. 52–55, 1 Apr. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1752928X1500013X>>. Acesso em: 2 jun. 2018.
- KARAGIANNIS-VOULES, D. A.; SCHOLTE, R. G. C.; GUIMARÃES, L. H.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, 2013.
- KARSTEN, C. L.; WAGNER, D. C.; KASS, P. H.; HURLEY, K. F. An Observational Study of the Relationship between Capacity for Care as an Animal Shelter Management Model and Cat Health, Adoption and Death in Three Animal Shelters. **Veterinary Journal**, v. 227, n. August, p. 15–22, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.08.003>>.
- KHATUN, M.; ALAM, S. M. S.; KHAN, A. H.; HOSSAIN, M. A.; HAQ, J. A.; ALAM JILANI, M. S.; RAHMAN, M. T.; KARIM, M. M. Novel PCR Primers to

Diagnose Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood, Spleen or Bone Marrow Aspirates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 753–759, 1 Aug. 2017. Disponível em:

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

Acesso em: 11 jan. 2018.

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

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

L. B. L. TEZZA, S. T. J. REIS, C. F. M. MOLENTO, R. C. M. G. Situação Da Disciplina de Medicina Veterinária Legal Em Cursos de Graduação No Brasil.

Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, v. 15, n. 1, p. 81–81, 2017.

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

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

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

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

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

MORAITIS, K.; SPILIOPOULOU, C. Forensic Implications of Carnivore Scavenging on Human Remains Recovered from Outdoor Locations in Greece.

Journal of Forensic and Legal Medicine, v. 17, n. 6, p. 298–303, 1 Aug.

2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1752928X10000600>>.

Acesso em: 2 jun. 2018.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Accurate, and Cost-Effective Diagnostic Method for Infectious Diseases.

Journal of Infection and Chemotherapy, v. 15, n. 2, p. 62–69, 2009.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>>.

MUHAMMAD TAHIR, H.; AKHTAR, S. Services of DNA Barcoding in Different Fields. **Mitochondrial DNA**, 2015.

MUNRO, R.; MUNRO, H. M. C. Some Challenges in Forensic Veterinary Pathology: A Review. **Journal of Comparative Pathology**, v. 149, n. 1, p. 57–73, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.10.001>>.

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

NEWBERY, S. G.; COOKE, S. W.; MARTINEAU, H. M. A Perspective on Veterinary Forensic Pathology and Medicine in the United Kingdom. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 894–897, 2016.

NZELU, C. O.; GOMEZ, E. A.; CÁCERES, A. G.; SAKURAI, T.; MARTINI-ROBLES, L.; UEZATO, H.; MIMORI, T.; KATAKURA, K.; HASHIGUCHI, Y.; KATO, H. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Mass-Screening of Sand Flies for Leishmania Infection. **Acta Tropica**, v. 132, n. 1, p. 1–6, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.016>>.

OGDEN, R.; LINACRE, A. Wildlife Forensic Science: A Review of Genetic Geographic Origin Assignment. **Forensic Science International: Genetics**, v. 18, 2015.

PESAVENTO, P. A.; MURPHY, B. G. Common and Emerging Infectious Diseases in the Animal Shelter. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 478–491, 2014. Disponível em:

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

POLAK, K. C.; SMITH-BLACKMORE, M. Animal Shelters: Managing

- Heartworms in Resource-Scarce Environments. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 1–2, p. 78–82, 2014.
- POLLANEN, M. S. The Rise of Forensic Pathology in Human Medicine: Lessons for Veterinary Forensic Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 5, p. 878–879, 2016.
- POZEBON, D.; SCHEFFLER, G. L.; DRESSLER, V. L. Elemental Hair Analysis: A Review of Procedures and Applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 992, 2017.
- REIS, S. T. J.; LAVOR, L. M. S. de; SANT'ANA, L. V.; TREMORI, T. M.; GONZALEZ, V. A. T.; BRÜGGER, P. Retrospective Study of Expert Examination Performed by the Brazilian Federal Police in Investigations of Wildlife Crimes, 2013-2014. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 5, n. 2, p. 198–214, 2016.
- REPORT, M. W. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks—United States, 2006. **Annals of Emergency Medicine**, v. 55, n. 1, p. 47–49, 2010.
- Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196064409017119>>.
- RIBAS, L. M.; RITA, M.; MASSAD, R.; ROCHA, N. S. Necropsia Virtual Em Animais. 2016.
- SATO, H. Preliminary Study of Hair Form of Japanese Head Hairs Using Image Analysis. **Forensic Science International**, v. 131, n. 2–3, p. 202–208, 2003.
- SATO, I.; NAKAKI, S.; MURATA, K.; TAKESHITA, H.; MUKAI, T. Forensic Hair Analysis to Identify Animal Species on a Case of Pet Animal Abuse. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 3, p. 249–256, 2010.
- STAATS, M.; ARULANDHU, A. J.; GRAVENDEEL, B.; HOLST-JENSEN, A.; SCHOLTENS, I.; PEELEN, T.; PRINS, T. W.; KOK, E. **Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. .
- TOMASSONE, L.; BERRIATUA, E.; DE SOUSA, R.; DUSCHER, G. G.; MIHALCA, A. D.; SILAGHI, C.; SPRONG, H.; ZINTL, A. Neglected Vector-Borne Zoonoses in Europe: Into the Wild. **Veterinary Parasitology**, v. 251, n. December 2017, p. 17–26, 2018. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401717305307>>.
- TREMORI, T. M.; KAMIGUCHI, I. E.; FERRAZ DE CAMARGO DUARTE, B. W.;

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

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

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

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

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

VALLAT, B.; THIERMANN, A.; JEBARA, K. Ben; DEHOVE, A. Notification of Animal and Human Diseases : The Global Legal Basis OIE Notification System. **Revue scientifique et technique**, v. 32, n. 2, p. 331–335, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/M_Karim_Ben_Jebara/publication/260250450_Notification_of_animal_and_human_diseases_the_global_legal_basis/links/54e33dcd0cf2d618e1962c54.pdf%5Cnhttp://www.oie.int/doc/ged/D12775.PDF>.

VERMA, S.; SINGH, R.; SHARMA, V.; BUMB, R. A.; NEGI, N. S.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Development of a Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis and Assessment of Cure of Leishmania Infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 223, 2017. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2318-8>>.

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

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

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



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49607-2	Data da Emissão: 22/11/2016 14:30	Data para Revalidação*: 22/12/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tália Missen Tremori	CPF: 350.567.168-12
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL	
Nome da Instituição : FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	CNPJ: 48.031.918/0020-97

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de material	08/2015	08/2017
2	Processamento de material em laboratório	09/2015	09/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BOTUCATU	SP	FMVZ - UNESP - BOTUCATU	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Tamandua tetradactyla, Cavia aperea, Didelphis albiventris, Hydrochaeris hydrochaeris, Dasypus novemcinctus, Dasyprocta agouti, Tapirus terrestris, Agouti paca, Coendou prehensilis, Pecari tajacu, Nasua nasua, Myrmecophaga tridactyla, Sylvilagus brasiliensis

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Fragmento de tecido/órgão, Pêlo
---	----------------------------------	---------------------------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25925519





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49607-2	Data da Emissão: 22/11/2016 14:30	Data para Revalidação*: 22/12/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tália Missen Tremori	CPF: 350.567.168-12
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL	
Nome da Instituição : FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	CNPJ: 48.031.918/0020-97

2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fragmento de tecido/órgão, Pêlo
3	Amostras biológicas (Tamanduás)	Fragmento de tecido/órgão, Pêlo
4	Amostras biológicas (Tatus)	Fragmento de tecido/órgão, Pêlo
5	Método de marcação (Carnívoros)	Foto-identificação
6	Método de marcação (Outros mamíferos)	Foto-identificação
7	Método de marcação (Tamanduás)	Foto-identificação
8	Método de marcação (Tatus)	Foto-identificação

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 49607-2	Data da Emissão: 22/11/2016 14:30	Data para Revalidação*: 22/12/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Tália Missen Tremori	CPF: 350.567.168-12
Título do Projeto: IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE POR DNA MITOCONDRIAL	
Nome da Instituição : FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	CNPJ: 48.031.918/0020-97

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 25925519

