

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO CRIMINAL DE ESPÉCIES DA FAUNA SILVESTRE POR DNA
MITOCONDRIAL**

Identificación forense de especies de fauna silvestre a partir de DNA mitocondrial

Resumen de tesis doctoral en régimen de cotutela:

Universidade Estadual Paulista, Brasil y Universidad de Salamanca, España

TÁLIA MISSEN TREMORI

Tesis presentada en el Programa de postgrado de Medicina Veterinária e el Programa de “Salud y Desarrollo en los Trópicos” para la obtención del título de Doctor en régimen de cotutela con la Universidad de Salamanca, España

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Noeme Sousa Rocha
FMVZ – UNESP – Botucatu
Orientador: Prof. Dr. Julio López-Abán
Facultad de Farmacia – USAL - Salamanca
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Cintia Fridman
Coorientador: Prof. Dr. Pedro Fernández Soto

2 junio 2018

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

El comercio internacional de animales silvestre tiene crecimiento todos los años, la *International Policing Organization* (INTERPOL), organización internacional de policía, con 190 países miembros, de la cual hace parte Brasil, ha declarado que el tráfico de animales ocupa en una posición que trae preocupación, detrás solo de tráfico de drogas, armas y personas. Los principales países financiadores son la Unión Europea (EU), Estados Unidos y Emiratos Árabes y Japón. El comercio ilegal, tráfico y contrabando son actividades ilegales que afectan de manera directa e indirecta la fauna silvestre brasileña. Es posible percibir el efecto nocivo de la actividad por el número de especies añadidos en la relación oficial de animales de fauna silvestre amenazados de extinción. La conservación de las especies también tiene relación con el síndrome “bosque vacío”, ya que los gran vertebrados frugívoros actúan haciendo la difusión de semillas en una interacción llamada planta-difusor la cual hace contribución indirecta para al mantenimiento, regeneración y preservación de los espacios naturales nacionales.

Para la verificación del nivel de amenaza de extinción de una especie, se puede consultar la relación nacional de especie de la fauna brasileña amenazada de extinción del Ministerio del Medio Ambiente (MMA, Brasil)”, y los anexos de la convención del Comercio Internacional de Especies de la Flora y Fauna Silvestre en Peligro de Extinción (CITES “*Convention on the International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora*”) y la “Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales” (IUCN *Red List “International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*”).

La vasta extensión, su exploración desordenada, a demás de la falta de fiscalización en las fronteras del territorio brasileño son las principales razones del problema. Una manera de percibir el efecto es que en los últimos diez años ha elevado 75% de la fauna silvestre amenazada en Brasil. Los casos sospechosos de animales victimas de tráfico deben ser investigados. La identificación tiene mucha importancia y la identificación taxonómica es una actividad de rutina para los peritos criminales en veterinaria. La mayoría de las técnicas utilizan foto documentación, morfología, genética y también del pelo. El tráfico animal también puede ser un medio de difusión de enfermedades zoonoticas. La detección rápida de enfermedades requiere participación de profesionales envueltos directo y indirecto con la salud pública y ciencias forenses aplicándoselas a fauna.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Biodiversidad

Brasil es un país de gran importancia para la biodiversidad mundial, tiene 658 especies de mamíferos y aproximadamente 10% son amenazadas de extinción (REIS et al., 2016). La pérdida de la biodiversidad es uno de los mayores peligros para la sociedad actual, de hecho, en la Constitución Federal Brasileña del 1988 en su artículo 225 donde dije que el medio ambiente ecológicamente en equilibrio es un derecho de todos. Aproximadamente 82 especies de mamíferos se encuentran en peligro de extinción en Brasil (INTERPOL, 2017). Brasil alberga a más del 13% de la biota mundial, siendo reconocido mundialmente como un país que tiene mega diversidad, muestra diferentes biotas complejos por toda su extensión geográfica. La biota Amazónica en su mayor parte, región responsable por mantener la estabilidad ambiental del planeta, a través de la fijación de 1 billón de toneladas de carbono por año, amplitud de recursos naturales y diversidad biológica (DASZAK, 2008; GALETTI et al., 2017). Las amenazas provocadas por el efecto de la actividad humana por las actividades agropecuarias, deforestación, caza y pesca predatoria, tráfico y contrabando de animales, invasiones biológicas y actividades de minería generan una preocupación adicional con la conservación y mantenimiento de la biodiversidad brasileña (AN et al., 2007; OGDEN; LINACRE, 2015). Instituciones como el “Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis” (IBAMA) y el “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade” (ICMBio), han sido creados con el objetivo de hacer operaciones de fiscalización, pues las actividades de degradación del medio ambiente son delitos de acuerdo con la Ley 9.605/98, Brasil – “Lei de Crimes Ambientais” – que dispone penas para aquellos que cometen infracciones ligadas con la fauna y flora en Brasil (GALETTI et al., 2017).

2.2. Salud Pública

La salud humana y animal están interrelacionada, las enfermedades infecciosas emergentes o reemergentes son un ejemplo, por la distribución geográfica, medio ambiente, exposiciones o modificaciones genéticas, la política, la economía, adaptación de los microorganismos y otros factores más (VALLAT et al., 2013; GALETTI et al., 2017).

Estudios muestran que 70% de las enfermedades en hombres son zoonóticas, lo que crea un escenario complejo, ya que muchas pueden tener su fisiopatología y epidemiología

desconocidas, principalmente cuando hablamos de las enfermedades donde los animales silvestres tienen participación en el ciclo (MEAD et al., 1999; GÜRTLER; CARDINAL, 2015). Por ejemplo, la enfermedad de Chagas (causada por el *Trypanosoma cruzi*), donde pequeños roedores, zorros, capibaras, “quatis”, entre otros animales son importantes hospedadores del protozoo (LOURENÇO et al., 2018). Las mismas especies también pueden ser reservorio del causante de la Leishmaniosis (*Leishmania spp.*), importante zoonosis que tiene ciclo silvestre y urbano. Otra situación son los armadillos infectados por *Mycobacterium leprae*, un riesgo para la lepra en seres humanos (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013; DANDRIEUX et al., 2017).

A través de las técnicas moleculares se puede hacer el diagnóstico de enfermedades zoonóticas en animales silvestres, una cosa pertinente, se considera que gran parte de los animales pueden ser reservorios de enfermedades de importancia para la salud pública. (ASHFORD, 2003; DASZAK, 2008; FAO; WHO, 2014; PESAVENTO; MURPHY, 2014; DE SOUZA GODOI et al., 2017).

Los vectores de enfermedades humanas y reservorios representan una amenaza permanente, puesto que las zoonosis son muy difíciles de ser controladas. Las enfermedades infecciosas son amenazas no solo para el hombre, pero también para la fauna y la flora que hacen parte de la biodiversidad mundial. La detección rápida de patógenos requiere la participación de todos los relacionados con la salud pública (BOUTSINI et al., 2017; TOMASSONE et al., 2018).

2.3. Legislación

La Constitución Federal Brasileña del 1988, en su Artículo 225, § 1º, parte VII, tutela la fauna cuando se prohíbe prácticas que traen riesgo para su función ecológica, que pueden provocar la extinción de especies o someter animales a crueldad. Sin embargo, ha sido promulgada la Ley de los Delitos Ambientales, Ley nº 9.605, de febrero de 1998. La cual dispone de especificaciones y sanciones penales y administrativas para conductas y actividades que dañan el medio ambiente.

De acuerdo con la Ley de Delitos Ambientales 9.605/98 en su artículo 29; matar, perseguir, cazar, atrapar, utilizar especies de la fauna silvestre, nativos o en ruta migratoria, sin la adecuada permisión, licencia o autorización de autoridad, es un delito y tiene como pena detención de seis meses a un año, además de multa.

En la misma sección, en el artículo 32, practicar actos de abuso, malos tratos, herir o mutilar animales silvestres, domésticos o domesticados, nativos o exóticos, tiene como pena detención de tres meses a un año y multa. Por lo tanto, la legislación brasileña quiere impedir el comercio ilegal, caza ilegal y malos tratos, y también otros delitos que afectan la biodiversidad mundial.

El artículo quinto de la Ley brasileña 5.517, del 23 de octubre de 1968 que dispone de la actuación del Médico Veterinario, refiere que “es competencia privada legal la peritaje en animales, identificación, defectos, vicios, enfermedades, accidentes y exámenes técnicos en cuestiones judiciales; pericias, exámenes e investigaciones reveladores de pesquisas reveladoras de fraudes o operaciones con o delitos dolosos en animales inscriptos en competición deportiva o exposiciones de ganadería; pericias con propósitos administrativos, de seguro; y exámenes toxicológicos y sanitarios en productos industriales de orígenes animales”.

2.4. Prueba pericial Veterinaria

Elucidación de delitos que involucran animales es un tema relevante para la sociedad, tanto por el punto de vista de la ética como también por la justicia (TREMORI; ROCHA, 2013).

Las pruebas periciales en animales son hechas para identificar especie, diagnosticar lesiones, verificar sustancias como ejemplo espermatozoides, sangre, saliva (POLLANEN, 2016). Las aprehensiones de tráfico y contrabando de animales son comunes en Brasil y la identificación de las especies deben ser hechas por un perito. Las prácticas criminales implican en diferentes maneras de malos tratos a los animales, empezando por su captura, transporte, comercialización, hasta el mantenimiento en cautiverio, provocando lesiones que en muchas situaciones son fatales, en estos casos, un 90% de los animales víctimas de tráfico no van sobrevivir (FERNANDA; HERNANDEZ, ; TÚLIO et al., 2016).

La prueba pericial tiene su consolidación por medio de informes, que son documentos escritos, teniendo por base el material examinado. La finalización del informe es de total responsabilidad de los peritos que lo firman. En todas las etapas de la pericia es esencial garantizar la cadena de custodia, o sea, preservar la cronología de las pruebas de manera que puedan ser rastreadas para asegurar el valor probatorio de la prueba pericial (GARCIA DA COSTA FILHO, 2011).

Un perito puede ser oficial, tener su designación hecha por juez (perito judicial), o aún con la denominación de asistente técnico (cuando hace prestación de servicios para una de las partes interesadas en el proceso) (GARCIA DA COSTA FILHO, 2011). La pericia puede ser hecha de manera directa o indirecta y, de acuerdo con el artículo 158 del Código de Proceso Penal (CPP) brasileño, cuando en la infracción quedan vestigios es indispensable la realización del examen del cuerpo de delito, y no se puede suprimir la confesión del acusado. Un profesional con capacitación puede actuar en distintas áreas periciales en la medicina veterinaria, por ejemplo: evolución y evaluación de ganado, evaluación de animales y sus rentas, valoración económica, diagnóstico de lesiones, identificación de animales, de fraudes, costes de producción, identificación de productos y subproductos de origen animal, exámenes forenses veterinarios, determinación de impericia, imprudencia y omisión, bestialismo y zoofilia, intoxicación y envenenamientos, valoración económica en animales exóticos, transporte nacional y internacional de animales, productos de origen animal y medicamentos de uso animal (COOPER, 1998; MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; NEWBERY; COOKE; MARTINEAU, 2016).

La anamnesis es esencial para sospechas de la causa de lesiones o de circunstancias en un caso, situaciones como el transporte, pueden tener gran influencia, por lo tanto el cuidado debe ser todavía más grande en casos donde la historia es pobre. La policía, el veterinario, el tutor, instituciones protectoras o también testimonias pueden ayudar con el histórico del animal, y con el examen indirecto, donde se necesita la prueba testimonial (MUNRO; MUNRO, 2013).

La finalidad del perito en el lugar del delito es hacer el levantamiento de vestigios del cuerpo de delito, haciendo un estudio sistemático. Evaluar el tiempo transcurrido desde el óbito, por estudios de las alteraciones *post mortem*; observar, describir, recoger y materializar vestigios, fotografiar y dibujar; son principios de la investigación criminal para llegar a una conclusión con comprobación científica del informe pericial (MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; TREMORI et al., 2017).

2.5. Medicina Legal Comparada

La Medicina Legal se constituye con el uso de los conocimientos médicos para el cumplimiento de la leyes, por lo tanto es una intersección del derecho y la medicina (BONACCORSO, 2005; GARCIA DA COSTA FILHO, 2011). Para el concepto de Medicina Legal Comparada se hace una extrapolación de muchos conceptos, métodos y

patrones de la Medicina Legal Humana. La aplicación de métodos similares, con adaptaciones pueden adecuarse al contextualización de la Veterinaria y es muy contributiva para la elucidación de delitos con relación a los animales, por ejemplo, el empleo de los conceptos de traumatología forense, entomología forense, toxicología forense, y otros más (MORAITIS; SPILIOPOULOU, 2010; GERDIN; MCDONOUGH, 2013; KAFADAR; KAFADAR, 2015).

El uso de terminologías y nombres semejantes hace más fácil comprender informes, ya que estos van a ser enviados a autoridades que están acostumbradas con una rutina de casos de delitos relacionaodos con seres humanos; y los casos con animales, aunque crecientes, son menos habituales de ser abordados por la justicia (TREMORI; ROCHA, 2013).

El aumento de la notificación de delitos donde haya animales ha transformado la Medicina Forense Veterinaria en una especialidad creciente, por consiguiente es fundamental la existencia de profesionales con capacidad para actuar en esta área. La Veterinaria, ha ganado espacio desde el final del siglo XX en Brasil, cuando hubo la introducción de la disciplina de Medicina Veterinaria Legal en las carreras, la UNESP – Campus de Botucatu, fue la primera institución que impartía la disciplina para los alumnos de grado. A partir de entonces se ha notado una crecente incidencia de pericias en delitos en los que los animales aparecen como afectados (RIBAS et al., 2016; L. B. L. TEZZA, S. T. J. REIS, C. F. M. MOLENTO, 2017).

La Veterinaria Forense actúa en muchos asuntos, como por ejemplo: protección animal, área de conservación del medio ambiente, combate del contrabando, tráfico ilegal de animales, verificación del valor económico, bestialismo, transporte, identidad y identificación, bienestar animal y también productos de origen animal (COOPER, 1998; MUNRO; MUNRO, 2013)

Debe destacarse que muchos delitos contra los animales no son notificados, por esta razón la incidencia de víctimas de malos tratos debe ser muchos más grande que la incidencia generalmente descrita en delegaciones y clínicas veterinarias y en la mayoría de los casos relatados son originarios de regiones menos favorecidas y propietarios de clase social baja. (TREMORI; ROCHA, 2013).

El veterinario debe estar preparado para tratar casos de diferentes categorías: delitos de crueldad contra los animales, bienestar animal, comercio ilegal, o situaciones en que si requiere una recompensa. Los requisitos pueden variar de acuerdo con el caso y haber diferencias conforme la autoridad que solicitó el examen. Verificar si una muerte

sospechosa se trata de un proceso criminal o no es una gran responsabilidad del forense que irá a realizar la necropsia del cadáver (MCDONOUGH; MCEWEN, 2016; KARSTEN et al., 2017)

La realización de la necropsia es muy importante y tiene el papel fundamenta en la conclusión del proceso principal y causa de la muerte del animal. En este momento también se debe recoger muestras para exámenes complementares como histología y toxicología. Siempre se debe aprovechar para hacer análisis con atención del contenido estomacal e intestinal, observación de la coloración y presencia de plantas, cápsulas, comprimidos, cuerpos extraños, entre otros (COOPER, 1998; MUNRO; MUNRO, 2013)

Una descripción con detalles de las lesiones macroscópicas y el registro fotográfico son obligatorios. La necropsia debe tener infografía, pues es un documento de interés médico legal que luego va acompañar todo el proceso judicial (GERDIN; MCDONOUGH, 2013).

Aún así, actualmente hay aproximadamente tres millones de animales abandonados en Brasil, en este modo los delitos de malos tratos cada vez es mayor, si bien la conciencia de los derechos crece debido al concepto de bien estar animal en todo el mundo, conservación del medio ambiente, la lucha contra la delincuencia y tráfico, legislación y sanidad en relación con los productos de origen animal, así es progresivamente necesaria la ciencia forense veterinaria (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

Teniendo en cuenta que el artículo 334 del Código Penal (CP) brasileño y los artículos 29, 30 y 31 de la Ley 9505/1995, si hace necesario conceptuar sus diferencias. En este tema se comprende por tráfico la práctica habitual de entrada y salida de alguna cosa, por comercio ilegal de productos, personas o animales. Ya el contrabando si refiere a entrada de un producto falso o original en un país (REIS et al., 2016). Con el aumento del número de especies en extinción, el efecto es adverso: al revés de reducir el tráfico, la busca por especies es más grande por su escases, aumentando consecuentemente el lucro con esta práctica (IYENGAR, 2014; TÚLIO et al., 2017). Cuando las instituciones internacionales definieron a través de la *IUCN Red List*, criterios para evaluar el riesgo de extinción de todas las especies del mundo. Para ofrecer informaciones con base científica sobre el estado de las especies y subespecies a nivel global, utilizando la zoobiología para

establecer criterios que puedan identificar una especie, inclusive otras particularidades de forma de decir con seguridad que se trata de determinado animal y todos los de su clase e influir la decisión política nacional y internacional para tomas de decisión de conservación de la diversidad biológica (MIRANDA; RODRIGUES; PAGLIA, 2014; STAATS et al., 2016; GALETTI et al., 2017).

La explotación desordenada de especies en su hábitat tiene graves consecuencias, que pueden terminar con el peor, la extinción, lo que provoca el desequilibrio ambiental que afecta todo el ecosistema terrestre y representa una amenaza para la conservación de la naturaleza (ALACS et al., 2010; MUNRO; MUNRO, 2013).

2.7. Identificación

Identidad es el conjunto de características que permiten la individualización de una persona, animal o cosa, para que sea distinto de los demás. Identificación es el proceso donde se puede permitir la identidad. Son etapas fundamentales y muy comunes en exámenes periciales en crímenes contra fauna. Es importante que la identificación siga los criterios de unidad, inmutabilidad, perpetuidad, viabilidad y clasificabilidad para que sea sencilla, fiable y económica (SATO et al., 2010; GARCIA DA COSTA FILHO, 2011).

Las técnicas actuales incluyen el uso de la foto documentación, morfología, genética forense y también la identificación a partir de pelo. La manera más utilizada a lo largo de los años ha sido por la morfología, con utilización de la anatomía comparada (BOSMALI et al., 2012).

Sin embargo, es normal en aprehensiones la obtención solamente de fragmentos no identificados. En estos casos es posible realizar técnicas moleculares siendo este un modo seguro de determinar la identificación del material (ALACS et al., 2010; KHEDKAR et al., 2014). Otro método sencillo y rápido es la identificación por tricología (examen del pelo), ya que estudios de comparativos muestran ser técnicas bastante viables (SATO, 2003; POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

La realización del examen no es fácil, pues hay situaciones donde las muestras son inadecuadas y insuficientes para algunos exámenes. Con la inversión de nuevas técnicas de identificación de especies y crecimiento de estudios en taxonomía el número de casos exitosos se tiende a ser cada día más grande (AN et al., 2007; FERRI et al., 2009).

2.8. Genética Forense

A través de la genética forense, considerada el “patrón de oro” para evidenciar productos y subproductos de la fauna silvestre es posible determinar los materiales sospechosos, su origen, además de la epidemiología en los casos que envuelven animales. El análisis de ADN (ácido desoxirribonucleico) aplicado a la fauna viene desarrollando junto con la genética forense humana y extrapolación de técnicas moleculares y estadísticas, mientras tanto sigue siendo una área muy especializada con los desafíos y avances suyos, ya que necesita recursos tanto personal como estructural (BELLIS et al., 2003; JOHNSON; WILSON-WILDE; LINACRE, 2014).

Tecnologías de genética molecular son adecuadas para la detección y recogida de pruebas en investigaciones de delitos, estas técnicas son de gran utilidad para casos de comercio ilegal de especies silvestres. De todos los métodos disponibles, muchos aún no tienen aplicación forense, pero las investigaciones tienen como objetivo avanzar e mantener la utilización en estos casos. Para la realización de pruebas genéticas fiables es necesario establecer dentro del laboratorio estrictos patrones de calidad, como la calibración periódica de los equipos, recogida adecuada de muestras, garantizar la cadena de custodia y reducir al mínimo la posibilidad de cambios accidentales o dolosos de muestras (ALACS et al., 2010; MWALE et al., 2017).

La colaboración de científicos forenses con genetistas de conservación con y veterinarios para el desarrollo de programas de investigación en filogenia, filogeografía y genética de poblaciones conjuntamente contribuyen a la conservación y gestión de las especies comercializadas y puede proveer base científica para el desarrollo de métodos forenses para la reglamentación y control policial del comercio de especies silvestres. Por ejemplo, la determinación de origen taxonómico de animales puede ser alcanzado por métodos moleculares, una cosa poco viable cuando se hace la identificación solo por la morfología (BELLIS et al., 2003; ALACS et al., 2010; OGDEN; LINACRE, 2015).

Análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico) tienen relación con la identificación de pruebas para determinación la especie (taxonomía molecular), población, relación o identificación individual de una muestra. Ese tema se ha desarrollado en paralelo con la ciencia forense humana y se ha beneficiado de la extrapolación de técnicas moleculares y estadísticas entretanto permanece un área altamente especializada, con sus propios desafíos y avances (JOHNSON et al., 2014).

Una de las etapas fundamentales de la genética forense es la recogida de muestras, que pueden incluir cualquier trozo de tejido, sangre, pelos, cuernos, plumas, musculo, huesos, heces, canales entre otros. Productos industrializados, resultantes del proceso con animales también pueden ser material para análisis. A través de ellas se pueden respondidas preguntas relacionadas con la determinación de la especie, origen de la muestra, si la muestra es silvestre o doméstica entre otras (COOPER, 1998; WOODALL et al., 2015).

De las técnicas de genética molecular para el uso forense si puede utilizar ADN o el ácido ribonucleico (ARN). El ADN si puede dividir en genómico ADN (nDNA) y el mitocondrial ADN (mtDNA), la mayoría de técnicas pueden ser utilizadas en los dos tipos de ADN, como la secuenciación de nucleótidos. En esta técnica se hace la identificación de cada nucleótido en una región diana del ADN. Identificación de especies en general se necesita secuenciación de 50 pares de bases (bp) de ADN para probar una secuencia especie específica. (BELLIS et al., 2003; WAN; FANG, 2003; AN et al., 2007; JOHNSON; WILSON-WILDE; LINACRE, 2014).

Otra técnica conocida son los marcadores *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), esto hace posible el estudio de dianas específicas y pequeñas del ADN. Así, facilitan el desarrollo de ensayos más rápidos y económicos, que no requieren fragmentos largos de ADN en buena calidad, pero son obtenidas menos informaciones si comparas con la secuenciación del ADN completo (SATO et al., 2010).

Marcadores moleculares llamados microsatelites también tienen gran aplicación forense para identificación. Son diferencias entre secuencias del ADN por una variación en el número de bases que se repiten del ADN en una región específica. Los cambios de bases llevan a distintos tamaños de fragmentos de ADN que pueden ser separados por electroforesis y después la comparación y interpretación (BOSMALI et al., 2012).

2.9. Identificación por ADN mitocondrial

Muchas veces el mtDNA puede ser favorable en relación al nDNA para identificación de especies. Una de las ventajas es la facilidad de obtenerlo en tejidos procesados y deteriorados, por motivo de su forma circular y tamaño más pequeño, esto permite que sea más resistible a degradación, muy común en situaciones forenses (HAJIBABAEI et al., 2006). Esto pasa pues el mtDNA se encuentra en multiplicidad en

una célula, si comparas con el nDNA que está en una sola copia por célula (CARMO, 2011; KHEDKAR et al., 2014; MUHAMMAD TAHIR; AKHTAR, 2015)

La región del mtDNA llamada, Citocromo b, ha sido utilizada hace mucho tiempo en estudios de biología de evolución en animales. Además es una técnica que se puede aplicar para diagnóstico de enfermedades genéticas que pueden presentarse en las mitocondrias (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; DAWNAY et al., 2007).

En los casos de identificación los marcadores universales son sencillos, pues los cebadores (*primers*) son más pequeños, y la secuenciación de una región del gene de codificación puede ser suficiente para la identificación. Con base en estos principios ha surgido en principios del siglo XXI el proyecto DNA *barcoding*, donde a través de la secuenciación de una región llamada citocromo oxidase I (COI) del mtDNA, con aproximadamente 650 bp, fue fundado el banco de datos *Barcode of Life Database* (BOLD). La identificación de especies ocurre por comparación directa, rápido, online y accesible (HEBERT et al., 2003; HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; FRÉZAL; LEBLOIS, 2008; YANCY et al., 2009).

Por lo tanto, el DNA *barcoding* ha vuelto una propuesta eficiente, barata y rápida para la identificación de especies. Con objetivo de catalogar la biodiversidad del planeta. Las desventajas son que es un método con baja sensibilidad para identificación de especies muy próximas en nivel genético, donde es necesaria la secuenciación de una diana más larga. También el mtDNA tiene ascendencia materna, y dificulta la investigación donde se requiere la paternidad (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

La amplificación del ADN es uno de los principales métodos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Examen como el *Polimerase Chain Reaction* (PCR) ha sido muy utilizado para ayudar en el reconocimiento de estas enfermedades (DA COSTA LIMA et al., 2018).

El diagnóstico de zoonosis en animales silvestres es esencial, se tiene en cuenta que muchos de los animales pueden ser reservorios de patógenos importantes para la salud pública (REPORT, 2010; VALLAT et al., 2013).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) es una técnica molecular que fue desarrollada y tiene gran sensibilidad, hace la amplificación de muchas copias del ADN en una hora y una concentración muy pequeña como 0,5ng/μl, en condiciones isoterma se puede obtener positividad (BESUSCHIO et al., 2017; CEVALLOS et al., 2017).

Diferente de otras técnicas moleculares, LAMP no necesita una estructura específica que va a detener la realización en la rutina en clínicas o a campo, no hay restricción para que sea hecho solo en laboratorios (NZELU et al., 2014; CEVALLOS et al., 2017; VERMA et al., 2017).

La técnica LAMP utiliza cebadores (*primers*) y se lleva a cabo en dos etapas, lo que hace que sea específico en relación a su diana. Así es tiene menos influencia por la presencia de un ADN que no sea importante para el diagnóstico, reduciendo la posibilidad de un resultado falso positivo. Después de la amplificación hay secuencias que tienen repeticiones al revés del ADN diana en la misma cadena lo que permite una identificación rápida y sencilla después de una revelación colorimétrica. Otra ventaja del ensayo LAMP es porque no se restringe solo al ADN, pero si puede utilizar también en cadenas de ARN juntamente con transcritos y la polimerasa. Es un método sensible, rentable, y práctico y puede ser aplicable en muestras de tráfico de animales (MORI; NOTOMI, 2009; BESUSCHIO et al., 2017; IMAI et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Expandir los estudios en el área de la Medicina Forense Veterinaria con relación al tráfico, contrabando de animales y su implicación en Salud Pública.

3.2. Objetivos específicos

En muestras de animales silvestres:

- Evaluar el significado de la técnica de identificación de especies por medio de pelo y validar la técnica de identificación de animales procedentes de tráfico a través de pelo;
- Identificar las especies a través de la técnica del DNA *barcoding*;
- Determinar la prevalencia de *Trypanosoma cruzi* por la técnica loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

CAPÍTULO 2: Trabajo que será enviado para **PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES** 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

Resumen

Trypanosoma cruzi, un importante parásito protozoario para humanos y animales, causa la enfermedad de Chagas, una enfermedad tropical desatendida (NTD) que afecta aproximadamente 6-7 millones de personas en el mundo, principalmente en países subdesarrollados. El vector es un insecto chupador de sangre y muchos mamíferos pueden ser reservorios. El tráfico de animales, el contrabando y el comercio ilegal es la cuarta actividad ilegal más común en el mundo. Un punto importante relacionado con el comercio ilegal de animales y la creciente globalización es que representa un posible vehículo para la diseminación de enfermedades, incluidas las zoonosis, creando un problema público de salud. Por lo tanto, el diagnóstico en regiones endémicas y recursos limitados es muy importante, una alternativa es una técnica molecular denominada amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), y este ensayo es una reacción de amplificación de un paso que amplifica un ADN diana con alta especificidad, eficiencia y rápido bajo condiciones isotérmicas. El objetivo de este estudio es verificar la prevalencia del agente zoonótico *T. cruzi* en 50 mamíferos del tráfico de animales utilizando muestras de músculo, sangre y piel, el diagnóstico molecular del *T. cruzi* utilizando el ensayo LAMP. En nuestro trabajo, un 50% de los animales fueron positivo en el ensayo LAMP a *T. cruzi*. Este análisis podría ser importante para identificar los embalses y el riesgo del tráfico de animales para la salud humana y el uso del ensayo LAMP en el diagnóstico rápido y de prueba.

CAPÍTULO 3: Trabajo que será enviado para THE JOURNAL FOR NATURE CONSERVATION ISSN 1617-1381**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO OBTENIDO DE MUESTRAS FORENSES Y IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LA FAUNA SILVESTRE BRASILEÑA POR ADN 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, *Prof Ass. Dr.*, FMUSP, Brazil
Noeme S Rocha, *Prof Ass Dr.*, FMVZ, UNESP, Brazil

Resúmen

El tráfico de animales, el contrabando y el comercio ilegal constituyen la tercera actividad ilegal más común en el mundo. La biodiversidad y el desequilibrio ambiental afectan y aumentan el riesgo de extinción de varias especies en peligro de extinción. La identificación taxonómica de la vida silvestre es un proceso rutinario del experto forense. El objetivo de esta investigación es identificar especies de la fauna silvestre por ADN mitocondrial. Se analizaron 17 muestras de músculo y piel. Una región conservada del mtDNA (600 pares de bases) ha sido secuenciada y se comparó con la base de datos Barcode of Life (BOLD) y Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para realizar la identificación de la especie. La identificación ha sido efectiva en la mayoría de los casos. En ocasiones, la calidad de las muestras genéticas afecta el análisis y puede dificultarlo. Esta es una de las atribuciones del veterinario en pericia animal para ayudar a la justicia a reducir los delitos ambientales.

Palabras clave: genética forense, tráfico de animales, ADN mitocondrial, crimen animal.

CAPÍTULO 4 Artículo en **OPEN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES** 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

Resumen

El tráfico de vida silvestre se clasifica como el cuarto más grande del mundo. La identificación taxonómica de la vida silvestre es un proceso ordinario para los expertos forenses. El objetivo de este estudio fue analizar el pelo de los animales de la vida silvestre de Brasil a través de microscopio y comparar la morfología de los pelos entre las especies analizadas. Se analizaron muestras de pelo de nueve especies. Los portaobjetos de vidrio fueron analizados mediante microscopía óptica y se obtuvieron las siguientes medidas: longitud total, diámetro de la médula, diámetro total y diámetro de la relación general del diámetro de la médula. Las imágenes obtenidas en la identificación de los animales a través de la morfología del cabello y el análisis estadístico corroboran a favor de la validación de la técnica.

Palabras clave: Zoobiología forense, análisis del cabello, medicina forense veterinaria, experiencia con animales, tráfico de animales, contrabando.

CAPÍTULO 5 Artículo en **EUROPEAN JOURNAL OF WILDLIFE RESEARCH**
ISSN 1612-4642

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

Tália Missen Tremori^{1,5*}, Mari Maki Siria Godoy Cardena², Bianca Picado Gonçalves³, Claire Gwinnet⁴, Julio López-Abán⁵, Cintia Fridman Rave², 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 Medicine, University of Sao Paulo, USP, Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 01246-903, Brazil

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

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

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

Resumen

Objetivos: Identificar una especie de material de aprehensión policial por ADN mitocondrial y pelo.

Presentación del caso: una región preservada de mtDNA ha sido secuenciada y comparada con la base de datos de ADN (GenBank) con el fin de hacer la identificación genética. Para el análisis del cabello se ha utilizado microscopía óptica en 100, 200 y 400x y las fotografías han sido tomadas por el software "AxioVision". Para las mediciones se ha empleado el programa "Imagen J" y la identificación del cabello se ha completado por análisis comparado. Con la asociación entre la genética forense y las técnicas de tricología ha sido posible identificar la *Panthera onca* con un 100% de similitud en este caso.

Discusión: el tráfico de animales, el contrabando y el comercio ilegal constituyen la cuarta actividad ilegal más común en el mundo. La biodiversidad y el desequilibrio ambiental afectan y aumentan el riesgo de extinción de varias especies en peligro de extinción. La identificación taxonómica de la vida silvestre es un proceso rutinario del experto forense.

Conclusión: este estudio puede demostrar una manera de mejorar y ayuda a los expertos forenses a solicitar el análisis para reducir los delitos ambientales.

Palabras clave: pelo de animales, veterinaria forense, identificación genética, crimen animal, conservación.

CAPÍTULO 6 DISCUSIÓN GENERAL

Hay diferencia entre las medidas hechas en el pelo de distintas especies y también con relación a la morfología (MIRANDA; RODRIGUES; PAGLIA, 2014; TRIDICO et al., 2014; DA COSTA LIMA et al., 2018).

Las imágenes obtenidas facilitan la elaboración de material científico de manera que contribuyan a la identificación de animales a través de morfología del pelo y los análisis estadísticos con significación pueden valorar la técnica. Se verifica de acuerdo con los materiales de referencia que hay similitud con las identificaciones hechas (SATO et al., 2010; MIRANDA; RODRIGUES; PAGLIA, 2014; POZEBON; SCHEFFLER; DRESSLER, 2017).

La identificación del pelo es sencilla, fácil y puede contribuir de manera efectiva para muchas situaciones, como la protección animal cuando de la actuación del veterinario en las ciencias forenses (TREMORI; ROCHA, 2013; MCDONOUGH; MCEWEN, 2016).

La rotulación de muestras es muy importante, el acondicionamiento, la identificación y garantizar la cadena de custodia en un examen pericial (BONACCORSO, 2005; WOODALL et al., 2015; KHATUN et al., 2017).

El requerimiento de identificación de animales recogidos por la policía durante la ejecución del proyecto, ha mostrado la aplicabilidad del trabajo, donde la genética forense junto con la comparación de la morfología del pelo ha resuelto un examen más para confirmación de la especie cuando ha sido posible su realización. Aún que la genética forense sea el “patrón de oro” para la identificación, la utilización de técnicas complementares traen más sensibilidad al informe de un experto (JOHNSON et al.; KHEDKAR et al., 2014; LINDQUIST & WICTUM, 2016).

Es adecuada la realización de estudios de morfología del pelo para confirmar medidas en más especies y más individuos. Es de gran interés la medida de otras variables del pelo además de los hechos en este trabajo, para más especificidad (SILVA, 2001; MIRANDA et al., 2014; TREMORI et al., 2014).

La técnica DNA *barcoding* es efectiva, adecuada y rentable, en casos donde hay material genético deteriorados, como en muchos forenses, en esta situación muestras de tráficos y contrabando animal. No identificar puede ser un problema de la técnica, no entrenamiento o necesidad de otros recursos de reactivos y materiales específicos para la investigación forense (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; DALTON; KOTZE, 2011; KHEDKAR et al., 2014; MUHAMMAD TAHIR; AKHTAR, 2015).

Los avances en la veterinaria legal son importantes para la elucidación de casos de delitos con animales, así se obtienen informaciones que ayudan al peritaje veterinario, sobre todo para respuesta de las cuestiones de la justicia (COOPER, 1998; ALACS et al., 2010; FROSCH et al., 2011; TÚLIO et al., 2017).

La positividad en el LAMP para *Trypanosoma cruzi* en las muestras demuestra que son necesarios más estudios para identificación de hospedadores, reservorios y la comprender el comportamiento y ciclo del parásito (GÜRTLER; CARDINAL, 2015; CEVALLOS et al., 2017; HODO et al., 2018). Además, es importante la implementación de normas para protección animal, el medio ambiente y también el hombre, en el contexto de Una Sola Salud (GOULD et al., 2013; CARDOSO et al., 2017).

Más estudios deben abordar la situación de actividades ilícitas (comercio ilegal de animales) y diseminación de enfermedades zoonóticas causadas por parásitos es necesario, de acuerdo con los resultados (ESCH; PETERSEN, 2013; VALLAT et al., 2013; TOMASSONE et al., 2018).

Las análisis de riesgo de enfermedades son efectivas cuando hay técnicas disponibles y los conocimientos científicos, pero es un tema muy amplio y con muchos hallazgos que hacen la investigación con animales silvestres actual y sobre todo pertinente (ESCH; PETERSEN, 2013; POLAK; SMITH-BLACKMORE, 2014; MERIGUETI et al., 2017).

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 análisis del pelo 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>>.
- BOUTSINI, 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=b8429449ccfc9c30159a5f9aea92ffb&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.; NUCCI, 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.; PEELLEN, 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>>.