

GUILHERME SILVEIRA JACQUES

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES ANIMAIS USANDO
SEQÜÊNCIAS DE GENES MITOCONDRIAIS NO
COMBATE AOS CRIMES CONTRA A FAUNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dario Grattapaglia

Brasília
2005

AGRADECIMENTOS

Ao Dario;

Ao pessoal do DPF, especialmente ao Amaury, ao Camargo, ao Rodrigo, ao Buchmüller, ao Fábio, ao Guilherme Henrique, ao Castro, ao Sergei, aos colegas de laboratório e ao Brandão;

Ao pessoal da UCB, especialmente ao Rinaldo, à Rosane, ao Renato, à Suzana, à Sandra, à Andréa, aos Alexandres, ao André e ao Willian;

À Dra. Cristina Miyacki;

Ao pessoal do Zoológico de Brasília, especialmente ao Muquira, à Jaque, ao George, à Adriana e à Helena;

Ao pessoal do CENARGEN, especialmente ao Dr. Márcio Elias, à Marília, à Eva, ao Rodrigo, ao Alexandre;

Aos pesquisadores Dr. Maurício Duarte e Dr. Colin Groves;

À Luciane e ao Nicolás, da UFRGS;

Ao pessoal do IBAMA;

Ao pessoal do Zoológico do Rio de Janeiro;

À CAPES e aos pesquisadores que enviaram seus trabalhos ou os disponibilizaram ao público pela internet;

À minha família, especialmente aos meus pais;

À Mariane, minha amada.

TERMO DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, defendida e aprovada, em 18 de fevereiro de 2005, pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Dario Grattapaglia (Orientador)

Dr. Renato Caparroz

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Prof^a. Dra. Rosane Garcia Collevatti

Prof. Dr. Sandro Bonatto (examinador externo)

RESUMO

A utilização forense de seqüências de genes mitocondriais para a identificação de espécies a partir de vestígios é particularmente interessante na investigação de crimes contra a fauna. Os dois genes mitocondriais do citocromo b (*cytb*) e da subunidade I da citocromo c oxidase são internacionalmente recomendados para tal fim. Embora eles não evoluam a taxas significativamente diferentes, o primeiro é mais utilizado para a identificação de vertebrados e o segundo para invertebrados resultando em abundâncias diferentes de seqüências depositadas no *GenBank* e utilidades forenses diferenciadas nestes grupos. Neste trabalho o sequenciamento e análise de trechos destes dois genes foram utilizados para (1) a resolução de uma investigação forense; (2) a análise de diversidade intra e interespecífica para estes genes em diferentes grupos e (3) a proposição e desenvolvimento de diagnósticos diferenciadores simples entre grandes grupos de animais baseados em PCR alelo específica. O sequenciamento de regiões específicas do gene *cytb* foi utilizada para a resolução de uma investigação forense real do Departamento de Polícia Federal envolvendo o tráfico de ovos de aves da fauna silvestre brasileira. A análise de seqüências do *cytb* permitiu concluir, de forma inquestionável, se tratar de fato de um crime contra a fauna por envolver o tráfico de aves de quatro espécies distintas, a grande maioria sendo de psitacídeos. Foi avaliado o conhecimento filogenético nas famílias Cebidae, Cervidae, Felidae, Myrmecophagidae, Psittacidae e Tayassuidae, salientando a problemática de cada grupo e suas implicações para a identificação forense de espécies, incluindo entomologia forense. Seqüências dos genes estudados, inéditas no *GenBank*, foram geradas e depositadas para espécies ameaçadas pertencentes a estas famílias. Em uma análise intraespecífica do nível de polimorfismo de seqüência deste gene, duas populações de tamanduá-bandeira do cerrado brasileiro foram estudadas. Os mesmos quatro haplótipos encontrados na população do Parque Nacional das Emas foram encontrados

na população do Parque Nacional da Serra da Canastra. Este resultado indica que a reduzida diversidade nucleotídica neste gene não permite, portanto, a sua utilização em estudos genéticos ou filogeográficos de atribuição de indivíduos a populações específicas. Para reforçar a segurança na declaração da identificação de espécies usando estes genes mitocondriais, os estudos realizados apontam para a necessidade de realizar análises filogenéticas das seqüências gênicas questionadas, adicionalmente a uma simples busca de identidade de seqüências via *blast* no *GenBank*, proposta em publicações forenses.

PALAVRAS-CHAVE: identificação de espécies, citocromo b, criminalística, perícia criminal, genética forense, DNA mitocondrial, fauna, espécies ameaçadas de extinção.

ABSTRACT

The forensic application of mitochondrial gene sequences for the identification of species is particularly useful in the investigations of wildlife crimes. The two mitochondrial genes, cytochrome b and subunit I of cytochrome c oxidase have been internationally recommended for this purpose. Although they do evolve at essentially the same rate, the first one is generally used for the identification of vertebrates, while the second for invertebrates, resulting in different abundances of sequences deposited in *GenBank* and a differential forensic utility in these groups of animals. In this work, sequencing and analysis of portions of these genes was used for (1) the solution of a forensic investigation; (2) the analysis of intra and interspecific diversity in different animal groups; (3) the proposal and development of simple differential diagnostic tools amongst groups of animals based on allele specific PCR. Direct sequencing of *cytb* was used for the solution of a real life forensic investigation at the DPF involving the smuggling of eggs of native Brazilian birds. The analysis of *cytb* sequences allowed concluding that in fact it was a crime against wildlife involving the traffic of four distinct species, most of them belonging to the family Psittacidae. The phylogenetic knowledge in the families Cebidae, Cervidae, Felidae, Myrmecophagidae, Psittacidae and Tayassuidae, was studied emphasizing the problems in each group and their implications for forensic species identification, including forensic entomology. Sequences of the two mtDNA genes studied for species belonging to these families were added to *GenBank*. The intraspecific level of sequence polymorphism was studied in two populations of giant anteater. The same four haplotypes were found in the Emas National Park population were also found in the population from Serra da Canastra National Park, indicating that the limited nucleotide diversity precludes the use of these genes in phylogeographic and genetic studies. To allow confidence in the declaration of species identity using mitochondrial genes, these

studies point to the necessity of carrying out detailed phylogenetic analyses of the questioned sequences in addition to a simple search for identity of sequences through blast in genebank as generally proposed in the forensic literature.

KEYWORDS: species identification, cytochrome b, forensics, forensic science, forensic genetics, mtDNA, mitochondrial DNA, wildlife, Brazil, endangered species.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
I INTRODUÇÃO.....	9
I.1 O combate aos crimes contra a fauna no Brasil.....	9
I.2 A importância da identificação de espécies no combate aos crimes contra a fauna.....	10
I.3 As vantagens da identificação molecular.....	11
I.4 DNA mitocondrial.....	12
I.5 Qual gene? citocromo b x citocromo oxidase I.....	14
I.6 Parâmetros utilizados na identificação de espécies usando o DNA.....	15
I.7 Filogenia molecular.....	16
I.8 Potenciais problemas da identificação de espécies usando o mtDNA.....	18
I.8.1 Hibridação entre espécies próximas e introgressão.....	19
I.8.2 Retenção de polimorfismos ancestrais.....	22
I.8.3 Inserções nucleares de genes mitocondriais.....	23
I.9 O estado da arte em diferentes grupos animais.....	24
I.9.1 Ordem Psittaciformes; Família Psittacidae.....	24
I.9.2 Ordem Carnivora; Família Felidae.....	26
I.9.3 Ordem Artiodactyla; Famílias Cervidae.....	26
I.9.4 Ordem Artiodactyla; Família Tayassuidae (Dicotylidae).....	27
I.9.5 Ordem Xenarthra (Edentata); Família Myrmecophagidae.....	28
I.9.6 Ordem Primates; Subordem Platyrrhini (Primates do Novo Mundo).....	28
I.10 Outros usos forenses da identificação de espécies usando seqüências de genes mitocondriais.....	29
II OBJETIVOS.....	31
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
III.1 Material biológico de referência:.....	32
III.2 Material biológico questionado na investigação forense:.....	34
III.3 Seqüências nucleotídicas disponíveis no GenBank:.....	35
III.4 Extração de DNA:.....	35
III.5 Amplificação:.....	36
III.6 Purificação do produto da PCR:.....	38
III.7 Seqüenciamento:.....	39
III.8 Controle de qualidade das seqüências obtidas:.....	39
III.9 Comparação com as seqüências disponíveis no GenBank:.....	39
III.10 Alinhamento e edição das seqüências:.....	39
III.11 Similaridade entre as seqüências:.....	40
III.12 Análises filogenéticas:.....	40
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
IV.1 Análise comparativa da abundância e similaridade de seqüências de <i>cytb</i> e <i>col</i> no GenBank.....	41
IV.2 Diversidade intra-específica de citocromo b a partir de seqüências do GenBank.....	43
IV.3 Obtenção das Amostras e Extração do DNA.....	46
IV.4 Amplificação dos trechos de <i>cytb</i> e <i>col</i> via PCR.....	47
IV.5 Qualidade das seqüências obtidas.....	47
IV.6 Desempenho da análise de mtDNA na identificação de espécies de interesse forense da fauna brasileira:.....	47
IV.6.1 <i>Blastocerus dichotomus</i> (cervo-do-pantanal).....	47
IV.6.2 <i>Cebus xanthosternos</i> (macaco-prego-de-peito-amarelo).....	49
IV.6.3 <i>Herpailurus yagouaroundi</i> (jaguarundi).....	53
IV.6.4 <i>Leopardus tigrinus</i> (gato-do-mato-pequeno).....	55
IV.6.5 <i>Mazama gouazoubira</i> (veado-catingueiro).....	57
IV.6.6 <i>Myrmecophaga tridactyla</i> (tamanduá-bandeira).....	61
IV.6.7 <i>Pecari tajacu</i> (cateto).....	61
IV.7 Diversidade intra-específica de seqüências de <i>cytb</i> de tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>).....	66
IV.8 Identificação de ovos na elucidação de um crime contra a fauna.....	69
IV.8.1 Aspecto geral dos ovos e dos embriões:.....	69
IV.8.2 Seqüências obtidas a partir dos ovos.....	70
IV.8.3 Cinquenta ovos de <i>Amazona xanthops</i> (<i>Salvatoria xanthops</i>):.....	71
IV.8.4 Quatro ovos de <i>Amazona aestiva</i> ou <i>Amazona ochrocephala</i> :.....	73
IV.8.5 Três ovos de <i>Ara ararauna</i> :.....	75
IV.8.6 Um ovo de <i>Otus choliba</i> :.....	78
IV.8.7 Conclusões da identificação dos ovos.....	81
IV.9 Parâmetros utilizados na identificação de espécies.....	84
IV.10 Mais um potencial problema na identificação de espécies usando seqüências.....	87
IV.11 Identificação de espécies usando genes mitocondriais na entomologia forense.....	89
V CONCLUSÕES.....	91
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
Anexo I: Fluxograma para identificação de espécies usando genes mitocondriais.....	112
Anexo II: Seqüências obtidas.....	113
Anexo III – Artigo: Identification of avian eggs using cytochrome b gene sequences.....	116

I Introdução

1.1 O combate aos crimes contra a fauna no Brasil

Tamanho o impacto do homem nas populações naturais nos últimos séculos (Goudie, 1994), que têm se dito que estamos vivendo um “evento de extinção em massa”, termo utilizado por paleontólogos para descrever o grande desaparecimento de espécies em um tempo geológico relativamente curto (Donovan, 1989; Leakey & Lewin, 1996). A humanidade tem afetado os ecossistemas de diferentes maneiras, seja poluindo o ambiente, destruindo habitats ou caçando e pescando até os últimos indivíduos de uma população.

Nas últimas décadas, entretanto, a humanidade tem repensado esta postura e tem estabelecido a conservação da biodiversidade global como uma das medidas prioritárias para a garantia da qualidade de vida das próximas gerações (UNEP, 1995; Wilson, 2002).

O Brasil possui uma importância ímpar no cenário da biodiversidade global. Nosso país apresenta a maior diversidade de mamíferos e a terceira maior diversidade de aves do mundo (Mittermeier *et al.*, 1997). Justamente por esta condição, o Brasil não só é alvo de olhares críticos de todo o mundo conservacionista, mas também é vítima dos maiores crimes contra a natureza e, em especial, dos crimes contra a fauna. Traficantes e caçadores de animais de todo o mundo cometem crimes contra nossa rica fauna silvestre (RENCTAS, 2002; Brasil, 2003).

Diante desta perspectiva, inúmeros têm sido os esforços para controlar a extinção desenfreada causada pelo homem. Muitos países, incluindo o Brasil, criaram severas leis para a punição de quem agride as espécies mais ameaçadas. Além das iniciativas isoladas, existem tratados internacionais que restringem o comércio destas espécies. A Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e da Fauna Selvagens em Perigo de Extinção, conhecida pela sua sigla em inglês “CITES” (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), da qual o Brasil é signatário desde 1975, tem

sido um dos principais instrumentos legais para evitar este tipo de comércio, que é freqüentemente unidirecional, partindo dos trópicos subdesenvolvidos e indo para os compradores norte-americanos, europeus e asiáticos.

1.2 A importância da identificação de espécies no combate aos crimes contra a fauna

Os crimes contra a fauna estão entre os maiores impactos nas populações de animais silvestres, afetando, sobretudo as espécies mais ameaçadas. O tráfico de animais silvestres e a caça ilegal, diferentemente de outros impactos causados pelo homem, não têm como justificativa o “desenvolvimento” ou o “avanço da fronteira agrícola”. Ao contrário, suas motivações costumam ser tão fúteis como o esporte, o lazer, a criação de animais de estimação e a confecção de casacos de pele (Taylor & Dunstone, 1996; RENCTAS, 2002).

Dentre as normas existentes no Brasil que visam combater os crimes contra a fauna, destacam-se: a Lei de Crimes Ambientais (Lei 9605/98), a Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Fauna e da Flora Ameaçadas de Extinção (CITES, implementada no país pelo Decreto 3607/2000) e a Lista Nacional das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção (IN 03/2003-MMA).

A Lei de Crimes Ambientais, em seu artigo 29, em que define os crimes contra a fauna, sentencia:

*“Matar, perseguir, caçar, apanhar, utilizar, vender, expor à venda, exportar, adquirir, guardar **espécimes da fauna silvestre** bem como produtos e objetos dela oriundos”*

*“A pena é aumentada da metade se o crime é praticado [...] contra **espécie rara ou considerada ameaçada de extinção**”*

As normas estabelecidas pela CITES são diferenciadas para três grupos de espécies: as que estão relacionadas no anexo I, aquelas que correm maior risco de extinção e devem ter

seu comércio rigorosamente fiscalizado ou, até mesmo, impedido; as que se encontram no anexo II, que correm um risco intermediário de extinção e cujas restrições não são tão grandes quanto às do anexo I; e todas as demais, que estão no anexo III e não sofrem restrições quando comercializadas internacionalmente.

De forma similar, o Brasil reconhece oficialmente as espécies da sua fauna ameaçadas de extinção por meio da Instrução Normativa N° 03/2003, do Ministério do Meio Ambiente, que é periodicamente revisada e atualizada.

Como pode se observar, as três principais normas sobre o assunto utilizam o conceito de espécie; a determinação da espécie e a sua classificação em categorias definidas representarão diferentes tratamentos ao infrator.

As duas principais categorias para classificação das espécies, na esfera penal, consistem em (1) espécie pertencente à fauna silvestre (em contraposição com as espécies domésticas) e (2) espécie incluída em lista de espécie ameaçada (anexos CITES e IN 03/2003).

Desta forma é crucial para a justiça brasileira, assim como na maioria dos demais países, a correta e rápida identificação da espécie animal vítima de um crime contra a fauna para o devido enquadramento legal e julgamento do infrator e definição de sua pena.

1.3 As vantagens da identificação molecular

Todos os fundamentos clássicos de comparação, identificação e classificação de espécies e demais grupos taxonômicos baseiam-se nas características morfológicas exibidas pelos indivíduos. Na maior parte das vezes tratam-se de características exibidas apenas em indivíduos adultos. Não raro, a identificação de espécies necessita de um especialista no táxon. Até mesmo peles inteiras de felinos, que poderiam ser classificadas como um dos vestígios dos crimes contra a fauna mais fáceis de se identificar, podem representar grandes dificuldades (Bowles, 1996).

A identificação molecular (identificação genética), por outro lado, baseada em seqüências nucleotídicas, pode ser feita utilizando qualquer fragmento de tecido, como sangue (Branicki *et al.*, 2003), pêlos (Pascalli *et al.*, 1994; Allen *et al.*, 1998; Menotti-Reimond *et al.*, 1997; Savolainen & Lundeberg, 1999), chifres (Hsieh *et al.*, 2003), penas (Russello & Amato, 2001), carne (Baker & Palumbi, 1994; Fang & Wan, 2002), ossos (Wetton *et al.*, 2004), fezes (Höss *et al.*, 1992; Paxinos *et al.*, 1997), carcaças (Pierce *et al.*, 2004), entre outros (Branicki *et al.*, 2003). A determinação da espécie da qual proveio uma pena de arara, um dente de onça, um pêlo de tamanduá (ou até uma planta, um fungo ou uma bactéria) usando o DNA, diferentemente da identificação morfológica, pode ser feita por um mesmo profissional com boa formação em biologia e genética e ciente das limitações das técnicas empregadas.

1.4 DNA mitocondrial

Presente na maioria dos eucariotos, o DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula circular fechada com tamanho entre 15 e 20 kb, dependendo da espécie, de replicação independente do DNA nuclear. O DNA mitocondrial é em geral utilizado para a identificação taxonômica e aplicação forense por apresentar vantagens em relação ao DNA nuclear.

A principal vantagem do DNA mitocondrial para uso forense é a maior abundância de cópias deste em comparação ao DNA nuclear. Cada célula possui centenas de mitocôndrias e cada mitocôndria possui dezenas de cópias de seu cromossomo circular. Sendo assim, tecidos muito diminutos, com pouco DNA ou com o DNA bastante degradado, podem ter seu DNA mitocondrial amplificado, mas não o nuclear (Budowle *et al.*, 2003). Um exemplo bastante conhecido deste caso são os fios de cabelo e demais pêlos sem bulbo, onde segmentos do DNA mitocondrial freqüentemente podem ser amplificados, mas não segmentos do DNA nuclear.

Do ponto de vista da identificação de espécies, o DNA mitocondrial tem as vantagens de não possuir íntrons, praticamente não sofrer recombinação e ser haplóide (Saccone *et al.*, 1999). Além disso, certos genes como o citocromo b (*cytb*) e o citocromo oxidase I (*coI*) possuem regiões bastante conservadas que permitem a construção de oligonucleotídeos iniciadores universais de PCR capazes de amplificar esses genes em uma vasta gama de espécies (Kocher *et al.* 1989, Folmer *et al.*, 1994).

O DNA mitocondrial possui uma taxa de mutação mais alta que o DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979) e as transições são muito mais freqüentes que as transversões (Moritz *et al.*, 1987). Possui regiões bastante variáveis que podem ser utilizadas para diferenciar indivíduos dentro de uma espécie, sobretudo na região controladora, ou alça-D, a única porção não codificante do mtDNA (Greenberg *et al.*, 1983; Avise *et al.*, 1987; Saccone *et al.*, 1991; Lopez *et al.*, 1997). A maior parte do mtDNA, entretanto, é codificante, estando sujeita a maiores pressões seletivas, sendo responsável pela produção de 22 RNAs de transferência, 2 RNAs ribossomais e 13 RNAs mensageiros que codificam polipeptídeos envolvidos na fosforilação oxidativa. Os genes dos tRNAs são bastante pequenos quando comparados aos demais, sendo os genes que codificam proteínas e rRNAs os mais utilizados para inferências filogenéticas.

Apesar de o gene que codifica para o 16S rRNA ser amplamente utilizado na identificação e classificação de microrganismos (Woese, 1977; Pace, 1997) e os genes que codificam rRNAs terem uma taxa de evolução mais constante do que aqueles que codificam proteínas, sendo considerados verdadeiros “relógios biológicos”, os últimos apresentam pelo menos duas vantagens na identificação de espécies animais e na diferenciação entre espécies próximas. A primeira é a grande abundância de seqüências de citocromo b, de diferentes espécies animais, no *GenBank*. A segunda é a relativamente baixa pressão seletiva em algumas posições destes genes, sobretudo na terceira posição do códon. Deste modo, os genes

que codificam proteínas têm uma taxa de evolução intermediária entre os rRNAs e a região controladora (Jankzewski *et al.*, 1995; Lopez *et al.*, 1997), podendo ser utilizados para diferenciar espécies próximas mas sem perder a informação filogenética para classificá-las dentro de um determinado táxon.

Os dois genes mitocondriais que têm sido amplamente sugeridos para a identificação de espécies animais são o *cytb* e o *coI*.

1.5 Qual gene? citocromo b x citocromo oxidase I

O gene mitocondrial do citocromo b (*cytb*) tem sido utilizado há bastante tempo para estudar a evolução dos animais (Kocher *et al.*, 1989), de modo que é o gene que possui a maior abundância de seqüências disponíveis no *GenBank* (mais de 25 mil), representativas de uma vasta gama de espécies animais. Em 2000, Parson e colaboradores formalmente recomendaram o uso de seqüências de *cytb* para a identificação de espécies animais com finalidade forense e, em 2003, Branicki e colaboradores validaram a sua utilização segundo as normas do TWGDAM (*Technical Working Group on DNA Analysis Methods*).

Apesar do aparente consenso da comunidade forense no uso deste gene na identificação de espécies, em um contexto mais amplo, Paul Hebert tem defendido que o gene mitocondrial da subunidade I da citocromo c oxidase (*coI*) deve ser utilizado como “código de barras” para identificar toda a diversidade de espécies animais (Hebert *et al.*, 2003; Holmes, 2004). Segundo o autor, a taxa de substituição de aminoácidos é mais baixa neste gene do que em qualquer outro gene mitocondrial, o que permitiria reconstruções filogenéticas mais profundas que o *cytb*, por exemplo. Recentemente, o referido pesquisador, que até então baseava seus estudos em invertebrados, obteve a seqüência de *coI* de 260 das 667 espécies de aves da América do Norte (Hebert *et al.*, 2004) e tem dado publicidade ao seu projeto no endereço www.barcodinglife.org.

O consenso, que seria o ideal para a identificação de espécies, não existe nem mesmo entre as regiões do *cytb* e do *coI* a serem utilizadas. Enquanto a maioria dos trabalhos utiliza a região 5' do *cytb*, Verma & Singh (2003) recentemente publicaram seqüências de iniciadores para serem utilizados na investigação forense que amplificam a região 3' do gene. Em relação ao *coI* ocorre algo semelhante: enquanto Hebert e colaboradores (2003) sugerem a região 5', diversos trabalhos utilizam a porção terminal do gene (Palumbi *et al.*, 1991; Russello & Amato, 2004).

1.6 Parâmetros utilizados na identificação de espécies usando o DNA

Os parâmetros que têm sido utilizados na identificação de espécies baseada na comparação de seqüências nucleotídicas são diversos. Parson e colaboradores (2001) utilizaram a similaridade percentual. Naquele trabalho, os autores encontraram valores de similaridade de 99% e 100% entre seqüências de 300 pb de *cytb* obtidas de indivíduos da mesma espécie. Uma similaridade de 98%, por exemplo, poderia ser observada tanto entre dois indivíduos de uma espécie antiga como entre duas espécies recentemente separadas. Branicki e colaboradores (2003), após obterem uma similaridade de 99% entre a seqüência de *cytb* do tecido questionado e uma seqüência identificada no *GenBank* como sendo de gato doméstico, buscaram o exato haplótipo do tecido questionado entre os gatos da região.

Hebert e colaboradores (2003), utilizando a distância p entre seqüências de *coI*, relataram que quando um limiar de 3% é utilizado para distinguir espécies de Lepidoptera (borboletas e mariposas), 196 de 200 espécies são corretamente identificadas. As quatro espécies restantes apresentaram diferenças de 0,6 a 2,0% o que, segundo os autores, sugeriria uma divergência recente.

Hsieh e colaboradores (2003), além da comparação simples entre as seqüências de *cytb*, também observaram o agrupamento destas em uma análise filogenética usando a distância de Kimura 2-parâmetros e o algoritmo de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*).

Terol e colaboradores (2002), afirmaram ter validado a identificação de espécies de atum usando um fragmento interno de 171 pb do *cytb* por meio de uma análise de *bootstrap*. Segundo os autores, o seqüenciamento do fragmento proposto permite a correta determinação da espécie de atum com uma probabilidade igual ou superior a 95%.

Hebert e colaboradores (2004), propuseram o limiar de 10X da variação intraespecífica média para o grupo em estudo. Ou seja, no grupo de aves estudado, por exemplo, com uma variação intraespecífica média de 0,27%, o limiar para separar espécies seria 2,7%, um limiar capaz de reconhecer mais de 90% das 260 espécies investigadas.

Apesar de haver uma vasta gama de parâmetros disponíveis na literatura, passíveis de utilização para permitir uma identificação de espécie baseada em seqüências de DNA mais segura, parece existir uma certa tranqüilidade na comunidade forense em relação a este aspecto. Em conversas informais e na rotina dos laboratórios periciais parece haver uma confiança exagerada de que uma simples busca no *GenBank*, e comparação usando a ferramenta *blast*, resultaria na identificação correta da espécie da seqüência questionada.

1.7 Filogenia molecular

A sistemática filogenética busca reconstruir as relações de parentesco entre as diferentes formas de vida de acordo com suas histórias evolutivas (Hennig, 1966; Amorim, 1997; Mattioli, 2001). Utilizando inicialmente características morfológicas, os pesquisadores passaram a utilizar, também, características comportamentais, citogenéticas, moleculares e até características externas ao próprio organismo (“fenótipo estendido”), como teias e ninhos, para fazer inferências evolutivas. As características moleculares, sobretudo seqüências de

nucleotídeos e aminoácidos, mostraram-se tão úteis para a reconstrução de filogenias que metodologias clássicas foram readaptadas e metodologias novas foram criadas para melhor refletirem o modo de evolução destas seqüências (Nei & Kumar, 2000).

Desta forma, seguimos os conceitos e metodologias da filogenia molecular de acordo com o proposto por Nei & Kumar (2000) e largamente implementados no programa Mega2 (Kumar *et al.*, 2001).

Os métodos de reconstrução filogenética expressam seus resultados na forma de um dendrograma conhecido como “árvore filogenética”. As árvores filogenéticas são compostas por nós, que representam os pontos de divergência entre as seqüências, e por ramos, que indicam o número de características (polimorfismos de bases) que separam as seqüências de sua seqüência ancestral comum. As técnicas para obtenção de filogenias podem ser baseadas na distância, na parcimônia ou na máxima verossimilhança. No presente trabalho foram utilizadas apenas as duas primeiras.

O método da máxima parcimônia se baseia no simples fato de uma mudança ser mais provável que duas e, portanto, busca a árvore que requeira um menor número de mudanças para explicar características derivadas (Matioli, 2001).

Os métodos baseados na distância, também conhecidos como métodos geométricos, utilizam a similaridade (ou distância) entre cada par de seqüências (de nucleotídeos ou aminoácidos) alinhadas para reconstruir filogenias. Existem diversos modelos, desde extremamente simples até altamente complexos, para estimar a distância entre duas seqüências. Modelos matemáticos mais complexos, com um maior número de variáveis, têm variância maior e, portanto, devem ser evitados para reconstrução de topologias onde a média das distâncias é menor que 0,2 (Nei & Kumar, 2000), como as obtidas na identificação de espécies e comparação entre espécies próximas. Entre as estimativas de distância mais simples estão a distância p e a distância de Kimura 2-parâmetros, K2P (Kimura, 1980). A

distância p é meramente a proporção de posições em que duas seqüências diferem. A distância K2P leva em consideração dois parâmetros a mais: a possibilidade de ocorrerem substituições múltiplas e a razão entre as transições e as transversões. Após a obtenção das distâncias entre as seqüências comparadas, utiliza-se um algoritmo para a reconstrução da árvore filogenética. Entre os diversos algoritmos disponíveis, utiliza-se com maior freqüência o agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*, NJ; Saitou & Nei, 1987), um método no qual a árvore com a menor soma total de ramos é a procurada.

O teste de confiança na topologia mais utilizado, tanto em árvores de distância como de parcimônia, é o *bootstrap* (Felsenstein, 1985). A base do método consiste em uma simples re-amostragem com reposição pseudoaleatória dos dados. A cada re-amostragem, uma árvore réplica é construída e, ao final, a quantidade de vezes em que cada agrupamento ocorreu pode ser expressa em porcentagem (Mattioli *et al.*, 2001).

O uso das ferramentas da filogenia molecular na identificação forense de espécies usando seqüências de genes mitocondriais ainda é discreto. Parson e colaboradores (2000), assim como Branicki e colaboradores (2003), nos dois trabalhos fundamentais para chamar a atenção dos cientistas forenses para o uso de seqüências gênicas na identificação de espécies, não utilizam e nem sequer citam qualquer ferramenta da filogenia molecular. As contribuições que a análise filogenética pode dar à identificação forense de espécies usando seqüências nucleotídicas devem ser melhor avaliadas.

1.8 Potenciais problemas da identificação de espécies usando o mtDNA

Nem sempre a história evolutiva da seqüência de mtDNA estudada reflete a história evolutiva da espécie (Ballard & Whitlock, 2004). Aqui abordamos três tipos de fatores que consideramos os principais, mas não os únicos (veja Funk & Omland, 2003), que podem

resultar em árvores filogenéticas baseadas em seqüências de mtDNA que não refletem a história evolutiva do grupo estudado.

I.8.1 Hibridação entre espécies próximas e introgressão

Segundo o conceito biológico de espécies (Dobzhansky, 1939), espécies distintas não inter cruzam ou, caso gerem algum descendente, este não é fértil. De fato, muitas espécies seguem esta regra. No entanto, para a grande maioria das espécies descritas, o isolamento reprodutivo não é diretamente verificado e a ocorrência de híbridos não pode ser descartada.

De uma maneira geral, espera-se que populações que divergiram há muito tempo não mais se inter cruzem e populações que divergiram há pouco tempo ainda possam inter cruzar. No entanto, existem exceções documentadas para ambos os casos: populações de peixes que originaram mais de mil espécies distintas, em menos de um milhão de anos, que não mais se inter cruzam (Meyer, 1993; Albertson *et al.*, 1999), e populações de árvores isoladas que divergiram há 8 milhões de anos e que não desenvolveram qualquer isolamento reprodutivo (Mayr, 2001).

Entre as espécies de mamíferos que hibridizam na natureza encontram-se, por exemplo, o trio lobo cinza (*Canis lupus*), lobo vermelho (*Canis rufus*) e coiote (*Canis latrans*) (Reich *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2003a) e a dupla gato selvagem (*Felis silvestris*) e gato doméstico (*Felis catus*) (Pierpaoli *et al.*, 2003). Entre as aves, encontramos, por exemplo, o galo-lira (*Tetrao tetrix*) e o tetraz (*Tetrao urogallus*) (Grant & Grant, 1997) e diversas espécies de gaivotas (gênero *Larus*) (Mayr, 1940; Crochet *et al.*, 2003). Para tentar categorizar o gradiente contínuo de relação entre as populações, utilizamos os termos subespécie, para populações relativamente isoladas dentro de uma espécie, e superespécie (ou complexo de espécies), para designar um conjunto de espécies que ainda podem trocar material genético.



Figura I.1. De cima para baixo, o pai (uma falsa-orca, *Pseudorca crassidens*), a mãe (um golfinho, *Tursiops truncatus*) e a filha (um híbrido intergenérico!). Em 1991, a híbrida, que faz shows em parque aquático do Havai, ficou grávida e teve uma filha $\frac{3}{4}$ golfinho.

Um maior entendimento sobre os processos de hibridação e especiação tem sido gerado graças aos estudos em “zonas híbridas” (ou “zonas de hibridação”); linhas de contato entre a distribuição geográfica de duas espécies onde a ocorrência de híbridos pode ser comum (Harrison, 1993). Um importante conceito neste tipo de estudo é a “introgressão gênica”: a penetração de genes de uma espécie em outra. Se não ocorresse introgressão, as implicações na identificação de espécies ficariam restritas aos híbridos e, se apenas genes nucleares sofressem introgressão, a identificação usando o mtDNA não seria afetada.

A introgressão do mtDNA entre espécies (Takahata & Slatkin, 1984), no entanto, já foi verificada tanto em aves (gaiotas, Liebers *et al.*, 2001; passeriformes, Shapiro *et al.*, 2004; patos, Rhymer *et al.*, 1994; Kulikova *et al.*, 2004), quanto em mamíferos (camundongos, Ferri *et al.*, 1983; peixes-boi, Garcia-Rodriguez *et al.*, 1998; mustelídeos, Davison *et al.*, 2001; esquilos, Good *et al.*, 2003; lebres, Alves *et al.*, 2003; canídeos, Adams *et al.*, 2003b) e crocodilos (Ray *et al.*, 2004).

Em diversos casos onde foram verificados híbridos e introgressão, houve um “contato secundário”, ou seja, as espécies eram isoladas geograficamente e, por algum motivo (muitas vezes por interferência humana, com a introdução de espécies exóticas), reencontram-se e hibridizam (Rhymer & Simberloff, 1996; Garcia-Rodriguez *et al.*, 1998; Goodman *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2004; Mank *et al.*, 2004).

Muitas populações de animais domésticos são consideradas espécies diferentes das populações silvestres das quais derivaram, embora não exista isolamento reprodutivo, dado o pouco tempo desde a domesticação (Gentry *et al.*, 2004). A maioria dos animais domesticados pelo homem, no entanto, originaram-se no Velho Mundo. Desta forma, não existem correspondentes silvestres do cão, do gato, do boi, etc. na fauna silvestre brasileira e estamos menos sujeitos a enfrentar dificuldades em diferenciar “espécies” domésticas de silvestres.

Entre as espécies de interesse forense nativas da fauna brasileira, que podem hibridizar com uma espécie doméstica próxima encontramos a preá (*Cavia aperea*), cujo correspondente doméstico é a cobaia, ou porquinho-da-índia, (*Cavia porcellus*) (Gray, 1972) e o marrecotoucinho (*Anas bahamensis*), que se encontra na lista das aves ameaçadas de extinção do Estado de São Paulo (Decreto N° 42.838, de 04.02.98), apesar de ser considerado doméstico pela Portaria N° 93, de 07.06.98, do IBAMA/MMA (Bouvier & Price, 2002).

Ao se tentar identificar espécies usando seqüências gênicas deve-se levar em conta a probabilidade de ocorrência de híbridos, de zonas híbridas, de introgressão, de contato secundário entre espécies e de espécie silvestre que tenha derivado uma espécie doméstica. A identificação de espécies em grupos de animais onde a hibridação é comum, como nas subfamílias Emberizinae (Gill, 1998) e Mustelinae (Davison *et al.*, 2001) e nos Anseriformes (Grant & Grant, 1992), deve ser feita de forma ainda mais cautelosa.

I.8.2 Retenção de polimorfismos ancestrais

Linhagens animais divergentes tendem a divergir, também, em suas linhagens de mtDNA, em um processo reforçado pela extinção aleatória de linhagens de mtDNA e que resulta em duas linhagens mutuamente monofiléticas (Avice *et al.*, 1987). A divergência completa das linhagens de mtDNA, no entanto, segundo a teoria da coalescência, demora em média $2N_e$ gerações, sendo N_e o tamanho efetivo da população de fêmeas (Hudson, 1990). É possível, então, que espécies animais, que divergiram há poucas gerações e/ou cujo tamanho efetivo das populações seja grande, ainda compartilhem linhagens não distinguíveis de mtDNA (“incomplete lineage sorting” em Funk & Omland, 2003).

Raros são os estudos em aves e mamíferos que afirmam que a manutenção de polimorfismos de mtDNA ancestrais tenha sido responsável pela polifilia encontrada. Mesmo quando existem indícios, é muito difícil distinguir a retenção de polimorfismos ancestrais de uma hibridação seguida de introgressão como causa de compartilhamento de haplótipos entre espécies, como o encontrado nos tentilhões-de-Darwin (Freeland & Boag, 1999; Sato *et al.*, 1999) e alguns gaviões do Velho Mundo (Kruckenhauser *et al.*, 2004), cuja especiação é recente. Tosi e colaboradores (2003) argumentam que a retenção de polimorfismos ancestrais é a causa mais provável para a polifilia encontrada no primata *Macaca nemestrina*, dado o comportamento reprodutivo da espécie, embora, recentemente, estes achados tenham sido questionados (Piganeau, 2004).

Hare e colaboradores (2002), mostraram a ausência de manutenção de polimorfismos de mtDNA ancestrais em duas espécies de golfinhos que exibiram polifilia em todos os 5 locos nucleares estudados, em uma evidência direta deste potencial problema ser menos preocupante quando usamos o mtDNA.

I.8.3 Inserções nucleares de genes mitocondriais

Em muitas espécies animais, incluindo o homem, foi comprovada a existência de inúmeras cópias de genes, aparentemente mitocondriais, no núcleo (Bensasson *et al.*, 2001). Conhecidos como “pseudogenes mitocondriais nucleares” ou “NUMTs”, estas seqüências nucleares com similaridade variável com suas correspondentes mitocondriais (Woischnik & Moraes, 2002), representam tanto resquícios de uma inserção ocorrida em um passado distante como colonizações de seqüências mitocondriais recentes (Ricchetti *et al.*, 2004).

Dependendo da espécie, o número destas inserções encontradas no núcleo pode ser desde muito grande, como ocorre em primatas (Thalmann *et al.*, 2004; Woischnik & Moraes, 2002), até bastante baixo, como acontece com algumas aves (Pereira & Baker, 2004).

Estas seqüências podem ser amplificadas acidentalmente, pela PCR, quando a intenção seria amplificar genes mitocondriais. Analisar uma seqüência de uma inserção nuclear antiga pensando tratar-se de uma seqüência mitocondrial pode levar a inferências filogenéticas completamente equivocadas (Sorenson & Quinn, 1998; Thalmann *et al.*, 2004), pois o modo de evolução dessas seqüências é distinto. No núcleo, a taxa de mutação é menor (Brown *et al.*, 1979), fazendo com que as NUMTs evoluam mais lentamente que suas correspondentes mitocondriais. Por outro lado, como as inserções nucleares não são funcionais, elas não sofrem as mesmas restrições seletivas que as cópias mitocondriais (Lopez *et al.*, 1997). Lopez e colaboradores (1997) mostraram que nesta luta entre mutação e seleção, alguns genes, como os rRNAs, sujeitos a altas pressões seletivas na mitocôndria, podem divergir mais rapidamente no núcleo.

Apesar de alguns autores afirmarem que as seqüências mitocondriais estão mais propensas a serem amplificadas, pela maior quantidade destas que as nucleares, algumas NUMTs acabam sendo preferencialmente amplificadas durante a PCR (Thalmann *et al.*, 2004). Iniciadores conhecidos como “universais”, construídos baseados em estratégias que

remontam a seqüência ancestral, podem ser particularmente suscetíveis a amplificação de NUMTs (Zhang & Hewitt, 1996; Sorenson & Quinn, 1998). Tem sido sugerido que iniciadores com alguns sítios degenerados (Sorenson *et al.*, 1999) e amplificações iniciais de fragmentos longos (Sorenson & Quinn, 1998), podem ajudar a amplificar preferencialmente o DNA mitocondrial.

1.9 O estado da arte em diferentes grupos animais

Para uma identificação de espécie baseada em seqüências nucleotídicas é necessária uma visão bastante acurada da história evolutiva e das relações filogenéticas dentro do gênero e da família animal que está sendo investigada, além das próprias seqüências estarem disponíveis no GenBank. Dentro do objetivo deste trabalho, foram enfatizadas sete famílias de maior importância para a justiça brasileira, sendo seis de mamíferos (Taylor & Dunstone, 1996; Nowak, 1997) e uma de aves (Forshaw, 1989; Beissinger & Snyder, 1992; Sick, 1997). Para espécies destas famílias buscou-se avaliar a utilização forense de seqüências de genes mitocondriais na identificação de espécies.

1.9.1 Ordem Psittaciformes; Família Psittacidae

Os psitacídeos (família Psittacidae) estão entre as aves de maior importância forense. As aves desta família, popularmente conhecidas como araras, papagaios, periquitos, caturritas e maritacas, são muito visadas pelo comércio ilegal de animais, sobretudo para servirem de animal de estimação, com sérias conseqüências para a sua conservação (Thomsen & Mulliken, 1992). Elas possuem coloridos variados e belos e emitem sons bastante peculiares (Forshaw, 1989), característica que tem levado a extensa retirada de papagaios do gênero *Amazona* da natureza. As grandes araras, dos gêneros *Ara*, de diversas cores, e

Anodorhynchus, as araras-azuis, alcançam elevados preços no comércio ilegal. As espécies da família Psittacidae que não estão relacionadas no anexo I da CITES encontram-se relacionadas no anexo II, dado o elevado grau de ameaça que esta família corre (Beissinger & Snyder, 1992; CITES, 2001). Existem mais de 100 espécies de psitacídeos na América do Sul, sendo que 73 destas ocorrem no Brasil (Sick, 1997). A filogenia molecular dos psitacídeos que ocorrem no país vem sendo particularmente estudada pelo grupo coordenado pela pesquisadora Cristina Miyaki, da Universidade de São Paulo.

Os psitacídeos podem ser divididos entre os psitacídeos do Velho Mundo e os do Novo Mundo. Os gêneros que ocorrem nas Américas – tribo Arini (Collar, 1997) – são exclusivos, assim como os que ocorrem na África, Eurásia e Oceania não ocorrem no Novo Mundo. Esta divergência entre os dois grupos de psitacídeos, primeiramente verificada segundo dados morfológicos, pode ser verificada e datada (ocorreu há cerca de 76 milhões de anos, Miyaki *et al.*, 1998) por meio de seqüências de genes mitocondriais. Entre os psitacídeos do Novo Mundo, uma segunda divergência também pode ser claramente verificada: a separação entre os psitacídeos de cauda longa e os de cauda curta (Montón, 1977), ocorrida há cerca de 50 milhões de anos, também verificada com o uso de genes mitocondriais (Miyaki, 1996; Miyaki *et al.*, 1998).

Recentemente, os gêneros *Aratinga* e *Amazona*, que estão entre os mais complexos e com maior número de espécies, tiveram sua filogenia investigada usando genes mitocondriais (Ribas & Miyaki, 2004; Russello & Amato, 2004, respectivamente).

Sete espécies de psitacídeos do Novo Mundo foram estudadas no presente trabalho, cinco das quais ainda não tinham qualquer seqüência depositada no *GenBank*.

1.9.2 Ordem Carnivora; Família Felidae

Os felídeos estão entre os animais silvestres que mais fascinam os homens e também os que mais sofrem com isso. Não bastasse o sério risco que os grandes felinos sofrem com a destruição de habitats, em virtude desses carnívoros necessitarem de grandes áreas e recursos para sobreviver e procriar, estas espécies sofrem com a caça ilegal, com o tráfico de peles, tráfico de dentes, especialmente os caninos e, em algumas regiões, com o tráfico de ossos, supostamente medicinais (Bowles, 1996; Wetton *et al.*, 2004).

Toda a família Felidae encontra-se no anexo II da CITES, com exceção das espécies que estão no anexo I e do gato doméstico (*Felis catus*) (CITES, 2001).

A filogenia e evolução dos felídeos têm sido bastante estudadas com o uso de genes mitocondriais, particularmente pelo grupo comandado pelo pesquisador Stephen O'Brien, sendo que atualmente são reconhecidas cinco linhagens de felídeos (Janczewski *et al.*, 1995, Masuda *et al.*, 1996, Johnson & O'Brien, 1997).

Apesar de ser um dos grupos animais com a filogenia mais bem conhecida, a seqüência do gene do citocromo b do jaguarundi (*Herpailurus yaguaroundi*) e do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) eram desconhecidas até o presente trabalho.

1.9.3 Ordem Artiodactyla; Famílias Cervidae

Dentro da diversa ordem Artiodactyla encontram-se duas das famílias mais visadas pelos caçadores no Brasil: a família Cervidae, dos veados, e a família Tayassuidae, dos porcos-do-mato.

Os estudos de filogenia molecular conduzidos com a família Cervidae têm dado ênfase principalmente aos grupos que não ocorrem no Brasil (Randi *et al.*, 1998; Ludt *et al.*, 2004; Pitra *et al.*, 2004) ou avaliando a filogeografia de determinadas espécies usando a região controle do mtDNA (Moscarella *et al.*, 2003; Randi *et al.*; 2004). Dentre os cervídeos, os seis

gêneros (*Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Odocoileus*, *Ozotocerus* e *Pudu*) que ocorrem na América do Sul, juntamente com o caribu (gênero *Rangifer*), formam a tribo Odocoileini dentro da subfamília Odocoileinae (Groves & Grubb, 1987) (apesar de Randi *et al.*, 2004 referirem-se às tribos de Odocoileinae como subfamílias, a classificação de Groves & Grubb (1987) continua válida; Colin Groves, comunicação pessoal).

A espécie mais ameaçada do grupo no Brasil, o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), e uma espécie de um dos gêneros com a taxonomia mais controversa (*Mazama gouazoupira*) cujas seqüências do gene do citocromo b eram desconhecidas, foram duas das espécies estudadas.

1.9.4 Ordem Artiodactyla; Família Tayassuidae (Dicotylidae)

Os tayassuídeos, popularmente conhecidos como porcos-do-mato, apesar de não pertencerem à família Suidae, tradicionalmente são divididos em dois gêneros (*Catagonus* e *Tayassu*) (Nowak, 1997), sendo que no Brasil ocorrem duas espécies do gênero *Tayassu*: o cateto (*Tayassu tajacu*) e a queixada (*Tayassu pecari*). Segundo Grubb & Groves (1993) o nome correto da família é Dicotylidae, mas a maioria dos trabalhos consultados refere-se a este grupo como Tayassuidae.

Um trabalho feito com citocromo b (Theimer & Keim, 1998), no entanto, reforça uma antiga idéia (Wilson & Reeder, 1993) de que o cateto e a queixada pertencem a gêneros diferentes e recomenda a adoção do nome *Pecari tajacu* ao cateto. Apesar de haverem duas seqüências de cateto no *GenBank*, nenhuma delas foi obtida de indivíduo isolado na América do Sul. A inclusão do cateto em nosso trabalho levou a resultados inesperados.

I.9.5 Ordem Xenarthra (Edentata); Família Myrmecophagidae

A ordem Xenarthra (ou Edentata), possui três linhagens facilmente distinguíveis, seja por caracteres morfológicos ou moleculares: os tatus, os tamanduás e as preguiças. As trinta espécies desta ordem que ainda vivem são relíquias de uma grande variedade de formas que viveu no passado da América do Sul (Delsuc *et al.*, 2002). As preguiças (família Bradypodidae; gêneros *Bradypus* e *Choleopus*) e os tamanduás (família Myrmecophagidae; gêneros *Cyclopes*, *Myrmecophaga* e *Tamandua*) formam a subordem Pilosa e as poucas espécies deste grupo encontram-se ameaçadas de extinção. A subordem Cingulata, família Dasypodidae é composta por 21 espécies de tatus, bastante procurados pela caça ilegal, sendo o tatu-canastra (*Priodontes maximus*), a espécie mais ameaçada de extinção. A família Dasypodidae pode ser dividida nas subfamílias Dasypodinae (gênero *Dasyopus*), Tolypeutinae (gêneros *Tolypeutes*, *Cabassous* e *Priodontes*) e Euphractinae (gêneros *Zaedyus*, *Chaetophractus* e *Euphractus*) (Delsuc *et al.*, 2003).

Dentro da família Myrmecophagidae, apenas uma espécie de cada gênero habita o Brasil (*Cyclopes didactylus*, o tamanduá, *Myrmecophaga tridactyla*, o tamanduá-bandeira e *Tamandua tetradactyla*, o tamanduá-mirim). A única sequência de *cytb* da família disponível no *GenBank* é a de tamanduá-mirim, cujo DNA mitocondrial inteiro já foi seqüenciado.

O tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), uma das espécies mais ameaçadas da fauna brasileira, cuja sequência do gene citocromo b era desconhecida, foi uma das espécies estudadas.

I.9.6 Ordem Primates; Subordem Platyrrhini (Primates do Novo Mundo)

Os primatas são bastante capturados da natureza, tanto para serem utilizados em pesquisa biomédica como para servirem de animal de estimação, sendo para este fim mais apreciados os micos e sagüis.

Segundo a classificação tradicional (Wilson & Reeder, 1993; Nowak, 1997), duas são as famílias de primatas silvestres que habitam as Américas: a família Cebidae e a família Callitrichidae. Juntas, formam a subordem Platyrrhini. Grande parte destes primatas do Novo Mundo encontra-se ameaçada de extinção.

Os estudos filogenéticos mais recentes (Goodman *et al.*, 1998; Schneider, 2000; Schneider *et al.*, 2001), entretanto, mudaram completamente a classificação dos Primatas do Novo Mundo. Os platirrinos são, segundo estes estudos, divididos nas famílias Cebidae (subfamílias Cebinae, Aotinae e Callitrichinae), Pitheciidae (subfamília Pitheciinae) e Atelidae (subfamília Atelinae).

Segundo Rylands e colaboradores (2000), existem 18 gêneros (*Cebuella*, *Mico*, *Callithrix*, *Saguinus*, *Leontopithecus*, *Callimico*, *Saimiri*, *Cebus*, *Aotus*, *Callicebus*, *Pithecia*, *Chiropotes*, *Cacajao*, *Alouatta*, *Ateles*, *Lagothrix*, *Oreonax* e *Brachyteles*) e 110 espécies de primatas do Novo Mundo.

Três das espécies de Cebidae relacionadas na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção pertencem ao gênero *Cebus* (*C. robustus*, *C. xanthosternos* e *C. kaapori*) e não dispõem de qualquer seqüência de gene mitocondrial no *GenBank*. *Cebus xanthosternos* (macaco-prego-de-peito-amarelo), adicionalmente, apresenta o problema de sua classificação ainda ser discutida, alguns autores argumentando tratar-se de uma subespécie de *Cebus apella* (macaco-prego) (Seuánez *et al.*, 1986). Esta espécie foi, portanto, incluída neste estudo.

1.10 Outros usos forenses da identificação de espécies usando seqüências de genes mitocondriais

Não só nos crimes contra a fauna a identificação de espécies usando seqüências de genes mitocondriais pode ser útil para a Justiça.

A técnica já foi utilizada para detectar adulterações fraudulentas em produtos alimentares como leite de cabra (Bania *et al.*, 2001), queijo (Branciarri *et al.*, 2000; Maudet & Taberlet, 2001), caviar (Birstein *et al.*, 1998) e pescados (Hold *et al.*, 2001). Wang e colaboradores (2004), utilizaram seqüências de citocromo b para identificar a origem dos produtos na ração de cães e gatos e avaliar o risco da transmissão de encefalopatia espongiforme bovina (“síndrome da vaca louca”).

A identificação das espécies de larvas e pupas de insetos encontrados em cadáveres para a determinação do intervalo *post-mortem* normalmente é feita a partir das características morfológicas dos indivíduos adultos emergidos após cultivo em laboratório (Catts & Haskell, 1991; Oliveira-Costa, 2003). No entanto, os insetos ainda imaturos, os pupários vazios e fragmentos destes insetos podem ser identificados a partir das seqüências dos genes mitocondriais (Sperling *et al.*, 1994; Malgorn & Coquoz, 1999; Wells *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2003a).

Percebendo que a grande maioria dos estudos de filogenia molecular aplicados à entomologia forense foram feitos com indivíduos isolados em outras regiões do globo, acrescentamos a espécie de maior importância forense no país (*Chrysomya albiceps*, uma espécie de varejeira) em nosso estudo. Deste modo, pretendemos lembrar que, apesar de focarmos nossas discussões na identificação de aves e mamíferos objetos de crimes contra a fauna, muitas de nossas observações podem ser estendidas para outros fins e outros táxons.

II OBJETIVOS

II.1 *Objetivo geral*

Utilizar e avaliar a técnica de identificação de espécies baseada em comparação de seqüências de genes mitocondriais para uso na investigação de crimes contra a fauna brasileira.

II.2 *Objetivos específicos*

Avaliar a eficiência da metodologia empregando-a em um caso real de identificação de espécies, vítimas de crime contra a fauna.

Comparar a disponibilidade e a eficiência dos genes mitocondriais do citocromo b (*cytb*) e da subunidade I da citocromo c oxidase (*coI*), assim como os iniciadores disponíveis na literatura para investigação forense.

Avaliar a utilização da análise filogenética na identificação de espécies.

Gerar seqüências de *cytb* de espécies relevantes da fauna brasileira e depositar no *GenBank*.

Contextualizar filogeneticamente as seqüências obtidas dentre as disponíveis no *GenBank*.

Comparar o uso do *blast* e da análise filogenética no direcionamento para obtenção de novas amostras, supondo que a espécie não fosse conhecida.

Estimar e comparar a diversidade nucleotídica do gene mitocondrial selecionado entre espécies dentro de um gênero e entre duas populações de indivíduos de uma mesma espécie.

Sugerir procedimentos para a identificação de espécies cuja seqüência não está no *GenBank*.

III MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 *Material biológico de referência:*

Amostras taxonomicamente identificadas das aves *Amazona xanthops* (papagaio-galego), *Ara chloroptera* (arara-vermelha), *Ara glaucogularis* (arara-de-garganta-azul), *Ara macau* (arara-canga) e *Pionus maximiliani* (maritaca-verde) e dos mamíferos dos mamíferos *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal), *Cebus xanthosternos* (macaco-prego-de-peito-amarelo), *Herpailurus yagouaroundi* (jaguarundi), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno), *Mazama gouazoupira* (veado-catingueiro), *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira) e *Pecari tajacu* (cateto) foram utilizadas como amostras de referência. Amostras de *A. glaucogularis* foram obtidas no Zoológico do Rio de Janeiro, as amostras de *B. dichotomus* e de *M. tridactyla* foram gentilmente cedidas pela prof^a. Dra. Rosane Colevatti e as demais amostras foram obtidas no Zoológico de Brasília. As amostras biológicas foram derivadas de diferentes tecidos: sangue armazenado em etanol absoluto (*A. glaucogularis*), penas (*A. macao*), esfregaço de células do epitélio oral (*C. apella* e *H. yagouaroundi*), DNA extraído de sangue periférico (*B. dichotomus* e *M. tridactyla*) e sangue periférico em papel FTA (demais espécies).

Apenas uma amostra de cada espécie foi obtida no Zoológico de Brasília e no Zoológico do Rio de Janeiro e a suposta origem geográfica dos animais foi considerada, apenas de forma ampla, como sendo o Brasil. No entanto, da espécie *M. tridactyla* foram analisados 48 indivíduos, sendo 28 originários do Parque Nacional das Emas, GO, e 20 do Parque Nacional da Serra da Canastra, MG, e da espécie *B. dichotomus*, foram analisados 2 indivíduos originários de Porto Primavera, SP.

Sinônimos taxonômicos foram encontrados na literatura para algumas das espécies estudadas, entre eles os seguintes: *Salvatoria xanthops* (*Amazona xanthops*), *Ara chloropterus*

(*Ara chloroptera*), *Tayassu tajacu* (*Pecari tajacu*), *Cebus apella xanthosternos* (*Cebus xanthosternos*).

Tabela III.1. Relação de amostras referência oriundas de animais taxonomicamente identificados em base morfológica e os respectivos materiais biológicos utilizados. “FTA” representa o papel FTA[®] (Whatman). As letras após a barra indicam a origem do material biológico: BSB-Zoológico de Brasília; RJ-Zoológico do Rio de Janeiro; PP-Porto Primavera/SP; PNE-Parque Nacional das Emas/GO e SC-Parque Nacional da Serra da Canastra/MG.

Grupo	Espécie	Nome popular	Material biológico
Psittacidae (Aves)	<i>Amazona xanthops</i>	papagaio-galego	sangue em FTA/BSB
	<i>Ara chloroptera</i>	arara-vermelha	sangue em FTA/BSB
	<i>Ara glaucogularis</i>	arara-de-garganta-azul	sangue em etanol/RJ
	<i>Ara macao</i>	arara-canga	penas/BSB
	<i>Pionus maximiliani</i>	maritaca-verde	sangue em FTA/BSB
Cebidae	<i>Cebus xanthosternos</i>	macaco-prego-de-peito-amarelo	epitélio oral/BSB
Cervidae	<i>Blastocerus dichotomus</i>	cervo-do-pantanal	DNA extraído/PP
	<i>Mazama gouazoupira</i>	veado-catingueiro	sangue em FTA/BSB
Felidae	<i>Herpailurus yagouaroundi</i>	jaguarundi	epitélio oral/BSB
	<i>Leopardus tigrinus</i>	gato-do-mato-pequeno	sangue em FTA/BSB
Myrmecophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	DNA extraído/PNE/SC
Tayassuidae	<i>Pecari tajacu</i>	cateto	sangue em FTA/BSB

III.2 Material biológico questionado na investigação forense:

Foram obtidas amostras de embriões de 58 ovos de espécie desconhecida de ave. Os ovos investigados foram apreendidos pelo Departamento de Polícia Federal em Recife/PE. Os ovos foram congelados e enviados a Brasília após a constatação da morte dos embriões. Após os ovos serem abertos, os embriões foram fracionados e as frações armazenadas em etanol absoluto a - 20°C.



Figuras III.1 e III.2. Fotografias do traficante de animais preso pela Polícia Federal em Recife, evidenciando a forma como os ovos estavam sendo transportados no momento da prisão.



Figura III.3. Fotografia da remessa de 58 ovos apreendidos pela Polícia Federal em Recife e recebidos congelados em Brasília.

III.3 Sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank:

As seqüências nucleotídicas dos genes citocromo b e subunidade I da citocromo c oxidase disponíveis no *GenBank* (Benson *et al.*, 2000), utilizadas para comparação e análises filogenéticas, foram obtidas com auxílio da ferramenta de busca *Entrez nucleotide*. Seqüências de grupos taxonômicos definidos foram obtidas com auxílio da ferramenta *taxonomy*, ambas acessíveis no endereço www.ncbi.nih.gov (Wheeler *et al.*, 2000).

III.4 Extração de DNA:

Para extração de DNA das amostras referência e questionadas foi utilizado o método descrito por Müllenbach (1989). Este método, além da precipitação com sal, possui uma etapa de extração orgânica, mas não utiliza fenol, evitando a exposição a este composto. Os tecidos embrionários dos ovos e as penas de *A. macao* foram submetidos a uma maceração prévia com nitrogênio líquido.

Brevemente, o protocolo consiste em uma digestão do macerado em tampão SE (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0) com SDS 1%, à 55°C. Depois da digestão, adiciona-se uma solução saturada de NaCl (6 M), pré-aquecida, até uma concentração de 1,5 M, seguida de uma leve mistura. As proteínas são extraídas adicionando-se 1 volume de clorofórmio e misturando por 30 a 60 min com uma rotação suave. A separação das fases é feita com uma centrifugação a 2000 r.p.m. em uma centrífuga de mesa. O sobrenadante é transferido para um tubo novo, estéril, e precipitado com a adição de 1 volume de isopropanol a temperatura ambiente e com uma leve agitação. O precipitado é lavado com etanol 70 % e ressuspenso em TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5).

O DNA extraído foi verificado quanto à qualidade e quantidade com uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, visualizado em um transluminador UV, comparando-se as amostras de DNA extraídas com padrões de quantidades conhecidas de DNA do fago lambda.

III.5 Amplificação:

As amplificações de fragmentos de DNA dos genes mitocondriais citocromo b (*cytb*) e da subunidade I da citocromo c oxidase (*coI*) foram realizadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR – Saiki *et al.*, 1985), utilizando diferentes conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela III.2 e Figura III.4).

Tabela III.2: Pares de iniciadores de PCR avaliados e utilizados para amplificação de trechos dos genes mitocondriais citocromo b (*cytb*) e da subunidade I da citocromo c oxidase (*coI*).

Gene	Nome	Seqüência do iniciador	Referência
<i>Cytb</i>	cytbF	5' CCATCCAACATCTCCGCATGATGAAA	Branicki et al, 2003
	cytbR	5' CCCCTCAGAATGATATTTGGCCTCA	
	L14724	5' CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	Kocher et al, 1989
	H15149	5' AAAGTGCAGCCCCTCAGAATGAATATTTGTCCTCA	
	Mcb398	5' TACCATGAGGACAAATATCATTCTG	Verma & Singh, 2003
	Mcb869	5' CCTCCTAGTTTGTAGGGATTGATCG	
<i>CoI</i>	LCO1490	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> , 1994
	HCO2198	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	

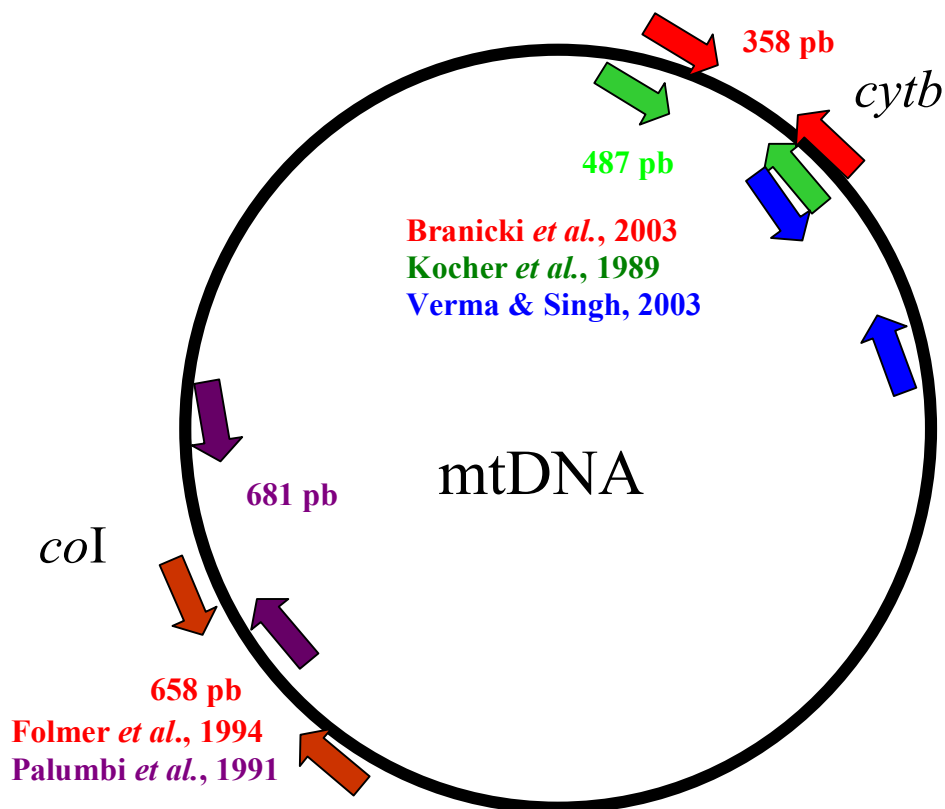


Figura III.4. Representação esquemática da posição dos iniciadores de PCR utilizados para amplificação dos genes mitocondriais. A posição zero, localizada na região controladora, encontra-se na extremidade superior do círculo.

As condições de amplificação seguiram as indicações de Branicki e colaboradores (2003). Foram utilizados 1,25 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), 200 μ M de dNTP, 3,1 μ M de cada iniciador, 2,5 μ L de tampão de PCR 10 X concentrado com uma concentração final de 1,5 mM de $MgCl_2$. Nas amplificações utilizando os iniciadores descritos por Folmer e colaboradores (1994), foi adicionado $MgCl_2$ para uma concentração final de 2 mM (Arnheim & Erlich, 1992).

As ciclagens de temperatura seguiram as recomendações do mesmo autor, consistindo em 2 min a 94°C, 34 ciclos de 20 s a 94°C, 30 s a 51°C e 40 s a 72°C, 10 min a 72°C. Foram testados, ainda, os programas de termociclagem descritos por Hebert e colaboradores (2003), Verma & Singh (2003) e Hsieh e colaboradores (2001). Estes últimos mostraram-se igualmente eficientes, porém mais demorados, sendo abandonados. As ciclagens de temperatura foram realizadas em termociclador 9700 (Applied Biosystems).

O produto da reação de PCR foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizado em um transluminador UV e a quantidade de produto estimada visualmente pela comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago lambda.

III.6 Purificação do produto da PCR:

Antes da reação de seqüenciamento os produtos da reação em cadeia da polimerase foram purificados com as enzimas exonuclease I (exo I) e fosfatase alcalina de camarão (sAP) (Werle *et al.*, 1994). A enzima exo I digere o excesso de oligonucleotídeos iniciadores da PCR, enquanto a sAP defosforila o excesso de dNTPs. Cinco unidades de sAP e 2 unidades de exo I foram adicionados a 7 μ L de produto da reação de PCR, homogeneizados e incubados a 37°C por 40 min, seguido de uma inativação das enzimas a 80°C por 15 min.

III.7 Seqüenciamento:

A reação de seqüenciamento foi realizada pelo método de terminação de cadeia (Sanger, 1988) utilizando dideoxinucleotídeos trifosfatados marcados com fluoróforos em formulações comerciais. Na primeira etapa do trabalho, foi utilizado o kit Big Dye v 3.1 (Applied Biosystems) e a eletroforese e a leitura da fluorescência realizadas em um analisador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Na segunda etapa, foram utilizados o kit Dynamic ET (Amersham Biosciences) e o seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems).

III.8 Controle de qualidade das seqüências obtidas:

Todas as seqüências obtidas tiveram sua qualidade avaliada com o programa Phred (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998). Apenas as seqüências com qualidade phred superior a 20 foram utilizadas nas análises subsequentes.

III.9 Comparação com as seqüências disponíveis no GenBank:

As seqüências obtidas foram confrontadas com as disponíveis no *GenBank* utilizando a interface virtual do programa blast (Altschul *et al.*, 1990) disponível no endereço www.ncbi.nih.gov/blast.

III.10 Alinhamento e edição das seqüências:

Os alinhamentos das seqüências nucleotídicas utilizadas neste trabalho foram feitos com a interface virtual do programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) disponível no endereço www.ebi.ac.uk/clustalw. As visualizações e edições dos alinhamentos foram realizadas utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999).

III.11 Similaridade entre as seqüências:

A similaridade entre as seqüências, representada em porcentagem (%), corresponde ao número de posições nucleotídicas idênticas dividido pelo total de posições comparadas, multiplicado por 100. Trata-se do inverso da distância-p, multiplicado por 100.

III.12 Análises filogenéticas:

As análises filogenéticas (Nei & Kumar, 2000) foram conduzidas com o programa Mega 2 (Kumar et al., 2001). Foram utilizados os métodos de construção de árvores filogenéticas baseados em distâncias UPGMA, Agrupamento de Vizinhos (NJ – Saitou & Nei, 1987) e Evolução Mínima (ME) com os modelos de substituição nucleotídica distância-p e Kimura-2-parâmetros (K2P - Kimura, 1980) e o método de Máxima Parcimônia. Em geral, foram utilizadas tanto as transversões quanto as transições, mas as análises em que foram utilizadas apenas transversões estão identificadas na legenda das árvores filogenéticas. Os testes de confiança das topologias filogenéticas encontradas foram realizados com a análise de bootstrap (Felsenstein, 1985).

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Análise comparativa da abundância e similaridade interespecífica de seqüências de citocromo b e citocromo oxidase I no GenBank

A primeira comparação feita entre os genes mitocondriais do citocromo b (*cytb*) e da subunidade I da citocromo c oxidase (*coI*) realizada foi a verificação da presença da seqüência destes genes no *GenBank*. A busca foi feita no táxon de maior interesse forense, Amniota, vertebrados conhecidos como répteis, aves e mamíferos. O táxon foi dividido em dois para verificar se havia alguma influência maior de algum dos dois subgrupos: Mammalia, os mamíferos e Sauropsida, aves e répteis (Tabela IV.1).

Tabela IV.1: Número de seqüências de *cytb* e *coI* depositadas no *GenBank* até 01/10/2004.

Grupo	<i>cytb</i>	<i>coI</i>
Amniota	28863	7314
Mammalia	15308	4402
Sauropsida	13555	2912

Verificou-se que o número de seqüências de citocromo b no *GenBank* é substancialmente maior que de *coI*, tanto em Mammalia quanto em Sauropsida. Levando em consideração apenas este critério, a análise do gene *cytb* é mais útil do que a análise do gene *coI* na identificação de espécies, pois há uma maior probabilidade, cerca de quatro vezes maior, de a seqüência de uma espécie de Amniota qualquer a ser determinada já estar disponível no *GenBank*.

A vantagem *a priori* do uso do *cytb* em relação ao *coI* na investigação forense poderia ser suplantada caso o gene *coI* tivesse um poder substancialmente maior de discriminar

espécies próximas. Para testar a hipótese nula dos genes *coI* e *cytb* serem igualmente eficientes na distinção entre espécies próximas, foi estimada a similaridade entre seqüências destes genes entre espécies do mesmo gênero. Para minimizar o risco de utilizar seqüências de pseudogenes mitocondriais nucleares (NUMTs) nesta análise, foram selecionados apenas espécies com genoma mitocondrial completo disponível.

Uma busca de todos os gêneros de Amniota com mais de uma espécie com a seqüência do genoma mitocondrial completo resultou em 15 gêneros, sendo 1 de répteis, 4 de aves e 10 de mamíferos (Tabela IV.2)

Tabela IV.2. Similaridade (%) entre seqüências de *cytb* e *coI* entre espécies do mesmo gênero. Nos gêneros com mais de duas espécies com mtDNA completo optou-se pelas espécies mais próximas. Análise realizada com base no *GenBank* atualizado até o dia 01.10.04.

Gênero	Nome-popular	<i>cytb</i>	<i>coI</i>
<i>Alligator</i>	Jacarés	83,66	87,39
<i>Macaca</i>	Macacos	87,64	89,04
<i>Coturnix</i>	Codornas	88,54	88,85
<i>Pteropus</i>	Morcegos	89,91	88,41
<i>Ochotona</i>	Lebres	91,30	89,95
<i>Equus</i>	Cavalo e asno	92,28	92,94
<i>Balaenoptera</i>	Baleia-azul e baleia-fin	92,28	92,59
<i>Muntiacus</i>	Veados	94,39	95,34
<i>Pan</i>	Chimpanzé e bonobo	94,83	96,11
<i>Apteryx</i>	Kiwis	95,00	94,00
<i>Casuaris</i>	Casuares	96,40	97,61
<i>Ciconia</i>	Cegonhas	96,5	98,07
<i>Rhinolophus</i>	Morcegos	97,54	96,89
<i>Ursus</i>	Urso-polar e urso-pardo	97,81	98,19
<i>Bos</i>	Boi e zebu	98,33	98,90
Média		93,09	92,96

Um teste t pareado não encontrou diferença significativa na similaridade média entre seqüências de diferentes espécies do mesmo gênero entre os dois genes. Não foi possível rejeitar a hipótese nula dos genes *coI* e *cytb* serem igualmente eficientes na distinção entre espécies próximas. Esta análise, entretanto, não testou a afirmação de Hebert e colaboradores (2003), de que o gene *coI* seria capaz de reproduzir filogenias mais profundas que o gene *cytb*. Esta característica, apesar de útil, não é fundamental na identificação forense de espécies, onde o principal desafio é distinguir espécies de mesmo gênero ou gêneros próximos. Além disso, tanto o *coI* como o *cytb* podem ser classificados na categoria de genes mitocondriais que codificam proteínas de menor poder na reconstrução de filogenias antigas, sendo outros genes mais indicados para este fim (Zardoya & Meyer, 1996).

IV.2 Diversidade intra-específica de citocromo b a partir de seqüências do GenBank

Com base na estimativa da similaridade média de seqüências de citocromo b entre espécies do mesmo gênero ser aproximadamente de 93 % (Tabela IV.2), a identificação de espécies usando este gene só seria útil caso a similaridade dentro de uma mesma espécie fosse maior que isso.

Foram selecionadas, então, as espécies de Amniota representadas no *GenBank* com pelo menos 15 seqüências completas de *cytb*. Foram encontradas 6 espécies preenchendo esses requisitos, sendo 5 de mamíferos e 1 de aves. Uma análise de similaridade foi realizada (Tabela IV.3).

Tabela IV.3. Similaridade (%) entre seqüências de citocromo b entre indivíduos da mesma espécie Análise realizada com base no *GenBank* atualizado até o dia 01.10.04.

<i>Espécie</i>	<i>Nº indivíduos</i>	<i>Média</i>	<i>Mínima</i>
<i>Anser cygnoides</i> (ganso)	15	99,99	99,91
<i>Homo sapiens</i> (homem)	202	99,68	98,94
<i>Sus scrofa</i> (porco)	20	99,05	97,63
<i>Microtus oeconomus</i> (roedor)	49	98,31	96,48
<i>Cervus elaphus</i> (cervídeo)	15	96,72 (99,43)*	94,30 (98,16)*
<i>Tragulus javanicus</i> (trágulo)	20	94,67	91,40

(*) Similaridade dentro de subespécies (Ludt *et al.*, 2004).

Conforme esperado, devido a própria natureza da categoria “espécie” (Dobzhansky, 1937), a similaridade dentro de uma mesma espécie é maior do que aquela entre espécies do mesmo gênero. Apenas duas das espécies selecionadas apresentam similaridade média entre indivíduos menor que 98%. Segundo Ludt e colaboradores (2004), uma destas espécies, *Cervus elaphus*, um cervídeo, possui diversas subespécies. Quando as seqüências são agrupadas de acordo com as subespécies propostas, a similaridade média de *cytb* dentro de cada subespécie sobe para 99,43%. De fato, uma análise ainda mais recente feita por Pitra e colaboradores (2004), adicionando seqüências de mais espécies aos dados de Ludt *et al.* (2004), conclui que *Cervus elaphus* não é um grupo monofilético e propõe a divisão deste grupo em pelo menos três espécies. Em relação às seqüências de *cytb* do artiodáctilo *Tragulus javanicus* (trágulo-malaio), não foram encontradas maiores informações. As seqüências disponíveis foram submetidas ao *GenBank* sem estarem vinculadas a uma publicação. Meijaard e Groves (2004), no entanto, reconhecem que a taxonomia de *Tragulus* é complexa e após uma análise morfométrica de 338 crânios do gênero concluem que *Tragulus javanicus* trata-se, na verdade, de um grupo de três espécies, provisoriamente divididas em 16

subespécies. Desta forma, a grande variação encontrada entre as seqüências de *Tragulus* pode ser explicada pelo fato de não serem de uma única espécie e pela complexa história natural do grupo, envolvendo uma grande radiação evolutiva a cerca de 11,5 milhões de anos, alcançando cerca de 57 espécies (Barry *et al.*, 1991), e a distribuição geográfica descontínua por diversas ilhas e penínsulas do sul e sudeste asiáticos.

Considerando-se, então, as subespécies de *Cervus elaphus* como espécies e excluindo-se o gênero *Tragulus*, foi estimada uma similaridade média de 99,3% entre indivíduos de uma mesma espécie.

O fato de duas das seis “espécies” selecionadas apresentarem incertezas taxonômicas e uma alta variação nas seqüências de *cytb* pode dar a falsa impressão de a identificação molecular ser falha para cerca de um terço das espécies. Na verdade, a interpretação mais plausível seria justamente o oposto. A análise realizada confirmou que o polimorfismo de seqüências de citocromo b dentro de uma mesma espécie é tão reduzido que simplesmente impossibilita a detecção de diferenças entre indivíduos (vide o item sobre a análise de variação entre indivíduos de tamanduá-bandeira). É justamente nas espécies que fogem à regra e com incertezas taxonômicas que o citocromo b é mais útil para encontrar variação entre indivíduos. O roedor da tundra, *Microtus oeconomus*, por exemplo, mantido na nossa análise, certamente só foi estudado com este marcador (Galbreath & Cook, 2004) por causa da sua história evolutiva peculiar, onde as populações da América e da Ásia ficaram isoladas após o término da última glaciação, e conseqüente divergência entre linhagens mitocondriais (a similaridade média entre os isolados de um mesmo continente sobe para 99,6% na Rússia e 99,3% na América do Norte). É por isso, então, que as seqüências depositadas no *GenBank* identificadas como pertencendo às espécies *Tragulus javanicus* e *Cervus elaphus*, mesmo representando um terço das selecionadas, podem ser consideradas exceções no quadro existente da diversidade de Amniota como um todo.

A similaridade média de seqüências de *cytb* entre indivíduos dentro de uma espécie superior à similaridade entre espécies de um mesmo gênero, reflete o padrão evolutivo das linhagens de mtDNA (Awise *et al.*, 1987) e configura a coesão do táxon “espécie”, sendo o fluxo gênico maior dentro do que entre espécies (Dobzhansky, 1939; Takahata & Slatkin, 1984). Os resultados encontrados nas análises descritas confirmam a utilidade geral deste tipo de marcador na identificação de espécies, mas ao mesmo tempo evidenciam uma grande heterogeneidade na eficiência desta análise de acordo com o grupo analisado. Com base neste resultado foi realizada e descrita mais à frente, uma investigação mais detalhada da aplicação dos genes mitocondriais estudados em alguns grupos da fauna brasileira de maior importância do ponto de vista de combate a crimes contra a fauna.

IV.3 Obtenção das Amostras e Extração do DNA

A origem e a natureza das amostras biológicas obtidas estão relacionadas no item 3.1. Os contatos mantidos com outras instituições, como o RENTAS, a PROCARNÍVOROS, o Museu Paraense Emílio Goeldi e o IBAMA, não resultaram na obtenção de amostras.

DNA amplificável pôde ser extraído dos tecidos amostrados com um único método de extração, que não usa fenol, substância mais tóxica utilizada na extração orgânica convencional (Sambrook *et al.*, 1989), nem utiliza reagentes ou colunas demasiadamente caros (Müllenbach *et al.*, 1989). Os tecidos biológicos a partir dos quais o DNA foi extraído com sucesso foram: tecidos embrionários diversos, sangue em papel FTA, sangue coagulado em etanol absoluto, extremidade basal de penas e células de epitélio oral em etanol absoluto. Na maior parte das extrações o DNA encontrava-se fragmentado e misturado com RNA, o que não representou empecilho para as ampliações subsequentes.

IV.4 Amplificação dos trechos de *cytb* e *coI* via PCR

Foi possível amplificar os segmentos desejados de todas as espécies avaliadas e com todos os pares de iniciadores testados. Além do uso dos iniciadores nos pares previamente determinados, foi possível amplificar fragmentos do citocromo b com a combinação dos iniciadores L14724 com mcb869, *cytbF* com H15149 e L14724 com *cytbR*.

IV.5 Qualidade das seqüências obtidas

A maior parte das seqüências obtidas apresentou qualidade phred superior a 20, sobretudo quando o segmento a ser seqüenciado era menor do que 400 pb. No âmbito deste trabalho, foram obtidas cerca de 100 seqüências de DNA mitocondrial de 14 espécies diferentes. Nenhuma das seqüências obtidas tinha códons mitocondriais de parada ou substituições de aminoácidos improváveis, não havendo qualquer evidência de se tratarem de inserções nucleares (NUMTs).

IV.6 Desempenho da análise de mtDNA na identificação de espécies de interesse forense da fauna brasileira: simulações com seqüências de mamíferos

IV.6.1 *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal)

Apesar dos estudos sobre a história evolutiva da família Cervidae serem realizados há séculos e o conhecimento da filogenia do grupo ter aumentado consideravelmente nos últimos anos, (Randi *et al.*, 1998; Ludt *et al.*, 2004; Pitra *et al.*, 2004), o conhecimento sobre a filogenia dos cervídeos que habitam a América do Sul (tribo Odocoileini) é escasso (Groves & Grubb, 1987). Ainda não havia sido disponibilizada qualquer seqüência de *Blastocerus dichotomus* (cervo-do-pantanal), a espécie brasileira mais ameaçada da família e uma das maiores vítimas da caça ilegal, no *GenBank*.

Foram obtidas, então, uma seqüência de 321 pb de um fragmento interno do *cytb* (Kocher *et al.*, 1989) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886748 e uma seqüência de 350 pb de um fragmento interno da região 3' do *cytb* (Verma & Singh, 2003) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886749.

Para nossa surpresa, a comparação com as seqüências disponíveis no *GenBank* revelou a presença de uma seqüência de *cytb* de *B. dichotomus*. A seqüência (gi:51702292) foi depositada em novembro de 2004, durante a etapa final desta dissertação. Se por um lado a antecipação de depósito por outro grupo de pesquisa tirou o ineditismo de seqüência gerada neste trabalho, por outro foi bom perceber que as seqüências de *cytb* dos cervídeos estão sendo mais estudadas e que o conhecimento a respeito da filogenia do grupo está aumentando.

A seqüência da porção 5' do gene foi exatamente igual àquela disponível no *GenBank*. A seqüência gerada de 350 pb da porção 3' do gene, entretanto, apresentou 7 diferenças em relação a seqüência depositada. Pelo menos duas dessas diferenças (C529G e A545C), no entanto, parecem ser erros de seqüenciamento na seqüência depositada por Pitra e colaboradores (2004). Tratam-se de transversões não-sinônimas, raríssimas entre espécies próximas (ainda mais entre indivíduos da mesma espécie), codificando aminoácidos não encontradas em nenhum outro cervídeo naquelas posições. Todas as seqüências de cervídeos obtidas até hoje, incluindo aquelas geradas neste trabalho, e com exceção da gi:51702292, apresentam um C na posição 529 e um A na posição 545, assim como 180 mamíferos, das mais diferentes famílias, aleatoriamente selecionados no *GenBank*. O A da posição 545, além de ser conservado em todos os mamíferos analisados, ainda é totalmente invariável em aves, crocódilios e nas tartarugas (não esquecendo que nestes 3 grupos a posição homóloga à 545 do *cytb* de mamíferos é a 548, pois o ATG de início da tradução encontra-se 3 pb a montante).

Pitra e colaboradores (2004), apesar de afirmarem utilizar protocolos de “DNA antigo” (*ancient DNA*) para evitar o risco de contaminações, não relatam o uso de qualquer controle

de qualidade de seqüência (ex. análise com o programa Phred), de modo que as discrepâncias encontradas na seqüência depositada sob o código gi:51702292 muito provavelmente correspondem a erros de seqüenciamento. Esta observação reforça a necessidade de sempre avaliar os procedimentos adotados para avaliação da qualidade de uma seqüência depositada em um banco de dados, particularmente em casos envolvendo investigação forense (Yao *et al.*, 2004), antes de proceder com comparações e declarações de identidade de espécies.



Figura IV.1. *Blastocerus dichotomus*, o cervo-do-pantanal. Espécie que, apesar de ameaçada de extinção, é freqüente vítima da caça ilegal no país.

IV.6.2 *Cebus xanthosternos* (macaco-prego-de-peito-amarelo)

Foi obtida uma seqüência de 399 pb de um fragmento interno do *cytb* (Kocher *et al.*, 1989) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886750.

Apesar de haver uma seqüência de *Cebus apella* de 301 pb do *cytb* no *GenBank*, a seqüência obtida, quando comparada às demais disponíveis no banco de dados por meio do *blast*, resulta como seqüência mais similar uma seqüência do DNA mitocondrial completo de *Cebus albifrons* (gi:13940255). No entanto, a similaridade percentual (inverso da distância p)

entre *C. xanthosternos* e *C. apella* (95%) é maior que aquela entre a obtida e *C. albifrons* (91%).

Isto ocorreu pelo fato de a seqüência obtida ser maior que a seqüência de *Cebus apella* disponível (gi: 1146319) e o algoritmo do *blast* valorizar alinhamentos mais longos (Altschul *et al.*, 1990).

A seqüência de *cytb* de *Cebus xanthosternos* obtida, além de contribuir para um maior entendimento da filogenia de *Cebidae*, mais particularmente do gênero *Cebus*, tem importantes implicações para a identificação forense de espécies, uma vez que esta espécie encontra-se ameaçada de extinção.

Segundo Hill (1960, p. 405-406):

“A classificação das numerosas formas do presente gênero [Cebus] é um dos mais vexatórios problemas na taxonomia dos primatas e tem sido assim desde o início. O fato foi comentado por cada estudioso do grupo, incluindo particularmente F. Cuvier (1819-24), I. Geoffroy Saint-Hilaire (1851), Burmeister (1854), Gray (1870) e Cabrera (1917). A principal causa da confusão é indubitavelmente a propensão dos macacos Cebus a variação individual, mais particularmente em certas populações. Esta é tanta que dificilmente dois indivíduos são parecidos. Algumas das variações devem-se a mudanças da idade; algumas são diferenças sexuais; algumas podem ser devido a hibridizações entre populações adjacentes, mas a grande maioria são puramente individuais e aparecem em membros da mesma linhagem criados em condições ambientais idênticas...”

Segundo Rylands e colaboradores (2000), as lamentações de Hill (1960) são tão válidas hoje quanto eram há 30 anos.

Rylands e colaboradores (2000), dividem o gênero em três espécies sem tufos na cabeça (*C. albifrons*, *C. capucinus* e *C. olivaceus*) e quatro espécies com tufos na cabeça (*C. apella*, *C. libidinosus*, *C. nigritus* e *C. xanthosternos*).

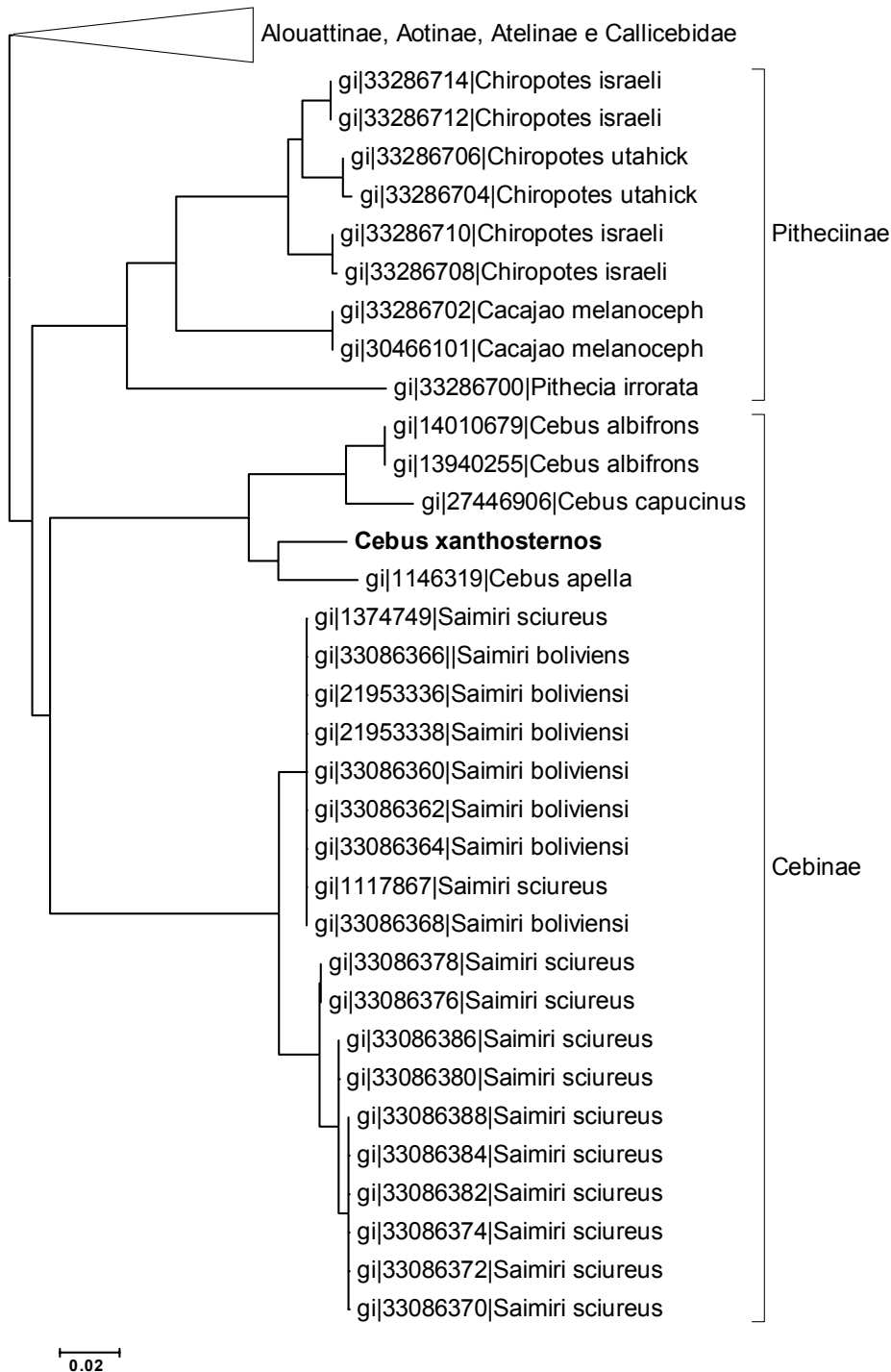


Figura IV.2. Árvore filogenética de seqüências de *cytb* de todos os cebídeos disponíveis no *GenBank*. Árvore construída com o programa Mega2 por meio do método de NJ usando a distância p, a partir de um alinhamento de 307 pb de seqüências de *cytb*. Os números após o “gi” representam os códigos de acesso das seqüências no *GenBank*. A seqüência de *Cebus xanthosternos*, em negrito, foi obtida neste trabalho.

Os resultados deste trabalho são concordantes com os dados dos cariótipos de *Cebus*, que mostram uma clara diferença entre um par de cromossomos de *C. apella* e *C. xanthosternos* (Seuánez *et al.*, 1986) e que, segundo Rylands e colaboradores (2000), apoiam a classificação de *C. xanthosternos* como uma espécie diferente de *C. apella*.

A única seqüência de *C. xanthosternos* disponível no *GenBank* até o presente trabalho era uma seqüência do gene SRY, localizado no cromossomo Y, depositada por Moreira (2002). Apesar de Moreira (2002) considerar *C. xanthosternos* uma subespécie de *C. apella*, a divergência de seqüência entre estas duas formas é similar àquela apresentada entre as duas espécies distintas de *Leontopithecus* (*L. rosalia* e *L. chrysomelas*) e de *Callithrix* (*C. jacchus* e *C. pygmaea*) estudadas. O agrupamento, em dois grupos distintos e aparentemente monofiléticos, dos *Cebus* com e sem tufo na cabeça, observado por Moreira (2002), também foi observado neste trabalho. Os resultados coincidentes da nossa análise com a análise de Moreira (2002), são ainda mais convincentes pela natureza completamente distinta de transmissão dos marcadores utilizados, sendo o mtDNA de herança materna e o SRY de herança paterna.

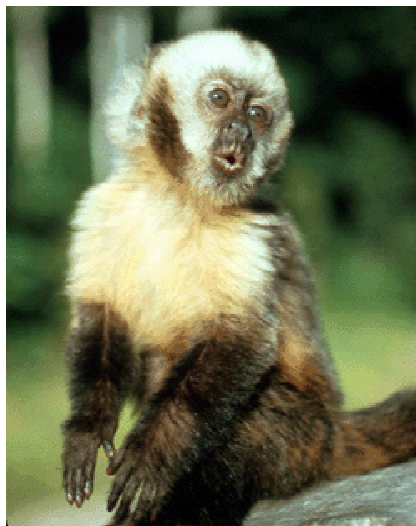


Figura IV.3. *Cebus xanthosternos*, o macaco-prego-de-peito-amarelo. Espécie de primata do Novo Mundo ameaçada de extinção.

Pelo fato de *Cebus xanthosternos* ter sua condição de espécie bastante questionada, sua distinção em relação a *C. apella* por meio de genes mitocondriais era uma incógnita completa. A condição de *C. xanthosternos* como espécie criticamente ameaçada de extinção (Rylands *et al.*, 2003), entretanto, torna a distinção entre as duas formas fundamental para a justiça. Os resultados deste trabalho indicam que as seqüências de genes mitocondriais podem ser úteis para a distinção entre essas duas formas.

Apesar de a seqüência obtida ser um avanço para a distinção entre as diferentes formas do gênero *Cebus*, Rylands e colaboradores (2000) indicam cerca de 33 formas no grupo, de modo que os estudos de filogenia molecular dentro do gênero estão apenas começando.

Enquanto os diversos trabalhos realizados com os primatas do Novo Mundo, utilizando diferentes abordagens, esclareceram muito bem a relação filogenética entre os gêneros, muitas relações intragenéricas ainda precisam ser elucidadas (Seuáñez *et al.*, 2005).

IV.6.3 *Herpailurus yaguaroundi* (jaguarundi)

Foi obtida uma seqüência de 307 pb de um fragmento interno do *cytb* (Branicki *et al.*, 2003) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886751.

A seqüência mais similar com a obtida encontrada no *GenBank* foi a de *Lynx pardinus*, uma espécie de lince (gi:20160340, 90% de similaridade), apesar de a espécie-irmã do jaguarundi ser o *Puma concolor* (puma ou onça-parda; Johnson & O'Brien, 1997).

Apesar de a família dos felídeos ser uma das mais bem estudadas do ponto de vista filogenético (Janczewski *et al.*, 1995, Masuda *et al.*, 1996, Johnson & O'Brien, 1997), a seqüência de *cytb* de *Herpailurus yaguaroundi* (jaguarundi) não havia sido previamente obtida.

Segundo Johnson e O'Brien (1997), utilizando seqüências de outros genes mitocondriais, a espécie irmã do jaguarundi é o puma (*Puma concolor*).

Para avaliar o poder de discriminação entre estas duas espécies com base no fragmento de 307 pb do *cytb* (Branicki *et al.*, 2003) obtido, assim como a capacidade de reconstruir a filogenia do grupo a partir deste, foi realizada uma análise filogenética destas espécie com suas espécies próximas.

A árvore filogenética obtida (Figura IV.4) permitiu distinguir claramente as duas espécies, ao mesmo tempo que as agrupou.

A seqüência mais similar com a obtida (*Lynx pardinus*; 90%) foi corretamente agrupada com as demais espécies de lince em um grupo distinto do agrupamento jaguarundi/puma.

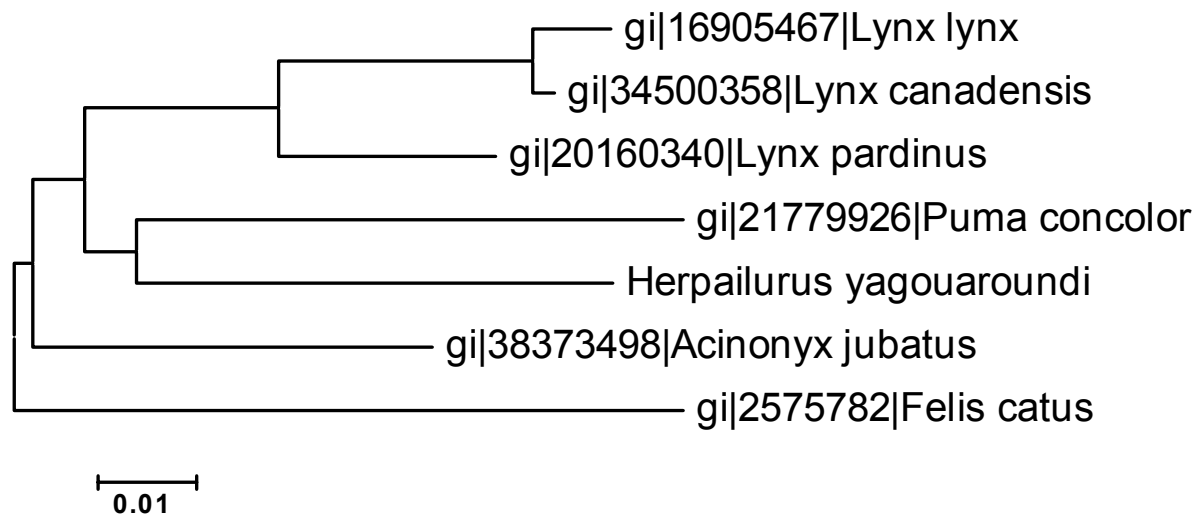


Figura IV.4. Árvore filogenética de seqüências de *cytb* do “grupo do puma”, juntamente com o “grupo do lince” e com o gato doméstico. Árvore construída com o programa Mega2 por meio do método de NJ usando a distância p, a partir de um alinhamento de 307 pb de seqüências de *cytb*. Os números após o “gi” representam os códigos de acesso das seqüências no *GenBank*.



Figura IV.5. *Herpailurus yagouaroundi*, o jaguarundi.

IV.6.4 *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno)

Foi obtida uma seqüência de 300 pb de um fragmento interno do *cytb* (Branicki *et al.*, 2003) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886752.

A seqüência mais similar com a obtida encontrada no *GenBank* foi a de *Lynx pardinus*, uma espécie de lince (gi:20160342, 92% de similaridade), apesar de haver uma seqüência *cytb* de *Leopardus pardalis*, a jaguatirica, do mesmo gênero do gato-do-mato-pequeno. Uma das explicações seria o fato de a seqüência da jaguatirica ter apenas 102 pb. No entanto, o gênero não é o melhor meio de verificar a espécie mais próxima do gato-do-mato-pequeno. Os dados moleculares indicam que esta espécie é mais intimamente relacionada às espécies do gênero *Oncifelis* do que as de seu próprio gênero (Johnson *et al.*, 1999). Segundo estes dados, *Leopardus tigrinus* forma um grupo monofilético com *Lynchailurus colocolo* (gato-palheiro), *Oncifelis geoffroyi* (gato-do-mato) e *Oncifelis guigna*.

Logo, em uma das famílias animais com a filogenia molecular mais bem estudada, não há no *GenBank* nenhuma seqüência de *cytb* do grupo formado por estes quatro felinos, em uma das famílias animais com a filogenia molecular mais bem estudada. E toda a linhagem da jaguatirica (“ocelot lineage”; Johnson & O’Brien, 1997), um grupo de pequenos felinos de grande importância forense, está representada por apenas uma seqüência de 102 pb. Neste contexto, não há dúvidas de que a seqüência de *Leopardus tigrinus* obtida fornecerá um importante subsídio para a identificação de novas seqüências da linhagem da jaguatirica.

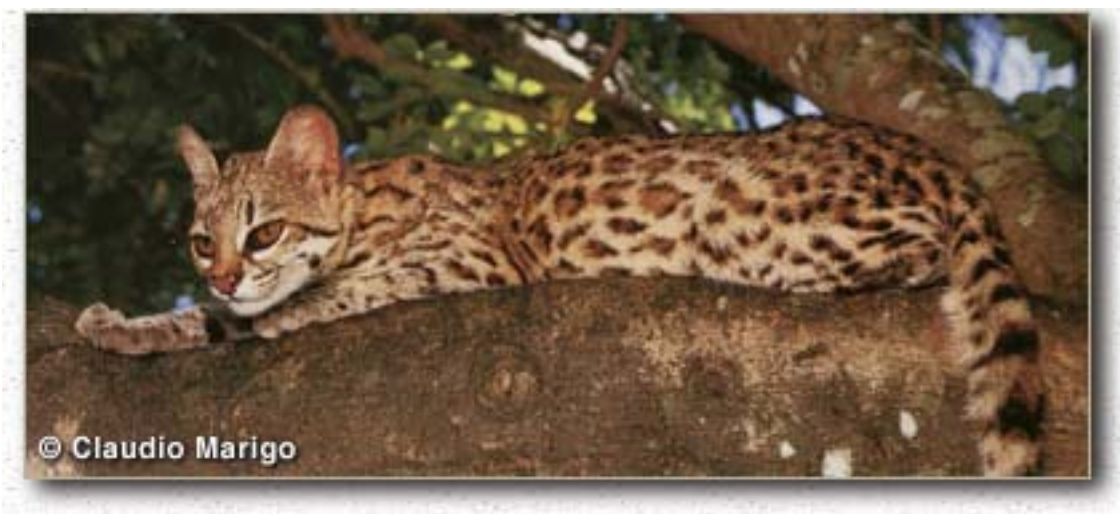


Figura IV.6. *Leopardus tigrinus*, o gato-do-mato-pequeno.

A seqüência de *cytb* de *Leopardus pardalis* não foi suficientemente informativa para sugerir, em uma análise filogenética, que a seqüência obtida pertencia a linhagem da jaguatirica. Por outro lado, a análise filogenética foi útil para mostrar que a indicação do *blast* de tratar-se de uma espécie próxima ao lince era bastante limitada.

Espera-se que a seqüência obtida seja útil, então, no direcionamento da identificação de espécies desta linhagem.

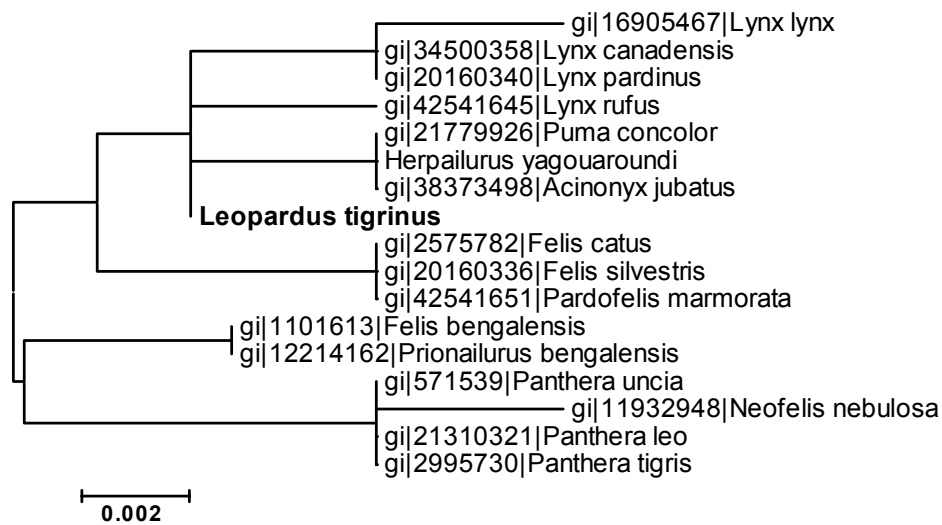


Figura IV.7. Árvore filogenética contextualizando seqüência obtida dentro das demais. A ausência de seqüências informativas de *cytb* da linhagem do jaguarundi impede que a análise filogenética indique que a seqüência obtida pertence a esta linhagem. Uma das poucas conclusões que a análise sugere é que a seqüência não pertence ao gênero *Panthera*. Árvore construída a partir de um alinhamento de 292 pb, com a distância p, somente das transversões, e o algoritmo NJ.

IV.6.5 *Mazama gouazoupira* (veado-catingueiro)

Foi obtida uma seqüência de 307 pb de um fragmento interno do *cytb* (Branicki *et al.*, 2003) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886753.

Adicionalmente, foi obtida uma seqüência de 362 pb de um fragmento interno da região 3' do *cytb* (Verma & Singh, 2003) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886754.

Esta segunda seqüência, quando comparada às demais usando o *blast*, resultou como sendo mais similar a três seqüências de *Odocoileus*, uma de *Blastocerus* e uma de *Cervus*, ficando a seqüência de *Mazama sp.* (gi:2959914) apenas na 7ª posição.

Curiosamente, em nossa análise filogenética (Figuras IV.8 e IV.9), a seqüência de *Mazama gouazoupira* ficou separada da seqüência de *Mazama sp.*

Coincidentemente, ao se dividir os cervídeos a partir de dados de cariótipos, naqueles com cromossomo X acrocêntrico e cromossomo X metacêntrico ou submetracêntrico, o gênero *Mazama* também fica dividido: *Mazama gouazoupira* apresentando cromossomo acrocêntrico e *Mazama americana*, submetracêntrico/metacêntrico (Groves & Grubb 1987).

Apesar de Pitra e colaboradores (2004), se referirem à seqüência de *Mazama sp.* como “red brocket”, o que levaria a conclusão de tratar-se *Mazama americana*, Randi e colaboradores (1998), que obtiveram a seqüência, afirmam que não foi possível determinar se o tecido provinha de um “brown brocket” (*Mazama gouazoupira*) ou de um “red brocket” (*Mazama americana*). De fato, foi a terceira publicação onde o grupo de pesquisa de Emmanuel Douzery reafirma que trabalha com uma amostra de tecido de *Mazama* de espécie não identificada (Douzery *et al.*, 1995; Douzery & Randi, 1997; Randi *et al.*, 1998).

Uma hipótese capaz de explicar os resultados encontrados neste trabalho, à luz da classificação de Groves & Grubb (1987), é que o gênero *Mazama*, na verdade, teria uma origem polifilética, resultando nos grupos *americana* e *gouazoupira*. Segundo esta hipótese, o tecido analisado por Ludt e colaboradores (2004) seria do grupo *americana*, com cromossomo X metacêntrico/submetracêntrico, enquanto *Mazama gouazoupira* faria parte do grupo de cromossomo X acêntrico.

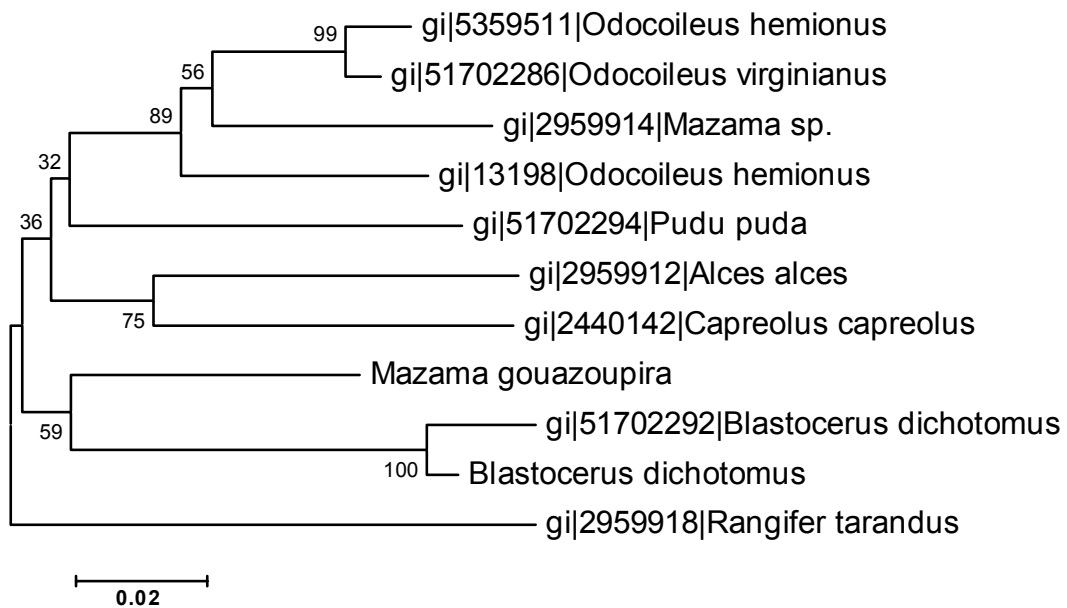


Figura IV.8. Árvore filogenética de seqüências de *cytb* dos cervídeos que habitam a América. Árvore construída com o programa Mega2 por meio do método de NJ usando a distância p, a partir de um alinhamento de 326 pb da região terminal do *cytb*. Os números ao lado dos nós representam o grau de confiança de cada nó obtido pelo teste de *bootstrap* com 1000 repetições. Os números após o “gi” representam os códigos de acesso das seqüências no *GenBank*. As duas seqüências sem “gi” foram obtidas no presente trabalho.

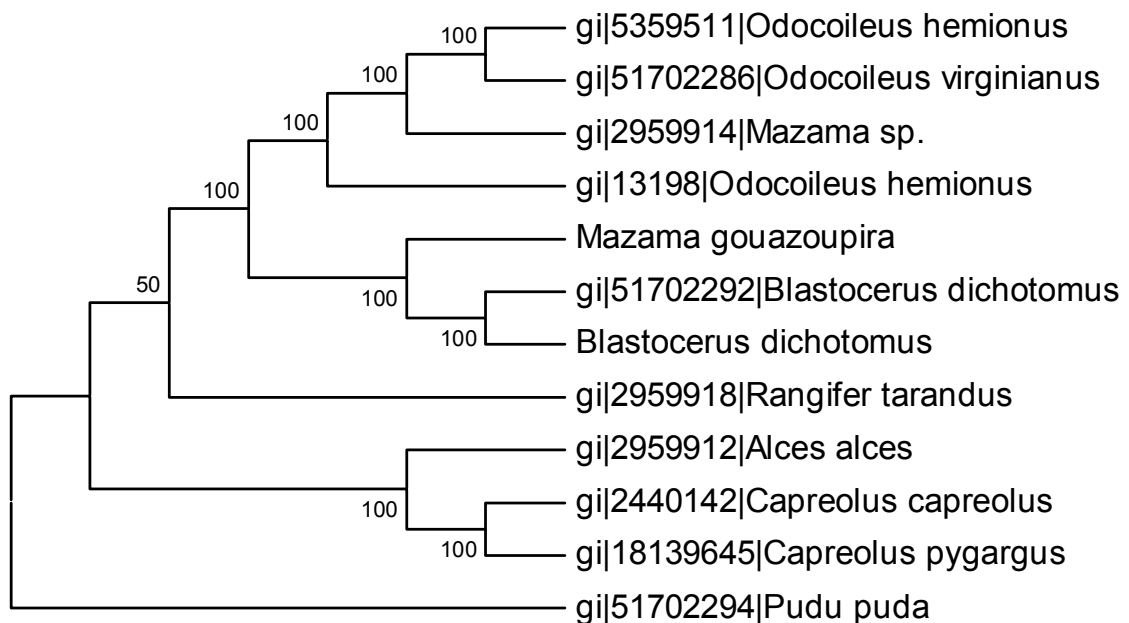


Figura IV.9. Árvore filogenética de seqüências de *cytb* dos cervídeos que habitam a América. Árvore de máxima-parcimônia construída com o programa Mega2 por meio do método de “branch & bound” usando a distância p, a partir de um alinhamento de 326 pb da região terminal do *cytb*. Os números ao lado dos nós representam a percentagem das vezes em que o nó foi obtido nas duas árvores mais parcimoneosas.

Esta hipótese não é contrária às observações citogenéticas de Duarte e colaboradores (1998), que observaram uma clara distinção entre os grupos formados pelos veados vermelhos (*M. nana*, *M. americana* e *M. intermedia*) e os veados cinza (*M. gouazoubira* e *M. rondoni*), muito embora os autores não tenham comparado o cariótipo de *Mazama* com o de outros gêneros.

Apesar de a posição do centrômero no cromossomo X ter sido motivadora da nossa hipótese inicial, este critério não é capaz de reproduzir a distinção entre os *Mazama* vermelhos e os *Mazama* cinza, pois *M. rondoni* (cinza) possui um cromossomo X submetracêntrico, tal qual os *Mazama* vermelhos (Duarte & Jorge, 1998). Essa observação nos leva a crer que o cromossomo X acrocêntrico de *M. gouazoubira* é uma condição derivada do cromossomo X submetracêntrico original presente nos demais *Mazama*.

Ao que tudo indica, *Mazama* apresenta dois grupos bastante distintos. A seqüência de *Mazama gouazoubira* obtida parece representar um grupo diferente da seqüência obtida por Randi e colaboradores (1998). Desta forma, a seqüência obtida de veado-catingueiro deverá ser de fundamental importância para as futuras identificações de *Mazama* cinza e na distinção entre os gêneros de cervídeos do Novo Mundo.

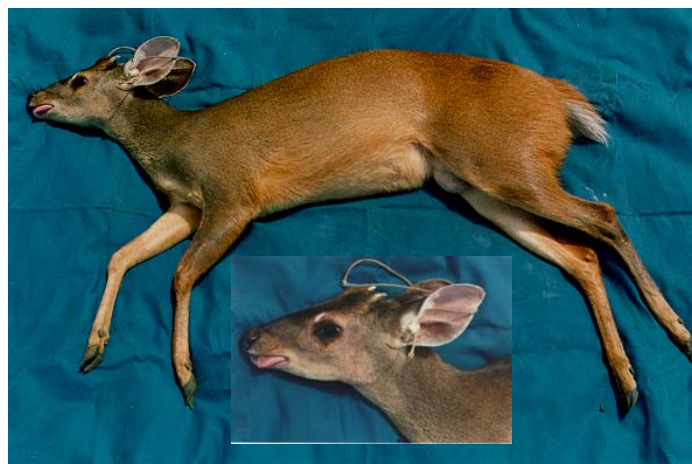


Figura IV.10. *Mazama gouazoubira*, o veado-catingueiro, com detalhe da cabeça. A espécie investigada neste trabalho, freqüente vítima da caça ilegal no país, encontra-se dentro do grupo dos *Mazama* cinza. Montagem a partir de duas fotos de Maurício Barbanti Duarte.

Mais estudos, amostrando mais espécies, são necessários para um melhor entendimento da história evolutiva do gênero *Mazama* e dos cervídeos do Novo Mundo como um todo.

IV.6.6 *Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira)

Foram obtidas 48 seqüências de 307 pb de um fragmento interno do *cytb* (Branicki *et al.*, 2003). Foram encontrados 4 haplótipos, depositadas no *GenBank* sob os códigos AY886755 ao AY886758.

As seqüências obtidas, quando comparadas às demais do *GenBank* com o *blast* resultam em seqüência mais similar (85%), a de *Tamandua tetradactyla*, o tamanduá-mirim.

A diversidade de seqüências nesta espécie será discutida adiante.

IV.6.7 *Pecari tajacu* (cateto)

Foi obtida uma seqüência de 335 pb de um fragmento interno do *cytb* (Branicki *et al.*, 2003; Kocher *et al.*, 1989) que foi depositada no *GenBank* sob o código AY886759.

Curiosamente, a seqüência do *cytb* de *Pecari tajacu* apresentou alta similaridade (acima de 95%) com duas seqüências de *Tamandua tetradactyla* (tamanduá-mirim), mesmo as duas espécies pertencendo a ordens distintas. Apesar de já existirem duas seqüências de *cytb* desta espécie depositadas no *GenBank*, o *blast* encontrou como seqüências mais similares dois clones de *Tamandua tetradactyla* seqüenciados por Greenwood e colaboradores (2001) e identificados como “clone 2” e “clone 4”. No artigo, os autores comentam que alguns clones obtidos a partir de fígado de tamanduá-mirim realmente não se assemelhavam aos demais. Após a amplificação e clonagem com um segundo par de iniciadores, os autores determinam qual daqueles clones teria a verdadeira seqüência do gene mitocondrial do citocromo b. As seqüências dos dois clones que apresentaram alta similaridade com *Pecari tajacu* foram consideradas inserções nucleares do *cytb* (Greenwood *et al.*, 2001).

Foi feita, então, uma análise filogenética das seqüências da família Tayassuidae disponíveis, juntamente à sua família mais próxima, Suidae, ao lado das seqüências da família Myrmecophagidae, juntamente com sua família mais próxima, Bradypodidae. Ou seja, na mesma análise, foram reunidos os porcos e porcos-do-mato, com os tamanduás e preguiças, esperando que a seqüência obtida de *Pecari tajacu* agrupasse com as demais de porco-do-mato e as seqüências nucleares de *Tamandua tetradactyla*, com as demais de tamanduá ou permanecesse como grupo externo, caso a inserção fosse muito antiga.

Divergindo do esperado, as seqüências dos dois clones de *Tamandua tetradactyla* permaneceram agrupadas com as de *P. tajacu*.

A análise foi repetida, porém, considerando apenas as transversões. As transversões, muito mais raras que as transições no DNA mitocondrial, são capazes de verificar relações filogenéticas mais antigas (Moritz *et al.*, 1987). O resultado se repetiu (Figura IV.11).

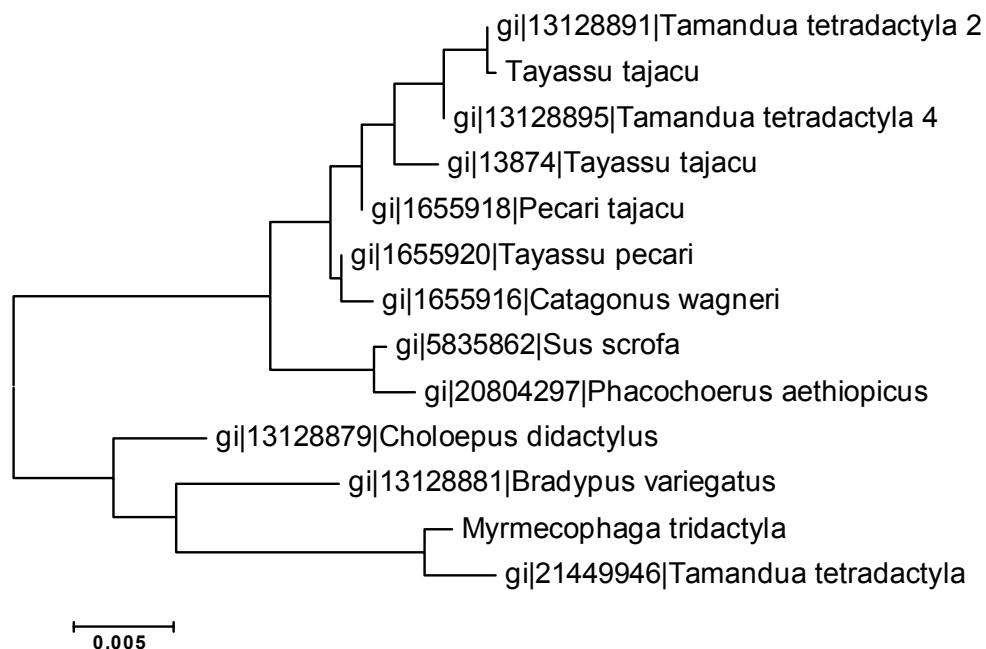


Figura IV.11. Árvore filogenética construída com o programa Mega2 e o algoritmo de agrupamento de vizinhos utilizando a distância p apenas das transversões. Os números após o “gi” representam os códigos de acesso das seqüências no *GenBank*. As duas seqüências sem “gi” foram obtidas no presente trabalho. *Tayassu tajacu* é o antigo nome de *Pecari tajacu*.

Um teste de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) do dendrograma acima dispõe as seqüências de *Pecari tajacu* juntamente com as seqüências dos dois clones de *Tamandua tetradactyla* em um agrupamento com grau de confiabilidade de 100% (Figura IV.12).

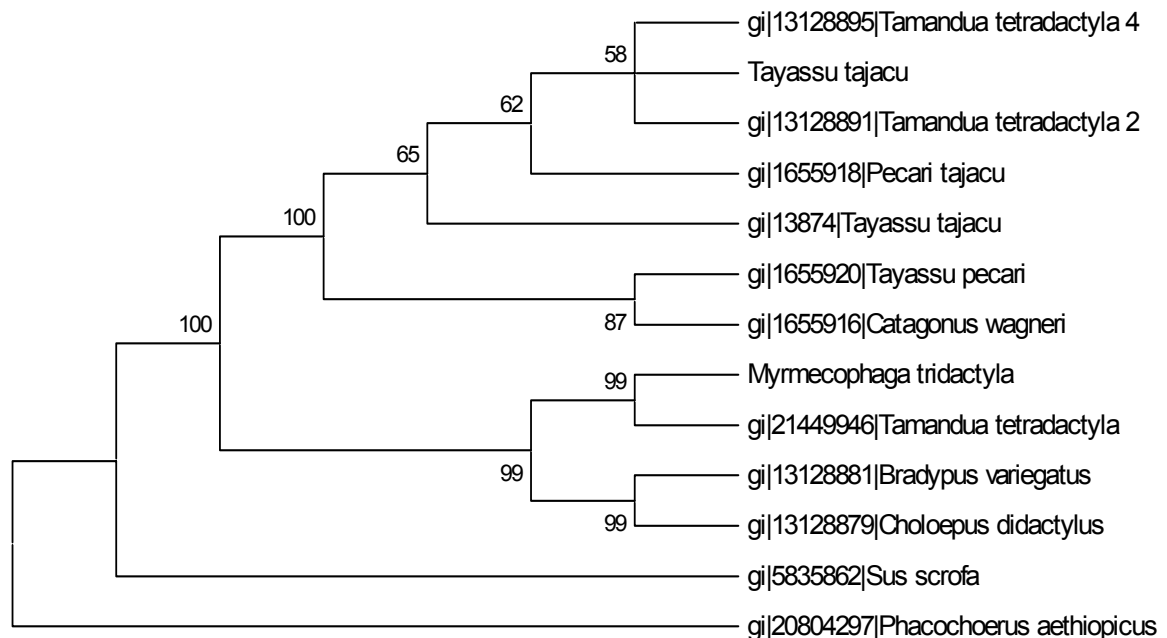


Figura IV.12. Árvore filogenética construída com o programa Mega2 e o algoritmo de agrupamento de vizinhos utilizando a distância *p* apenas das transversões. Os números ao lado dos nós representam o grau de confiança de cada nó obtido pelo teste de *bootstrap* com 500 repetições. Os números após o “gi” representam os códigos de acesso das seqüências no *GenBank*. As duas seqüências sem “gi” foram obtidas no presente trabalho. *Tayassu tajacu* é o antigo nome de *Pecari tajacu*.

A partir destes resultados, e após verificar que os clones 2 e 4 não possuíam códons mitocondriais de parada, a hipótese que as seqüências daqueles dois clones seriam NUMTs (Greenwood *et al.*, 2001), foi descartada. Foi possível concluir que as seqüências dos clones 2 e 4 obtidos no trabalho de Greenwood e colaboradores (2001), identificadas no *GenBank* como sendo de *Tamandua tetradactyla* (tamanduá-mirim), são, de fato, de *P. tajacu* (cateto). A origem mais provável do DNA de *P. tajacu* em um DNA extraído de fígado de *Tamandua*

tetradactyla obtido em um museu (Greenwood *et al.*, 2001) é uma contaminação, mesmo não havendo nenhum trabalho publicado dos autores com a espécie *P. tajacu*.

Foi possível observar um elevado nível de polimorfismo entre as diferentes seqüências de *cytb* de cateto. Utilizando RFLP de DNA mitocondrial, Theimer e Keim (1994) já haviam mostrado uma grande variação entre haplótipos de mtDNA de cateto e relacionado esta variação à distribuição geográfica da espécie na América do Norte. Os resultados deste trabalho sugerem que a variação intraespecífica encontrada dentro da América do Norte (Theimer & Keim, 1994) pode ser ainda mais acentuada quando comparada às Américas do Sul e do Norte. De acordo com a história evolutiva da espécie, originando-se na América Central (Simpson, 1980), migrando para a América do Norte pelo México e para a América do Sul por uma estreita faixa de terra (Sowls, 1997), não seria de se estranhar uma marcante diferença entre as populações nas duas regiões.



Figura IV.13. *Pecari tajacu*, o cateto ou caititu. A espécie estudada neste trabalho pertence à família Tayassuidae e é vítima freqüente da caça ilegal no país.

Se esta suposição estiver correta seria possível propor que as seqüências de *cytb*, depositadas por Greenwood e colaboradores (2001) como sendo pertencentes a tamanduá-

mirim, não apenas são na verdade de um cateto, mas de um cateto proveniente da América do Sul (Figura IV.14).

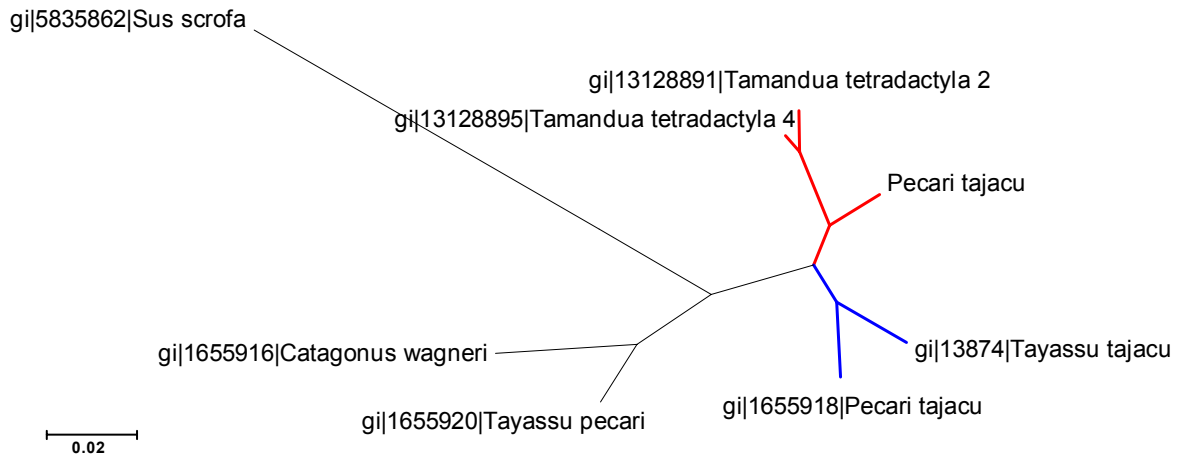


Figura IV.14. Árvore filogenética construída com o programa Mega2 e o algoritmo de agrupamento de vizinhos utilizando a distância p. Os números após o “gi” representam os códigos de acesso das seqüências no *GenBank*. A seqüência de *Pecari tajacu* sem “gi” foi obtida no presente trabalho. *Tayassu tajacu* é o antigo nome de *Pecari tajacu*. O ramo em vermelho representa os catetos da América do Sul, enquanto o ramo azul mostra os catetos da América do Norte.

Divergências semelhantes a esta proposta para os catetos foram encontradas em outros mamíferos terrestres, de porte comparável, que habitam diferentes partes da América, como o puma (*Puma concolor*, Culver *et al.*, 2000) e o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Johnson *et al.*, 1999).

Um estudo biogeográfico mais aprofundado da espécie utilizando genes mitocondriais poderia esclarecer com que precisão a determinação de um haplótipo pode garantir uma inferência sobre a origem geográfica de um *Pecari tajacu*.

IV.7 Diversidade intra-específica de seqüências de citocromo b em uma espécie ameaçada de extinção: comparação entre duas populações de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*, família *Myrmecophagidae*) e implicações para a inferência sobre a origem geográfica dos animais

Para avaliar a diversidade intraespecífica de seqüências de citocromo b em uma espécie seriamente ameaçada de extinção (Miranda, 2004) e sua possível relação com a distribuição geográfica da espécie, foi sequenciado um fragmento de 307 pb deste gene nas duas únicas populações da espécie ainda relativamente grandes (Miranda, 2004). Foram analisados 28 indivíduos do Parque Nacional das Emas, GO, e de 20 indivíduos do Parque Nacional da Serra da Canastra, MG.



Figura IV.15. *Myrmecophaga tridactyla*, o tamanduá-bandeira, espécie ameaçada de extinção. Os mesmos quatro haplótipos de *cytb* foram encontrados nas populações do Parque Nacional das Emas e do Parque Nacional da Serra da Canastra.

Nos indivíduos do Parque Nacional das Emas (PNE) foram encontrados quatro haplótipos distintos envolvendo três bases variantes. As substituições eram sinônimas, encontravam-se na terceira base do códon e representavam transições de guanina (G) com adenina (A). O haplótipo mais comum (G/G/A) foi encontrado em 20 dos 28 indivíduos (71%) e o menos comum (A/G/A), em apenas um indivíduo (4%).

Na população do Parque Nacional da Serra da Canastra (PNSC), foram encontrados exatamente os mesmos quatro haplótipos e nenhum haplótipo adicional. O haplótipo mais comum na população do PNE, foi, também, o haplótipo mais frequentemente encontrado na população do PNSC. O haplótipo menos freqüente no PNE, no entanto, foi o segundo mais freqüente no PNSC (Tabela IV.4).

Tabela IV.4. Comparação da freqüência de ocorrência dos haplótipos encontrados nas populações de *Myrmecophaga tridactyla* do Parque Nacional das Emas/GO e do Parque Nacional da Serra da Canastra/MG.

Haplótipo	Parque Nacional das Emas	P. N. da Serra da Canastra	Total
G/G/A	20 (71 %)	13 (65 %)	33 (69 %)
A/G/G	4 (14 %)	2 (10 %)	6 (13 %)
A/G/A	1 (4 %)	4 (20 %)	5 (10 %)
G/A/A	3 (11 %)	1 (5 %)	4 (8 %)
Nº de indivíduos	28	20	48

Cada haplótipo diferia de um segundo haplótipo por apenas uma substituição. Foi possível, então, propor uma única relação de “parentesco” possível entre os haplótipos envolvendo apenas uma substituição: GAA \Leftrightarrow GGA \Leftrightarrow AGA \Leftrightarrow AGG.

Considerando a probabilidade de o haplótipo mais comum ser o haplótipo mais antigo, chegou-se à relação de ancestralidade mostrada na Figura IV.16.

Os resultados obtidos mostram claramente que não é possível diferenciar as populações de tamanduá-bandeira do Parque Nacional das Emas e do Parque Nacional da Serra da Canastra por meio dos haplótipos de *cytb*.

A partir dos dados obtidos, é possível observar, também, toda a cautela que deve ser tomada antes de qualquer inferência, baseada em haplótipos de mtDNA, sobre a origem geográfica de um animal. Se por um simples erro amostral, de apenas um indivíduo, o haplótipo A/G/A não tivesse sido amostrado na população do Parque Nacional das Emas, poderia-se chegar a uma conclusão equivocada de que este haplótipo é exclusivo do Parque Nacional da Serra da Canastra. Tal efeito de amostragem poderia levar a uma igualmente falha declaração de que um traficante de animais portando tamanduá-bandeira com haplótipo A/G/A teria atuado no Parque Nacional da Serra da Canastra.

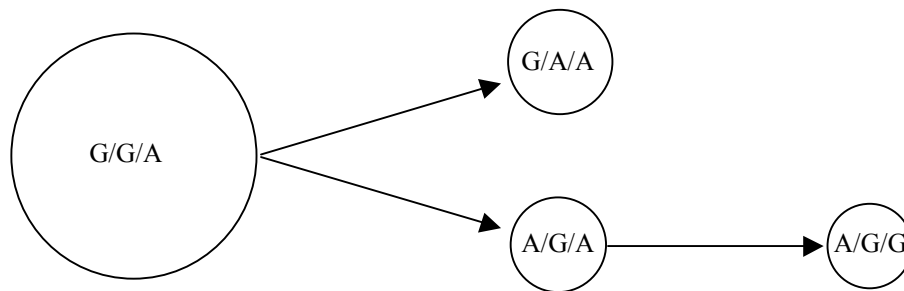


Figura IV.16. Ilustração da hipótese sobre origem e relação entre os haplótipos de DNA mitocondrial encontrados nas populações de tamanduá-bandeira analisadas. Os haplótipos à esquerda da seta indicam haplótipos ancestrais. Cada seta indica uma única mutação de ponto (transição). A área dos círculos é proporcional à frequência de cada haplótipo encontrado.

Esta análise intra-específica indica que o *cytb* não deve ser utilizado para inferências sobre a origem geográfica de um animal a menos que se tenha um estudo muito aprofundado sobre a filogeografia da espécie. É mais provável que tais inferências sejam possíveis em populações totalmente isoladas ou separadas por uma grande distância, como as populações de cateto da América do Sul e do Norte, do que em populações próximas e não totalmente isoladas, como as de tamanduá-bandeira estudadas.

IV.8 Identificação de ovos na elucidação de um crime contra a fauna

Visando testar a eficiência da análise de genes do mtDNA em um caso real de investigação forense foi identificada a espécie mais provável, a partir de seqüências de genes mitocondriais obtidos de amostras biológicas de 58 ovos apreendidos pela Polícia Federal em Recife, em julho de 2003.

IV.8.1 Aspecto geral dos ovos e dos embriões:

Externamente, os ovos eram bastante parecidos, todos completamente brancos. No entanto, três deles eram nitidamente maiores que os demais.

Após a abertura dos ovos, verificou-se que os embriões encontravam-se em estágios de desenvolvimento bastante variáveis. Alguns embriões aparentavam estarem prontos para eclodir, apresentando, inclusive, penas. Em um dos três ovos maiores não foram encontrados sinais de desenvolvimento de qualquer embrião, tendo sido, então, analisada apenas a gema.



Figuras IV.17 e IV.18. Fotografias dos embriões contidos nos ovos apreendidos em Recife. Observa-se o adiantado estágio de desenvolvimento no qual alguns dos embriões se encontravam.

IV.8.2 Seqüências obtidas a partir dos ovos

As primeiras seqüências de *cytb* obtidas a partir dos embriões apresentaram alta similaridade com psitacídeos, enquanto as seqüências de *coI* apresentavam uma similaridade muito inferior com aves em geral. Análises filogenéticas preliminares indicavam tratar-se de seqüências de psitacídeos. Estes resultados indicaram que o *cytb* seria mais útil na identificação dos ovos pela completa ausência de seqüências da região amplificada de *coI* em psitacídeos. As seqüências de *coI* de psitacídeos disponíveis no GenBank representavam a porção terminal do gene (Palumbi *et al.*, 1991; Russello & Amato, 2004), enquanto as seqüências obtidas utilizando os iniciadores recomendados por Hebert e colaboradores (2003; descritos em Folmer *et al.*, 1994) representavam a metade inicial (5') do gene (figura III.4). Os resultados mostrados adiante foram, então, obtidos a partir do *cytb*.

Entre os 55 ovos menores, foram encontrados três tipos de seqüências de *cytb* diferentes. Um dos tipos, mais freqüente, foi encontrado em 50 destes ovos. O segundo tipo mais freqüente foi encontrado em 4 ovos. O terceiro tipo, em apenas um dos ovos. Após uma análise filogenética, os dois primeiros tipos agruparam-se juntamente aos demais psitacídeos, mais precisamente com os demais psitacídeos do Novo Mundo de cauda curta. O terceiro tipo permaneceu como grupo externo aos psitacídeos.

Os três ovos maiores apresentavam exatamente o mesmo haplótipo. Em uma análise filogenética, a seqüência de *cytb* destes ovos também se agrupou com as demais seqüências de psitacídeos, mas, diferentemente dos ovos menores, com psitacídeos do Novo Mundo de cauda longa.

O processo de identificação destes ovos está pormenorizado nos itens a seguir.

IV.8.3 Cinquenta ovos de *Amazona xanthops* (*Salvatoria xanthops*):

As seqüências obtidas de *cytb* da maioria dos ovos (50), agrupava-se aos psitacídeos de cauda curta e apresentaram maior similaridade, dentre as seqüências disponíveis no *GenBank*, com *Pionus senilis*.



Figuras IV.19 e IV.20. *Pionus senilis*, à esquerda, e *Pionus maximiliani*, a maritaca-verde. Enquanto a primeira ocorre na América Central, a segunda habita o Brasil.

A partir deste resultado, foi lançada a hipótese dos ovos pertencerem à espécie *Pionus maximiliani*, maritaca-verde, uma espécie do mesmo gênero, mas que ocorre no Brasil. Foi obtida uma amostra de *P. maximiliani* no Zoológico de Brasília e, após a obtenção da seqüência (depositada no *GenBank* sob o código AY669862), a seqüência obtida a partir dos ovos permanecia localizada entre os gêneros *Amazona* e *Pionus*, porém mais próximos de *Pionus* (Figura IV.21).

Na tentativa de obter mais seqüências de psitacídeos de cauda curta, foi obtida uma amostra de *Amazona xanthops* (papagaio-galego) no Zoológico de Brasília. A seqüência de *Amazona xanthops* (depositada sob o código AY669861) apresentava similaridade superior a 99% com a seqüência obtida a partir dos 50 ovos apreendidos.

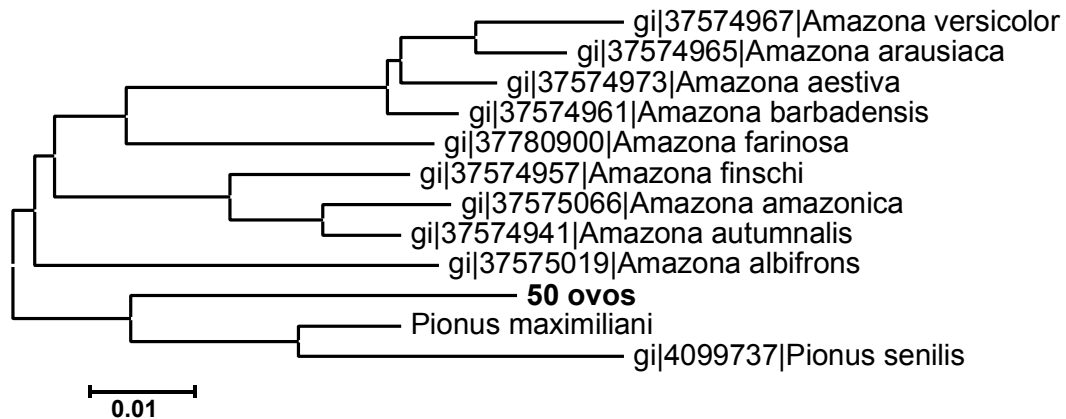


Figura IV.21. Árvore filogenética com base no gene *cytb* mostrando a posição intermediária da seqüência derivada dos ovos apreendida, entre os gêneros de cauda curta *Amazona* e *Pionus*. Árvore construída utilizando o programa Mega 2, a partir da distância *p*, com o método NJ.

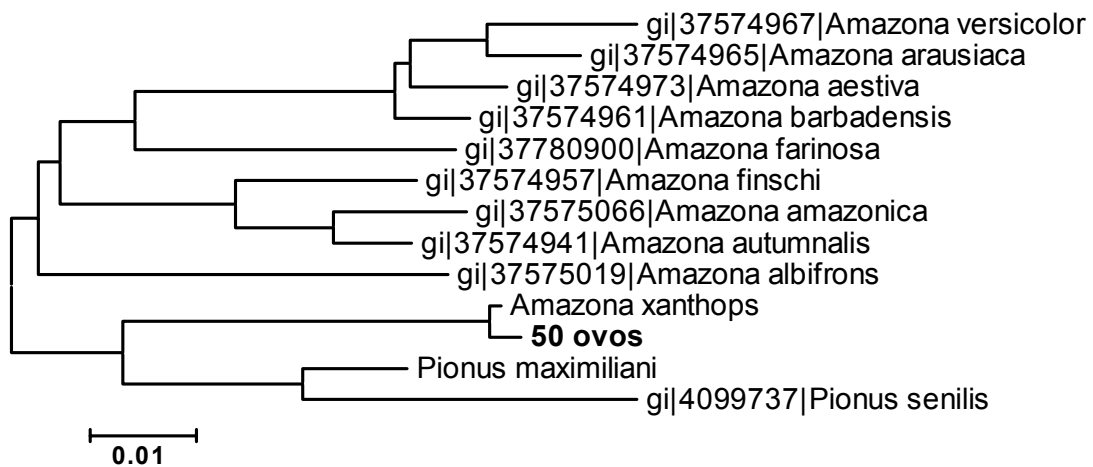


Figura IV.22. Árvore filogenética mostrando a identificação dos ovos como pertencendo a espécie *Amazona xanthops*. Árvore construída utilizando o programa Mega 2, a partir da distância *p*, com o método NJ.

A posição filogenética incomum de *A. xanthops*, desagrupada das demais espécie do mesmo gênero é intrigante. Uma análise da literatura recente a respeito da filogenia desta espécie (Duarte & Caparroz, 1995; Russello & Amato, 2004; Caparroz & Duarte, 2004) esclareceu a questão. Há muito tempo sabe-se que esta espécie é diferente das demais espécies

do gênero *Amazona*. Em 1920, Ribeiro sugeriu o novo gênero *Salvatoria* para esta espécie e é justamente a adoção do nome *Salvatoria xanthops* que os artigos mais recentes defendem.



Figura IV.23. *Amazona (Salvatoria) xanthops*, papagaio-galego. Cinquenta dos 58 ovos apreendidos pertenciam a esta espécie de psitacédeo.

O conhecimento sobre as relações filogenéticas das espécies em análise, como as dos gêneros *Pionus* e *Amazona* (Duarte & Caparroz, 1995; Caparroz & Duarte, 2004), foi importante para garantir a segurança da identificação destes 50 ovos.

IV.8.4 Quatro ovos de *Amazona aestiva* ou *Amazona ochrocephala*:

Quatro das seqüências obtidas a partir dos ovos, apesar de agruparem-se aos psitacédeos de cauda curta, não se agruparam com *Amazona (Salvatoria) xanthops*. Estas seqüências ficaram claramente agrupadas dentro do gênero *Amazona*, muito próximas a *A. aestiva* (papagaio-verdadeiro) e *A. ochrocephala* (papagaio-campeiro).

Foi observada uma elevada similaridade (maior que 99%) das seqüências obtidas, tanto com *A. aestiva* quanto com *A. ochrocephala*. As seqüências de *cytb* destas duas supostas espécies não formam grupos monofiléticos distintos. Estas observações sugerem que os quatro ovos analisados pertencem a uma destas duas espécies.

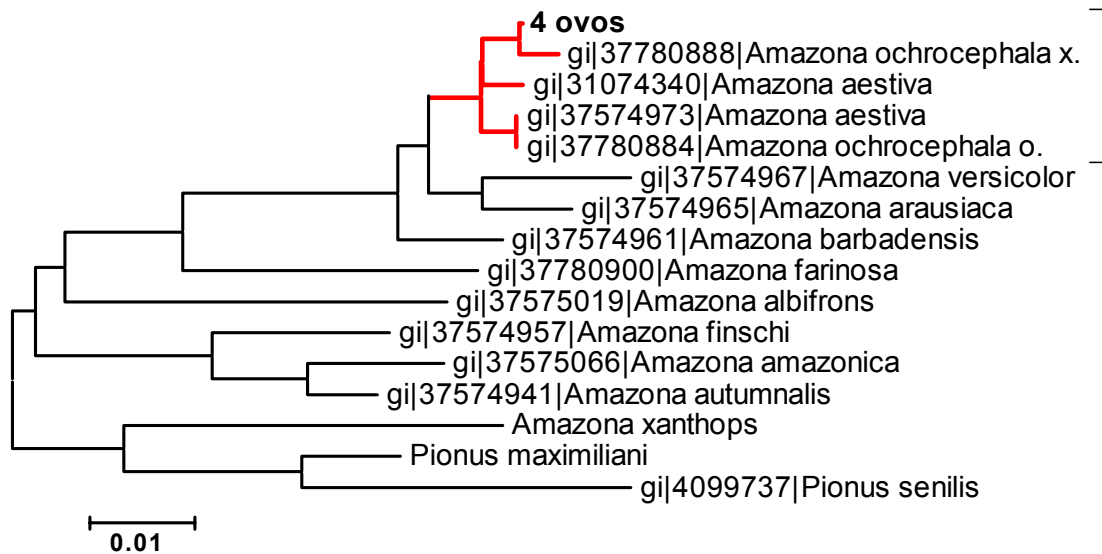


Figura IV.24. Árvore filogenética indicando o agrupamento das seqüências obtidas dos quatro ovos analisados com as seqüências de *A. aestiva* e *A. ochrocephala*. Árvore construída utilizando o programa Mega 2, a partir da distância p, com o método NJ. “x” e “o” representam as subespécies de *A. ochrocephala* “*xantholaema*” e “*ochrocephala*”.



Figura IV.25. *Amazona aestiva*, o papagaio-verdadeiro, à esquerda, e *Amazona ochrocephala*, o papagaio-campeiro, à direita. A análise de seqüência do gene *cytb* não distinguiu estes animais como pertencentes a espécies distintas.

O fato de não ter sido possível determinar uma espécie única como genitora destes 4 ovos está de acordo com os conhecimentos mais atuais sobre este complexo intrincado de formas assumidas por estas duas supostas espécies, estando *Amazona aestiva* dentro do complexo *Amazona ochrocephala* (Eberhard & Bermingham, 2004). Na figura IV.24, este complexo está unido pelo ramo destacado em vermelho.

IV.8.5 Três ovos de *Ara ararauna*:

Diferentemente das seqüências obtidas dos ovos menores, os quais se agruparam com os psitacídeos do Novo Mundo de cauda curta, as seqüências dos 3 ovos maiores agruparam-se com aquelas dos psitacídeos do Novo Mundo de cauda longa, com uma alta similaridade (98,8%) com a seqüência de *Ara ararauna* (arara-canindé). Pelo fato da similaridade encontrada estar abaixo de 99% e pelo fato de não haver, no *GenBank*, seqüências das demais araras grandes que ocorrem no Brasil, foram obtidas amostras de *A. macao* e *A. chloroptera* no Zoológico de Brasília (Figura IV.26).



Figura IV.26. *Ara chloroptera* (arara-vermelha), à esquerda e *Ara macao* (arara-canga), à direita. Não havia qualquer seqüência de gene mitocondrial destas grandes, belas e visadas araras no *GenBank*.

Após obter a seqüência de *cytb* destas duas araras vermelhas (depositadas sob os códigos AY669858 e AY669860), verificou-se que a seqüência dos ovos permanecia agrupada com *Ara ararauna* (figura IV.27).

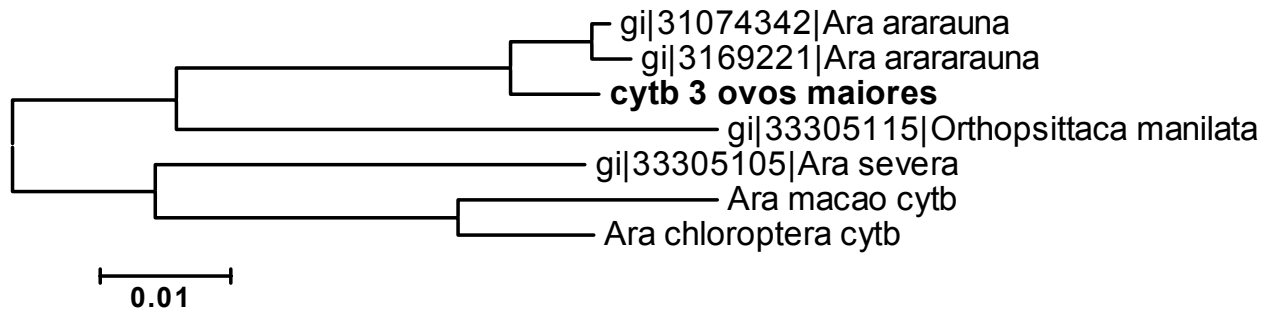


Figura IV.27. Árvore filogenética indicando as seqüências obtidas dos 3 ovos maiores permanecendo agrupadas a *Ara ararauna* após a inclusão das seqüências das araras vermelhas. Árvore construída utilizando o programa Mega 2, a partir da distância p de um alinhamento de 232 pb de um fragmento interno do *cytb*, com o método NJ.

No início desta investigação foram utilizadas as listas de espécies que ocorrem no Brasil (CBRO, 2000) e o livro de Sick (1997) das aves brasileiras como referência para as espécies de psitacídeos. Em uma busca mais abrangente, entretanto, verificou-se que a espécie irmã de *Ara ararauna*, a julgar por sua aparência externa, provavelmente seria a arara-da-garganta-azul, *Ara glaucogularis*, uma espécie que não estava relacionada nas referências citadas pelo simples fato de não pertencer à fauna brasileira. A espécie, que ocorre na Bolívia, é uma das aves mais ameaçadas de extinção em todo o mundo (Yamashita & Barros, 1997).

Tendo em vista que: (1) não foi encontrado qualquer trabalho de filogenia relacionando as duas espécies; (2) as duas espécies foram confundidas no passado; (3) não há qualquer seqüência desta espécie no *GenBank* e (4) não existe informação quanto ao nível de similaridade do *cytb* de *Ara glaucogularis* com *Ara ararauna*, buscou-se obter a seqüência de *cytb* da arara-de-garganta-azul para comparação. Após uma busca em diversas instituições foi localizada, com o auxílio do IBAMA, uma lista das espécies nos zoológicos brasileiros citando um exemplar de *Ara glaucogularis* no Zoológico do Rio de Janeiro. As duas amostras

fornechas pela instituição tinham a mesma seqüência de *cytb*, a qual foi depositada no *GenBank* sob o código AY669859.



Figura IV.28. *Ara glaucogularis*, a arara-de-garganta-azul. Yamashita & Barros (1997) estimam que exista cerca de 200 indivíduos desta espécie na natureza e afirmam que seu declínio ocorreu devido à intensa captura na década de 1980.

A análise comparativa resultou na exclusão de *Ara glaucogularis*, concluindo-se assim que os três ovos maiores pertenciam de fato à espécie *Ara ararauna* (arara-canindé) (Figura IV.29).

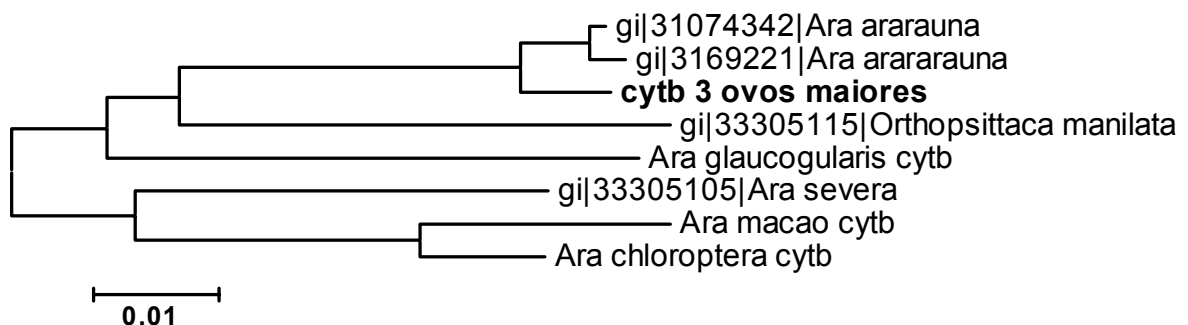


Figura IV.29. Árvore filogenética destacando a identificação dos 3 ovos maiores investigados como pertencendo à espécie *Ara ararauna*. Árvore construída utilizando o programa Mega 2, a partir da distância p de um alinhamento de 232 pb de um fragmento interno do *cytb*, com o método NJ. As seqüências sem o prefixo “gi” foram obtidas no presente trabalho.



Figura IV.30. *Ara ararauna*, a arara-canindé. Os três ovos maiores investigados pertenciam a esta espécie.

A identificação destes três ovos foi alcançada, portanto, pela associação de duas evidências: (1) a similaridade com as seqüências de *Ara ararauna* disponíveis no *GenBank* e (2) a exclusão das espécies filogeneticamente próximas. A segurança na identificação foi adicionalmente fortalecida pelo conhecimento da espécie ter uma ampla distribuição geográfica e linhagens de mtDNA que divergiram há muito tempo (Caparroz *et al.*, 2003).

IV.8.6 Um ovo de *Otus choliba*:

Uma das seqüências obtidas, representando um dos ovos, revelou-se claramente distinta das demais, sem agrupar-se dentro do grupo dos psitacídeos (Figura IV.31).

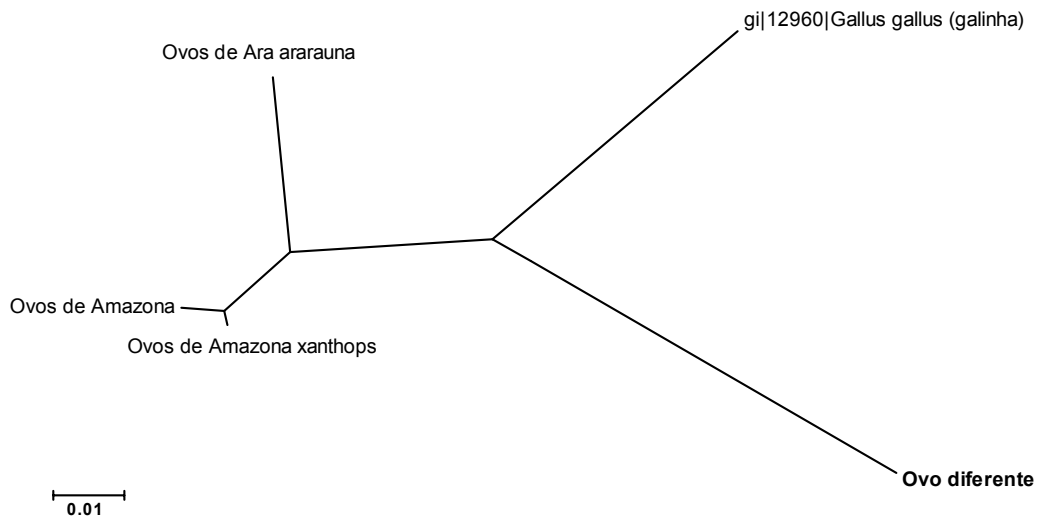


Figura IV.31. Árvore filogenética mostrando a clara divergência da seqüência de um dos ovos apreendidos em relação aos demais. Árvore feita a partir de um alinhamento de seqüências de 244 pb do *cytb*, utilizando o programa Mega 2, a partir das distâncias p, somente das transversões, por meio do algoritmo NJ. A seqüência de galinha foi obtida do *GenBank* para ilustrar a distância entre ordens distintas.

Uma busca no *GenBank* utilizando o *blast* encontrou como seqüências mais similares seis seqüências de *Otus choliba* (corujinha-do-mato) seguidas de duas seqüências de *Otus albobularis* (corujinha), indicando que a seqüência questionada provavelmente provinha de uma coruja da família Strigidae.

Havia uma grande disponibilidade de seqüências de *cytb* do gênero *Otus* (88, incluindo as seis espécies que habitam o Brasil, *O. atricapillus*, *O. choliba*, *O. guatemalae*, *O. sanctaecatarine*, *O. usta* e *O. watsonii* (CBRO, 2000)) e do seu gênero mais próximo, *Bubo*. Uma análise filogenética básica pôde determinar que a seqüência obtida encontrava-se não apenas dentro do gênero *Otus*, mas dentro de um subgrupo dentro do gênero conhecido em inglês como “Screech Owls” (o gênero pode ser dividido entre as “Screech Owls” e as “Scops Owls”), as corujas do gênero *Otus* do Novo Mundo. Existem cerca de 70 espécies no gênero *Otus*, cerca de um terço de todas as corujas, mas apenas cerca de 26 no subgrupo “Screech”, que habita o Novo Mundo. De fato, praticamente qualquer coruja descrita, sem diferenças

aberrantes, era inserida no gênero *Otus*, mas a taxonomia do grupo tem sido revista e alguns autores têm sugerido colocar as “Screech Owls” em um gênero novo, *Megascops* (Konig *et al.*, 1999).

A análise filogenética confirmou a espécie inicialmente apontada pelo *blast* (*Otus choliba*, 95% de similaridade) (Figura IV.32). A disponibilidade de seis seqüências distintas de *cytb* de *Otus choliba* permitiu verificar que as diferenças encontradas entre a seqüência obtida e as demais disponíveis encontrava-se dentro da variação natural da espécie. A ampla distribuição geográfica da espécie, que habita todo o Brasil e diversos países vizinhos, também é condizente com a variação encontrada (similaridade dentro da espécie média de 99,4%) e foi semelhante àquela encontrada em outras espécies do mesmo gênero. *Otus hoyi*, por exemplo, representada por seis seqüências no *GenBank*, apresentou similaridade média de 99,4% no mesmo segmento gênico. A similaridade da seqüência obtida com as da segunda espécie mais próxima (*Otus albogularis*) foi de 93,2%.

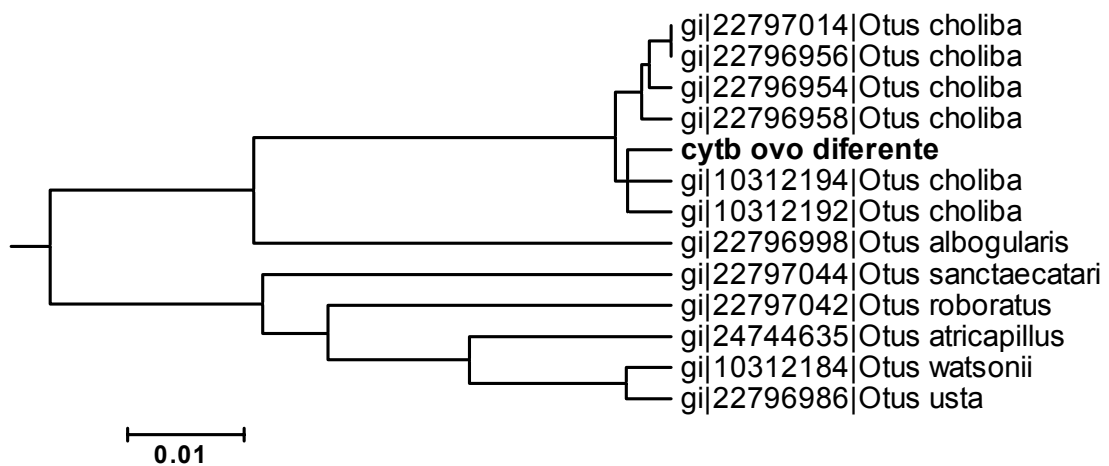


Figura IV.32. Árvore filogenética mostrando a inserção da seqüência obtida do ovo “diferente” dentro da espécie *Otus choliba*. Árvore feita a partir de um alinhamento de seqüências de 259 pb do *cytb*, utilizando o programa Mega 2, a partir das distâncias p, por meio do algoritmo UPGMA.



Figura IV.33. *Otus choliba*, a corujinha-do-mato. O único ovo apreendido que não era de psitacídeo foi declarado como pertencente a esta espécie, que ocorre em todo o território brasileiro.

A identificação deste ovo corroborou ser rápida e segura a identificação da espécie de um gênero com ampla disponibilidade de seqüências no *GenBank*.

IV.8.7 Conclusões da identificação dos ovos

As análises das seqüências obtidas e a sua comparação com seqüências disponíveis no *GenBank* e com seqüências obtidas de aves do Zoológico de Brasília e do Zoológico do Rio de Janeiro permitiram afirmar que:

(a) Os ovos analisados pertenciam a quatro (04) espécies de aves (classe AVES) pertencentes à fauna silvestre brasileira, sendo duas (02) espécies de papagaios, uma (01) de

arara (ordem PSITTACIFORMES, família PSITTACIDAE) e uma (01) de coruja (ordem STRIGIFORMES, família STRIGIDAE);

(b) Cinquenta (50), dos cinquenta e oito (58) ovos apreendidos pertenciam à espécie *Amazona xanthops*, popularmente conhecida como papagaio-galego. Três ovos pertenciam à espécie *Ara ararauna*, conhecida como arara-canindé. Quatro ovos pertenciam à espécie *Amazona aestiva* (papagaio-verdadeiro) ou à espécie *Amazona ochrocephala* (papagaio-campeiro). Um dos ovos pertencia à espécie *Otus choliba*, conhecida como corujinha-do-mato.

(c) As cinco espécies de aves silvestres acima mencionadas são nativas do Brasil, estando relacionadas no anexo II da CITES (Convenção Sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Ameaçadas de Extinção), implementada pelo Decreto nº 3607, de 21.09.00.

Tabela IV.5. Resumo dos resultados de identificação de espécies realizados na investigação forense dos ovos apreendidos.

Número de ovos	Espécie	Nome-popular	Categoria	Anexo CITES
50	<i>Amazona xanthops</i>	papagaio-galego	Silvestre e nativa	II
3	<i>Ara ararauna</i>	arara-canindé	Silvestre e nativa	II
4	<i>Amazona aestiva</i> (ou <i>Amazona ochrocephala</i>)	papagaio-verdadeiro (ou papagaio-campeiro)	Silvestre e nativa	II (ambas as espécies)
1	<i>Otus choliba</i>	corujinha-do-mato	Silvestre e nativa	II

Tabela IV.6. Estimativas de similaridade das seqüências obtidas a partir dos quatro tipos de ovos com as seqüências obtidas de espécies identificadas morfologicamente. (*) Seqüência obtida neste trabalho.

	Espécie mais similar	Nº de acesso	Similaridade	Segunda espécie mais similar	Nº de acesso	Similaridade
Ovos Ax	<i>Amazona xanthops</i>	AY66986 1*	99,1 %	<i>Amazona amazonica</i>	3757506 6	93,6 %
Ovos Ao/Aa	<i>A. ochrocephala</i>	37780888	99,6 %	<i>Amazona aestiva</i>	3107434 0	99,2 %
Ovos Ara	<i>Ara ararauna</i>	31074342	98,8 %	<i>Orthopsittaca manilata</i>	3330511 5	92,7 %
Ovos Otus	<i>Otus choliba</i>	10312194	99,5 %	<i>Otus albogularis</i>	2279699 8	93,2 %

As espécies de araras e papagaios, que correspondiam a 57 dos 58 ovos, pertencem à família Psittacidae, sendo as espécies desta família conhecidas como psitacídeos. Os psitacídeos estão entre as aves mais visadas pelo comércio ilegal de animais, sendo muito valorizadas, seja pela sua beleza e colorido de suas penas, seja pelos sons que produzem.

As informações descritas acima serviram de base para a elaboração do Laudo Pericial Nº 1673/04 do Instituto Nacional de Criminalística do Departamento de Polícia Federal emitido no dia 30.06.04.

IV.9 Parâmetros utilizados na identificação de espécies

Uma simples busca no *GenBank*, utilizando a ferramenta *blast*, mostrou ser um parâmetro útil para direcionar novas análises, mas não uma ferramenta que permite uma determinação conclusiva da espécie à qual uma amostra questionada pertence. Até mesmo para direcionar a investigação no sentido de obter novas amostras e/ou realizar novas análises o poder do *blast* foi limitado. O *blast* não identificou, por exemplo, as espécies irmãs, disponíveis no *GenBank*, de jaguarundi e macaco-prego-de-barriga-amarela, o que poderia levar a errôneas conclusões de que a seqüência do primeiro provinha de uma das tantas subespécies de lince e que a do segundo provinha de um *Cebus* “sem tufos”. A utilização deste único parâmetro na identificação do sangue de cateto, por exemplo, teria sido desastrosa em função da supostamente elevada similaridade com tamanduá-bandeira.

De maneira geral, uma análise filogenética simples foi capaz de resolver as distorções apresentadas pela utilização da ferramenta *blast* como pode ser visto nas diversas análises filogenéticas de Tayassuidae, Cebidae e Felidae, realizadas neste trabalho. Estes resultados indicam, portanto, que somente depois de uma análise filogenética detalhada das seqüências questionadas juntamente com aquelas disponíveis no *GenBank*, e integrando o conhecimento disponível sobre a história evolutiva do grupo estudado, seja usando dados morfológicos, comportamentais, citogenéticos (Dobigny *et al.*, 2004) ou moleculares, é que uma identificação segura da espécie à qual a amostra questionada pertence é de fato alcançada.

O fato de Parson e colaboradores (2000) e Branicki e colaboradores (2003) não abordarem o uso da análise filogenética na identificação de espécies pode estar relacionado à pouca afinidade dos cientistas forenses a este tipo de análise, como sugerido por Bandelt e colaboradores (2001, 2004). As críticas de Bandelt e colaboradores, no entanto, parecem estar, aos poucos, surtindo efeito na comunidade forense (Budowle *et al.*, 2004). Os resultados obtidos sugerem que a capacitação e habituação dos cientistas forenses e peritos

criminais na análise filogenética é fundamental para a identificação de espécies usando seqüências gênicas.

Além do aspecto de precisão do resultado, uma árvore filogenética das seqüências utilizadas é extremamente útil para a visualização das relações entre estas. Neste sentido, propõe-se que uma árvore filogenética seja utilizada rotineiramente para ilustrar os resultados de identificação da espécie nos laudos periciais de identificação de espécie usando seqüências de genes mitocondriais. A árvore filogenética auxiliará o perito criminal a expressar o seu convencimento técnico e facilitará o entendimento da questão pelo juiz.

Apesar de os resultados indicarem a utilidade da análise filogenética na identificação de espécies, é importante lembrar as limitações deste tipo de análise feita a partir de alinhamentos curtos (cerca de 250-300 pb) e sem uma ampla representatividade dos táxons estudados. Uma seqüência nucleotídica, por exemplo, com similaridade em torno de 93% com *Puma concolor* e permanecendo agrupada como “espécie-irmã” de *Puma concolor*, por exemplo, apenas **sugere** tratar-se de jaguarundi. **Jamais** pode-se concluir tratar-se de jaguarundi antes da obtenção da seqüência deste e da verificação da alta similaridade (>99%) entre as seqüências.

Um tipo de análise que se mostrou satisfatória para a visualização de filogenias um pouco mais profundas (gêneros dentro de famílias, por exemplo) foi a consideração apenas das transversões. Aparentemente, a análise apenas das transversões, em algumas ocasiões, foi capaz de reduzir o ruído causado pelas mutações recorrentes, muito embora essa observação não tenha sido testada. Este tipo de análise, assim como a desconsideração da terceira posição do códon, parece ajudar tanto corroborando quanto invalidando uma determinada topologia encontrada.

A análise filogenética simples aqui reportada funcionou muito bem em três aspectos: (1) no direcionamento para a obtenção de novas amostras e seqüências, enquadrando a seqüência

questionada em subgrupos cada mais restritos e limitando o universo de busca; (2) na obtenção de parâmetros adicionais, além dos anteriormente recomendados, como a monofilia e a posição filogenética, para a conclusão da identificação; e (3) na compreensão das relações entre as seqüências por meio da visualização das árvores filogenéticas, apoiadas pelo conhecimento taxonômico já estabelecido. A análise filogenética mostrada não substitui os critérios anteriormente propostos.

Do ponto de vista estatístico, o teste de *bootstrap*, assim como outros testes similares, pode ser útil no esclarecimento de filogenias que levarão a identificação da espécie bem como na rejeição da hipótese de diferentes seqüências pertencerem a uma única espécie. O teste de *bootstrap*, no entanto, deve ser utilizado com cuidado. Se, por um lado, o teste é bastante utilizado, apesar de severas críticas (Sanderson, 1995), para mostrar a segurança de um agrupamento monofilético, por outro, ele pode levar ao falso entendimento de o valor de *bootstrap* refletir a segurança na identificação da espécie. Basta imaginarmos, por exemplo, um agrupamento de *Homo sapiens* com chimpanzé com valor de bootstrap de 100%. Apesar de no exemplo adotado o significado do *bootstrap* parecer óbvio, dada a nossa familiaridade com as espécies escolhidas, isto não é tão óbvio na identificação de espécies com filogenias menos conhecidas e com as quais temos menos familiaridade.

O critério recomendado por Hebert e colaboradores (2004), de diferenciar espécies quando a divergência superar em 10 vezes a variação intraespecífica, apesar de parecer promissor, carece de aplicação prática imediata. Em primeiro lugar, a premissa básica, da existência de uma estimativa da magnitude da variação intraespecífica no grupo estudado, raramente é satisfeita. Em segundo lugar, como ressaltado pelos próprios autores, esta classificação pode não refletir a classificação pré-existente. Como a definição das espécies nas listas de animais ameaçados normalmente é baseada em características morfológicas é preciso avaliar caso a caso, incluindo a presença de subespécies.

Do ponto de vista prático é importante que o investigador entenda qual efetivamente é o nível de identificação alcançado e ainda que em algumas espécies só será possível de chegar ao nível de gênero o que muitas vezes será suficiente para enquadrar um crime ambiental na categoria correta.

No futuro, talvez, com a adoção do conceito filogenético de espécie (Avice & Wollenberg, 1997), de nomes de espécies baseados em uma nomenclatura filogenética (Cantino *et al.*, 1999) ou de delimitações mais claras entre espécies (Sites & Marshall, 2003), as identificações de espécies se tornem mais acuradas e fáceis, requerendo menos conhecimento prévio. Do ponto de vista analítico, com os recentes desenvolvimentos de tecnologias genômicas cada vez mais eficientes envolvendo o sequenciamento de alto desempenho em sistemas miniaturizados (ex. Paegel *et al.*, 2002) provavelmente será possível automatizar a identificação de espécies (Gaston & O'Neill, 2004).

IV.10 Mais um potencial problema na identificação de espécies usando seqüências

Além dos potenciais problemas intrínsecos da técnica de identificação de espécies usando seqüências gênicas, revisados no capítulo I, durante as análises ficou evidente mais um potencial problema, também não abordado em publicações anteriores sobre o tema (Parson *et al.*, 2000; Branicki *et al.*, 2003): os erros nas seqüências do *GenBank*.

Três tipos de erros foram observados:

(1) O erro que provavelmente seja o menos problemático são os erros de sequenciamento. Estes erros foram observados na seqüência de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) obtida por Pitra e colaboradores (2004). Apesar dos diversos artigos salientando este problema e indicando as diversas ferramentas disponíveis para solucioná-los (Lawrence & Solovyev, 1994; Ewing & Green, 1998; Giddings *et al.*, 1998; Walther *et al.*,

2001), parece que o uso destas ferramentas ainda não está muito difundido. Os erros observados na seqüência de cervo-do-pantanal não são capazes de impedir uma identificação de espécies ou de causar uma identificação equivocada.

(2) Um dos erros potencialmente mais problemáticos foi o observado na seqüência dos clones de *Pecari tajacu* identificados erroneamente como *Tamandua tetradactyla*, provavelmente devido a uma contaminação. Lastimavelmente, os autores perceberam que a seqüência era “estranha”, mas não souberam identificar o problema, assumindo tratar-se de NUMTs (Greenwood *et al.*, 2001). Mesmo que fossem NUMTs, as seqüências não deveriam permanecer identificadas até hoje no *GenBank* como sendo de origem mitocondrial. O mínimo que se esperaria do autor de uma seqüência como essa é que não assinalasse a origem da seqüência como mitocondrial, mas não foi isso o observado.

(3) Enquanto era avaliado o potencial risco do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) hibridizar com a preá (*Cavia aperea*) ou dessas espécies compartilharem polimorfismos ancestrais, erros de identificação da seqüência no *GenBank* também pareceram ainda mais problemáticos. A julgar pelas seqüências disponíveis, *Cavia porcellus*, com 11 seqüências completas de *cytb*, parece perfeitamente monofilética. *Cavia aperea*, por outro lado, tem uma seqüência idêntica a *Cavia tschudii* (Figura IV.34). No artigo publicado pelos autores das seqüências, entretanto, não foi isso o observado (Spotorno *et al.*, 2004). A explicação mais plausível para essa incongruência é que na hora de depositar uma das seqüências de *C. tschudii*, os autores copiaram e colaram, inadvertidamente, uma seqüência de *C. aperea*.

Uma identificação de espécies baseada unicamente na similaridade com uma seqüência disponível no *GenBank*, assume o sério risco de a seqüência estar incorretamente identificada. Os erros encontrados no *GenBank* são mais um claro incentivo para a obtenção de novas seqüências das espécies da fauna brasileira de interesse forense.

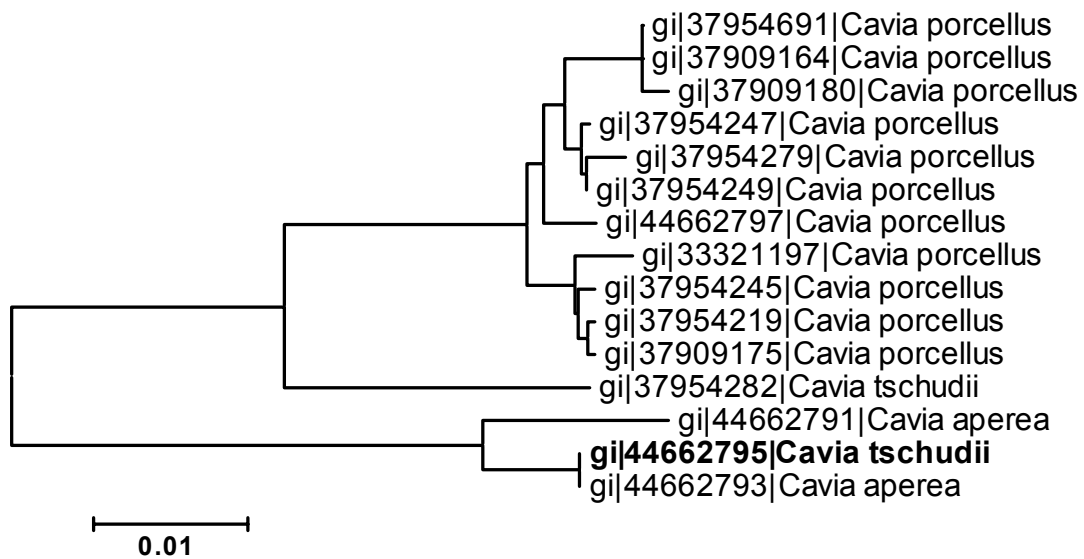


Figura IV.34. Árvore filogenética das seqüências completas de *cytb* do gênero *Cavia* disponíveis no *GenBank*. A árvore é semelhante à publicada por Spotorno e colaboradores (2004), com exceção da posição da seqüência de *C. tschudii* destacada em negrito. Segundo os autores, esta seqüência não só não é idêntica à de *C. aperea*, como é mais similar à outra seqüência de *C. tschudii*. Árvore construída no *Mega2*, usando a distância p e o algoritmo NJ.

IV.11 Identificação de espécies usando genes mitocondriais na entomologia forense

Para avaliar se os estudos de identificação de espécies de Diptera de importância forense (Catts & Haskell, 1991; Oliveira-Costa, 2003) desenvolvidos em outros países poderiam ser estendidos para as populações de moscas do Brasil, foram obtidas amostras de seis indivíduos da varejeira *Chrysomya albiceps*, a espécie de maior importância forense no sudeste e centro-oeste do Brasil, coletados sobre carcaças de porcos.

A grande superioridade de *cytb* em relação a *coI* no quesito abundância no *GenBank*, encontrada nos Amniota, inverte-se quando são estudados dípteros (Tabela III.7). Neste sentido é interessante, por exemplo, comparar a abundância de seqüências entre as Tabelas IV.1 e IV.7. Optou-se, portanto pelo uso do sequenciamento do gene *coI* para estudar as amostras obtidos.



Figura IV.35. Varejeira *Chrysomya albiceps*, da família Calliphoridae. As larvas desta espécie costumam predominar em cadáveres encontrados em grande parte do Brasil e são úteis na estimativa do “Intervalo *Post-Mortem*”.

Tabela IV.7: Número de seqüências de *cytb* e *coI* da ordem e das duas famílias de insetos de maior importância forense depositadas no *GenBank*. Tabela atualizada no dia 01.12.04.

Grupo	<i>cytb</i>	<i>coI</i>
Diptera	596	4502
Calliphoridae	5	234
Sarcophagidae	0	37

A seqüência da subunidade I da citocromo c oxidase das moscas estudadas foi exatamente igual àquelas isoladas na África e na Austrália (Harvey *et al.*, 2003b).

Apesar de terem sido obtidas seqüências de apenas seis indivíduos de uma única espécie, estes resultados sugerem que a utilização da *coI* na identificação de insetos de importância forense será eficiente e indicam ainda que os iniciadores sugeridos por Hebert e colaboradores (2003) podem ser utilizados para tal fim.

V CONCLUSÕES

A identificação de espécies baseada no sequenciamento e análise comparativa de trechos dos genes mitocondriais citocromo b e subunidade I da citocromo c oxidase mostrou ser uma ferramenta eficiente e útil para auxiliar investigações forenses de crimes contra a fauna.

Entretanto, o poder da técnica em resolver com acurácia questões de identificação depende fundamentalmente da existência de um conhecimento da filogenia do grupo animal estudado. Identificar a espécie de um felídeo, por exemplo, é certamente mais fácil do que identificar a espécie de um grupo animal sobre o qual não existe qualquer estudo de filogenia molecular.

A disponibilidade e abundância de seqüências destes genes mitocondriais no *GenBank* também é um aspecto crucial para uma identificação mais rápida e precisa. Neste quesito, certamente, o citocromo b mostra uma superioridade em relação à citocromo oxidase I como ferramenta de identificação.

Os poucos estudos filogenéticos feitos com alguns grupos de animais da fauna brasileira podem tornar a identificação de espécies ameaçadas extremamente demorada e imprecisa. Um esforço concentrado para a obtenção de seqüências de citocromo b de uma ampla gama da diversidade faunística brasileira, no entanto, poderia reduzir o tempo da identificação de um vestígio. O presente trabalho buscou avançar nesse sentido, acrescentando conhecimento filogenético e disponibilizando seqüências de algumas espécies chave da fauna brasileira visando facilitar o trabalho pericial da justiça brasileira apontando ainda alguns grupos de animais que demandam maiores estudos.

As análises realizadas indicaram ainda que, ciente das limitações do uso dos genes mitocondriais na identificação de espécies, é possível fazer uma identificação segura, se não da espécie, pelo menos do gênero investigado. Avaliando os fatores de risco, como a

qualidade da seqüência e a possibilidade de polifilia e de inserções nucleares, e fazendo uma análise filogenética que envolva a espécie em questão com suas espécies próximas, a identificação de espécies pode ser utilizada com segurança para finalidades de investigação forense.

Por não haver diferença significativa entre o citocromo b e o citocromo oxidase I no que se refere ao conteúdo informativo para identificação de espécies, e ainda tendo em vista uma abundância significativamente maior de seqüências de *cytb* no *GenBank*, recomenda-se que o sequenciamento do citocromo b seja utilizado preferencialmente nos estudos de identificação de espécies com fins forenses. Recomenda-se ainda que as seqüências disponíveis no *GenBank* sejam cuidadosamente avaliadas, seja do ponto de vista dos parâmetros qualitativos adotados na sua geração, seja do ponto de vista da ocorrência de códons de parada (utilizando o código mitocondrial), sempre que possível consultando os artigos aos quais as seqüências depositadas são vinculadas. As análises realizadas neste trabalho indicaram que frequentemente uma análise filogenética simples pode aumentar em muito a segurança da identificação da espécie sendo, portanto, altamente recomendada, principalmente em situações de investigação criminal. Um resumo das sugestões apresentadas encontra-se, de forma esquemática, no Anexo I.

Por fim, este trabalho, por ter um foco de investigação forense, pretende estimular a comunidade científica envolvida em estudos taxonômicos e evolutivos dos mais diversos grupos animais, sobretudo aqueles mais vitimados nos crimes contra a fauna, a gerar e disponibilizar no *GenBank* seqüências de citocromo b ou mesmo amostras de suas espécies de estudo para laboratórios devotados à investigação forense. Desta forma, além de aumentar o conhecimento sobre a nossa rica biodiversidade animal, também será feita uma importante contribuição no sentido de fomentar o combate eficiente aos crimes contra a fauna brasileira.

VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.R.; Kelly, B.T.; Waits, L.P. *Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (Canis rufus) and coyotes (Canis latrans)*. *Molecular Ecology*, **12**(8), p. 2175-2186, 2003a.
- Adams, J.R.; Leonard, J.A.; Waits, L.P. *Widespread occurrence of a domestic dog mitochondrial DNA haplotype in southeastern US coyotes*. *Molecular Ecology*, **12**(2), p. 541-546, 2003b.
- Albertson, R.C.; Markert, J.A.; Danley, P.D.; Kocher, T.D. *Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **96**(9), p. 5107-5110, 1999.
- Allen, M.; Engström, A.S.; Meyers, S.; Handt, O.; Saldeen, T.; von Haeseler, A.; Pääbo, S.; Gyllensten, U. *Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities*. *Journal of Forensic Science*, **43**, p. 453-464, 1998.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. *Basic local alignment search tool*. *Journal of Molecular Biology*, **215**, p. 403-410, 1990.
- Alves, P.C.; Ferrand, N.; Suchentrunk, F.; Harris, D.J. *Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **27**(1), p. 70-80, 2003.
- Amorim, D.S. *Elementos básicos de sistemática filogenética*. Holos Editora, 2ª ed., Ribeirão Preto, 276 p., 1997.
- Arnheim, N.; Erlich, H. *Polymerase chain reaction strategy*. *Annual Review of Biochemistry*, **61**, p. 131-156, 1992.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. *Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics*. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, p. 489-522, 1987.
- Avise, J.C.; Wollenberg, K. *Phylogenetics and the origin of species*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**(15), p. 7748-7755, 1997.

- Baker, C.S.; Palumbi, S.R. *Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling*. *Science*, **256**, p. 1538-1539, 1994.
- Ballard, J.W.O.; Whitlock, M.C. *The incomplete natural history of mitochondria*. *Molecular Ecology*, **13**, p. 729-744, 2004.
- Bandelt, H.J.; Lahermo, P.; Richards, M.; Macaulay, V. *Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis*. *International Journal of Legal Medicine*, **115**(2), p. 64-69, 2001.
- Bandelt, H.J.; Salas, A.; Bravi, C. *Problems in FBI mtDNA database*. *Science*, **305**(5689), p. 1402-1404, 2004.
- Bania, J.; Ugorski, M.; Polanowski, A. *Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow*. *Journal of Dairy Research*, **68**, p. 333-336, 2001.
- Barry, J.C.; Morgan, M.E.; Winker, A.J.; Flynn, L.J.; Lindsay, E.H.; Jacobs, L.L.; Pilbeam, D. *Faunal interchange and Miocene terrestrial vertebrates of southern Asia*. *Paleobiology*, **17**, p. 231-245, 1991.
- Beissinger, S.R.; Snyder, N.F.R. *New World parrots in crisis: solutions from conservation biology*. Smithsonian Institution, EUA, 288 p., 1992.
- Bello, N.; Francino, O.; Sanchez, A. *Isolation of genomic DNA from feathers*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **13**(2), p. 162-164, 2001.
- Bensasson, D.; Zhang, D-X.; Hartl, D.L.; Hewitt, G.M. *Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses*. *TRENDS in Ecology & Evolution*, **16**(6), p. 314-321, 2001.
- Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Rapp, B.A.; Wheeler, D.L. *GenBank*. *Nucleic Acids Research*, **28**(1), p. 15-18, 2000.
- Bistein, V.J.; Doukakis, P.; Sorkin, B.; DeSalle, R. *Population aggregation analysis of three caviar-producing species of sturgeons and implications for the species identification of black caviar*. *Conservation Biology*, **12**(4), p. 766-775, 1998.
- Bourel, B.; Callet, B.; Hédouin, V.; Gosset, D. *Flies eggs: a new method for the estimation of short-term post-mortem interval?* *Forensic Science International*, **135**, p. 27-34, 2003.
- Bouvier, M.; Price, T. *Evolution of F1 post-zygotic incompatibilities in birds*. *Evolution*, **56**, p. 2083-2089, 2002.

- Bowles, D. *Wildlife trade – a conserver or exploiter?* In: Taylor, V.J.; Dunstone, N. *The exploitation of mammal populations*. Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, 415 p., 1996.
- Branciarri, R.; Nijman, I.J.; Plas, M.E.; Di Antonio, E.; Lenstra, J.A. *Species origin of milk in Italian mozzarella and Greek feta cheese*. *Journal of Food Protection*, **63**, p. 408-411, 2000.
- Branicki, W.; Kupiec, T.; Pawlowski, R. *Validation of Cytochrome b sequence analysis as a method of species identification*, *Journal of Forensic Sciences*, **48**(1), p. 83-87, 2003.
- Brasil. *Lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998*. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente. Diário Oficial da União, Brasília, 13 de fevereiro de 1998.
- Brasil. *Decreto Nº 3.607, de 21 de setembro de 2000*. Dispõe sobre a implementação da Convenção sobre Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 22 de setembro de 2000.
- Brasil. *Relatório final da comissão parlamentar de inquérito destinada a “investigar o tráfico ilegal de animais e plantas silvestres da fauna e da flora brasileiras” – CPITRAFI*. Câmara dos Deputados, 2003. Disponível no endereço www.camara.gov.br desde 31.01.03, acessado no dia 24.12.04.
- Brown, W.M.; George, M.Jr.; Wilson, A.C. *Rapid evolution of animal mitochondrial DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **76**, p. 1967-1971, 1979.
- Budowle, B.; Allard, M.W.; Wilson, M.R.; Chakraborty, R. *Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates and foundations*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **4**, p. 119-141, 2003.
- Budowle, B.; Polankey, D.; Allard, M.W.; Chakraborty, R. *Addressing the use of phylogenetics for identification of sequences in error in the SWGDAM mitochondrial DNA database*. *Journal of Forensic Sciences*, **49**(6), p. 1256-1261, 2004.
- Cantino, P.D.; Bryant, H.N.; Queiroz, K.; Donoghue, M.J.; Eriksson, T.; Hillis, D.M.; Lee, M.S.Y. *Species names in phylogenetic nomenclature*. *Systematic Biology*, **48**(4), p. 790-807, 1999.
- Caparroz, R.; Duarte, J.M.B. *Chromosomal similarity between the Scaly-headed parrot (Pionus maximiliani), the Short-tailed parrot (Graydidascalus brachyurus) and the Yellow-*

- facéd parrot (Salvatoria xanthops)(Psittaciformes: Aves): a cytotaxonomic analysis.* Genetics and Molecular Biology, **27**(4), p. 522-528, 2004.
- Caparroz, R.; Miyaki, C.Y.; Morgante, J.S.; Baker, A.J. *Filogeografia e estrutura genética da arara-canindé (Ara ararauna) pela análise da região controle do DNA mitocondrial.* In: Caparroz, R. *Filogeografia, estrutura e variabilidade genética da arara-canindé (Ara ararauna, Psittaciformes: Aves) no Brasil baseadas na análise de DNA mitocondrial e de DNA nuclear.* Teste de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2003.
- Carvalho, L.M.L.; Thyssen, P.J.; Linhares, A.X.; Palhares, F.A.B. *A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil.* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, **95**(1), p. 135-138, 2000.
- Catts, E.P.; Haskell, N.H. *Entomology and death: a procedural guide.* Joyce's Print Shop, Clemson, EUA, 1991.
- CBRO (Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos). *Listas de aves do Brasil.* 2000. Disponível em <www.ib.usp.br/cbro>, acessado em 03.12.04.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). CITES Website, 2001. Disponível no endereço: <www.cites.org>, acessado em 03.12.04.
- Collar, N.J. *Family Psittacidae (parrots).* In: Del Hoyo, J.; Elliot, A.E.; Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the birds of the world*, vol. 4, Lynx Editions, Barcelona, Espanha, p. 280-477, 1997.
- Crochet, P.A.; Chen, J.Z.; Pons, J.M.; Lebreton, J.D.; Hebert, P.D.; Bonhomme, F. *Genetic differentiation at nuclear and mitochondrial loci among large white-headed gulls: sex-biased interspecific gene flow?* Evolution; International Journal of Organic Evolution, **57**(12), p. 2865-2878, 2003.
- Culver, M.; Johnson, W.E.; Pecon-Slatery, J.; O'Brien, S.J. *Genomic ancestry of the American puma (Puma concolor).* Journal of Heredity, **91**(3), p. 186-197, 2000.
- Davison, A.; Birks, J.D.S. Brookes, R.C.; Messenger, J.E.; Griffiths, H.I. *Mitochondrial phylogeography and population history of pine martens Martes Martes compared with polecats Mustela putorius.* Molecular Ecology, **10**(10), p. 2479-2488, 2001.
- Delsuc, F.; Scally, M.; Madsen, O.; Stanhope, M.J.; Jong, W.W.; Catzeflis, F.M.; Springer, M.S.; Douzery, E.J.P. *Molecular phylogeny of living xenarthrans and the impact of*

- character and taxon sampling on the placental tree rooting*. *Molecular Biology and Evolution*, **19**(10), p. 1656-1671, 2002.
- Delsuc, F.; Stanhope, M.J.; Douzery, E.J.P. *Molecular systematics of armadillos (Xenarthra, Dasypodidae): contribution of maximum likelihood and Bayesian analyses of mitochondrial and nuclear genes*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28**, p. 261-275, 2003.
- Dobigny, G.; Ducroz, J.F.; Robinson, T.; Volobouev, V. *Cytogenetics and cladistics*. *Systematic Biology*, **53**(3), p. 470-484, 2004.
- Dobzhansky, T. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York, EUA, 1937.
- Donovan, S.K. *Mass Extinctions*. Columbia University Press, New York, EUA, 1989.
- Douzery, E.; Lebreton, J.D.; Catzeflis, F.M. *Testing the generation time hypothesis using DNA/DNA hybridization between artiodactyls*. *Journal of Evolutionary Biology*, **8**, p. 511-529, 1995.
- Douzery, E.; Randi, E. *The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content*. *Molecular Biology and Evolution*, **14**(11), p. 1154-1166, 1997.
- Duarte, J.M.B.; Caparroz, R. *Cytotaxonomic analysis of Brazilian species of the genus Amazona (Psittacidae, Aves) and the confirmation of the genus Salvatoria (Ribeiro, 1920)*, *Revista Brasileira de Genética*, **18**, p. 623-628, 1995.
- Duarte, J.M.B.; Garcia, J.E.; Ferraudo, A.S.; Ramos, P.R.R.; Jorge, W. *Reestruturação taxonômica do gênero Mazama no Brasil através de características genéticas e morfológicas*. in: Duarte, J.M.B. *Análise citogenética e taxonômica do gênero Mazama (Artiodactyla, Cervidae) no Brasil*. Tese de Doutorado, UNESP, Botucatu, Brasil, 1998.
- Eberhard, J.R.; Bermingham, E. *Phylogeny and biogeography of the Amazona ochrocephala (Aves: Psittacidae) complex*. *The Auk*, **121**(2), p. 318-332, 2004.
- Ewing, B.; Green, P. *Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities*. *Genome Research*, **8**(3), p. 186-194, 1998.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C.; Green, P. *Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment*. *Genome Research*, **8**(3), p. 175-185, 1998.

- Fang, S.; Wan, Q. *A genetic fingerprinting test for identifying carcasses of protected deer species in China*. *Biology and Conservation*, **103**, p. 371-373, 2002.
- Felsenstein, J. *Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap*. *Evolution*, **39**, p. 783-791, 1985.
- Ferri, S.D.; Sage, R.D.; Huang, C.M.; Nielsen, J.T.; Ritte, U.; Wilson, A.C. *Flow of mitochondrial DNA across a species barrier*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **80**, p. 2290-2294, 1983.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, p. 294-299, 1994.
- Fonseca, G.A.B.; Hermmann, G.; Leite, Y.L.R.; Mittermeier, R.A.; Rylands, A.B.; Patton, J.L. *Lista anotada dos mamíferos do Brasil*. *Occasional Papers in Conservation Biology*, **4**, p. 01-38, 1996.
- Forshaw, J. *Parrots of the world*. Landsdowne Editions, Austrália, 1989.
- Freeland, J.R.; Boag, P.T. *Phylogenetics of Darwin's finches: paraphyly in the tree-finches, and two divergent lineages in the warbler finch*. *The Auk*, **116**(3), p. 577-588, 1999.
- Funk, D.J.; Omland, K.E. *Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **34**, p. 397-423, 2003.
- Galbreath, K.E.; Cook, J.A. *Genetic consequences of Pleistocene glaciations for the tundra vole (*Microtus oeconomus*) in Beiringia*. *Molecular Ecology*, **13**, p. 135-148, 2004.
- Garcia-Rodriguez, A.I.; Bowen, B.W.; Domming, D.; Mignucci-Giannoni, A.A.; Marmontel, M.; Montoya-Ospina, R.A.; Morales-Vela, B.; Rudin, M.; Bonde, R.K.; McGuire, P.M. *Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa?* *Molecular Ecology*, **7**, p. 1137-1149, 1998.
- Gaston, K.J.; O'Neill, M.A. *Automated species identification: why not?* *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **359**, p. 655-667, 2004.
- Gentry, A.; Clutton-Brock, J.; Groves, C.P. *The naming of wild animal species and their domestic derivatives*. *Journal of Archeological Science*, **31**, p. 645-651, 2004.

- Giddings, M.C.; Severin, J.; Westphall, M.; Wu, J.; Smith, L.M. *A software system for data analysis in automated DNA sequencing*. Genome Research, **8**(6), p. 644-665, 1998.
- Gill, F.B. *Hibridization in birds*. The Auk, **115**(2), p. 281-283, 1998.
- Good, J.M.; Demboski, J.R.; Nagorsen, D.W.; Sullivan, J. *Phylogeography and introgressive hybridization: chipmunks (genus Tamias) in the northern Rocky Mountains*. Evolution, **57**(8), p. 1900-1916, 2003.
- Goodman, M.; Porter, C.A.; Czelusniak, J.; Page, S.L.; Schneider, H.; Shoshani, J.; Gunnell, G.; Groves, C.P. *Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence*. Molecular Phylogenetics and Evolution, **9**(3), p. 585-598, 1998.
- Goodman, S.J.; Barton, N.H.; Swanson, G.; Abernethy, K.; Pemberton, J.M. *Introgression through rare hybridization: a genetic study of hybrid zone between red and sika deer (genus Cervus) in Argyll, Scotland*. Genetics, **152**, p. 355-371, 1999.
- Goudie, A. *The human impact on the natural environment*. 4^a ed. MIT Press, Massachusetts, EUA, 454 p., 1994.
- Grant, P.R.; Grant, B.R. *Hybridization of bird species*. Science, **256**, p. 193-197, 1992.
- Grant, P.R.; Grant, B.R. *Genetics and the origin of bird species*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **94**, p. 7768-7775, 1997.
- Gray, A.P. *Mammalian Hybrids*. Commonwealth Agricultural Bureaux, Reino Unido, 1972.
- Greenberg, B.D.; Newbold, J.E., Sugino, A. *Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA*. Gene, **21**, p. 33-44, 1983.
- Greenwood, A.D.; Castresana, J.; Feldmaier-Fuchs, G.; Pääbo, S. *A molecular phylogeny of two extinct sloths*. Molecular Phylogenetics and Evolution, **18**(1), p. 94-103, 2001.
- Groves, C.P.; *A theory of human and primate evolution*. Oxford University Press, New York, EUA, 375 p., 1989.
- Groves, C.P.; Grubb, P. *Relationships of living deer*. In: Wemmer, C.M. (ed.), *Biology and Management of Cervidae*. Smithsonian Institution Press, Washington, EUA, 1987. (disponível em “<http://arts.anu.edu.au/grovco>”, acessado em 23.11.04)

- Grubb, P.; Groves, C.P. *The neotropical peccaries – Dicotylidae: Tayassu and Catagonus*. In: Oliver, W.L.R. (ed.). *Pigs, peccaries and Hippos*. IUCN, The World Conservation Union, p. 5-7, 1993.
- Hall, T.A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series, **41**, p. 95-98, 1999.
- Hare, M.P.; Cipriano, F.; Palumbi, S.R. *Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species*. *Evolution*, **56**(4), p. 804-816, 2002.
- Harrison, R.G. (ed.) *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, EUA, 376 p., 1993.
- Harvey, M.L.; Dadour, I.R.; Gaudieri, S. *Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia*. *Forensic Science International*, **131**, p. 134-139, 2003a.
- Harvey, M.L.; Mansell, M.W.; Villet, M.H.; Dadour, I.R. *Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia*. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, p. 363-369, 2003b.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWard, J.R. *Biological identifications through DNA barcodes*, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, **270**(1512), p. 313-321, 2003.
- Hebert, P.D.N.; Stoeckle, M.Y.; Zemplak, T.S.; Francis, C.M. *Identification of birds through DNA barcodes*. *PLoS Biology*, **2**(10), p. 1657-1663, 2004.
- Hennig, W. *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana, EUA, 1966.
- Hill, W.C.O. *Primates comparative anatomy IV. Cebidae Part A*. Edinburgh University Press, Edinburgh, 1960.
- Hold, G.L.; Russel, V.J.; Pryde, S.E.; Rehbein, H.; Quintero, J.; Vidal, R.; Rey-Mendez, M.; Sotelo, C.G.; Perez-Martin, R.I.; Santos, A.T.; Rosa, C. *Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(3), p. 1175-1179, 2001.
- Holmes, B. *Barcode me*. *New Scientist*, edição de 26 de junho, p. 32-35, 2004.

- Höss, M.; Kohn, M.; Pääbo, S.; Knauer, F.; Schroder, W. *Excrement analysis by PCR*. Nature, **359**, p. 199, 1992.
- Hsieh, H-M.; Chiang, H.L.; Tsai, L.C.; Lai, S.Y.; Huang, N.E.; Linacre, A.; Lee, J.C. *Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals*. Forensic Science International **122**(1), p. 7-18; 2001.
- Hsieh, H.M.; Huang, L.H.; Tsai, L.C.; Kuo, Y.C.; Meng, H.H.; Linacre, A.; Lee, J.C. *Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene*. Forensic Science International, **136**, p. 1-11, 2003.
- Hudson, R.R. *Gene genealogies and the coalescent process*. In: Futuyma, D.J.; Antonovics, J. (eds.) *Oxford surveys in Evolutionary Biology*, Oxford University Press, EUA, 1990.
- Janczewski, D.N.; Modi, W.S.; Stephens, J.C.; O'Brien, S.J. *Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the Pantherine lineage of Felidae*. Molecular Biology and Evolution, **12**, p. 690-707, 1995.
- Johnson, W.E.; O'Brien, S.J. *Phylogenetic reconstruction of the felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes*. Journal of Molecular Evolution, **44**(S1), p. S98-S-116, 1997.
- Johnson, W.E.; Slattery, J.P.; Eizirik, E.; Kim, J.H.; Raymond, M.M.; Bonacic, C.; Cambre, R.; Crawshaw, P.; Nunes, A.; Seuánez, H.N.; Moreira, M.A.M.; Seymour, K.L.; Simon, F.; Swanson, W.; O'Brien, S.J. *Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species*. Molecular Ecology, **8**(S1), S79-S94, 1999.
- Kimura, M. *A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. Journal of Molecular Evolution, **16**, p. 155-162, 1980.
- Kocher, T.D.; Thomas, W.K.; Meyer, A.; Edwards, S.V.; Pääbo, S.; Villablanca, F.X.; Wilson, A.C. *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **86**, p. 6196-6200, 1989.
- Kruckenhauser, L.; Haring, E.; Pinsker, W.; Riesing, M.J.; Winkler, H.; Wink, M.; Gamauf, A. *Genetic vs. morphological differentiation of Old World buzzards (genus Buteo, Accipitridae)*. Zoologica Scripta, **33**(3), p. 197-211, 2004.

- Kulikova, I.V.; Zhuravlev, Y.N.; McCracken, K.G. *Asymetric hybridization and sex-biased gene flow between eastern spot-billed ducks (Anas zonorhyncha) and mallards (A. platyrhynchos) in the russian far east*. *The Auk*, **121**(3), p. 930-949, 2004.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. B.; Nei, M. *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, *Bioinformatics*, **17**(12), p.1244-1245, 2001.
- Konig, C.; Weick, F.; Becking, J.H. *Owls: a guide to the owls of the world*. Yale University Press, EUA, 320 p., 1999.
- Kooski, L.B.; Golding, G.B. *The closest BLAST hit is often not the nearest neighbor*, *Journal of Molecular Evolution*, **52**, p. 540-542, 2001.
- Lawrence, C.B.; Solovyev, V.V. *Assignment of position-specific error probability to primary DNA sequence data*. *Nucleic Acids Research*, **22**(7), p. 1272-1280, 1994.
- Leakey, R.E.; Lewin, R. *The sixth extinction: patterns of life and the future of humankind*. Anchor Books, EUA, 288 p., 1996.
- Liebers, D.; Helbig, A.J.; de Knijff, P. *Genetic differentiation and phylogeography of gulls in the Larus cachinnans-fuscus group (Aves: Charadriiformes)*. *Molecular Ecology*, **10**(10), p. 2447-2462, 2001.
- Lopez, J.V.; Culver, M.; Stephens, J.C.; Johnson, W.E.; O'Brien, S.J. *Rates of nuclear and cytoplasmic mitochondrial DNA sequence divergence in mammals*. *Molecular Biology and Evolution*, **14**(3), p. 277-286, 1997.
- Ludt, C.J.; Schroeder, W.; Rottmann, O.; Kuehn, R. *Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (Cervus elaphus)*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **31**(3), p. 1064-1083, 2004.
- Mank, J.E.; Carlson, J.E.; Brittingham, M.C. *A century of hybridization: decreasing genetic distance between american black ducks and mallards*. *Conservation Genetics*, **5**, p. 395-403, 2004.
- Malgorn, Y.; Coquoz, R. *DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: An interest in forensic entomology*. *Forensic Science International*, **102**, p. 111-119, 1999.
- Masuda, R.; Lopez, J.P.; Slattey, J.P.; Yuhki, N.; O'Brien. *Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **6**(3), 1996.

- Mattioli, S.R. (ed.). *Biologia molecular e evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, 202 p., 2001.
- Maudet, C.; Taberlet, P. *Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism*. Journal of Dairy Research, **68**, p. 229-235, 2001.
- Mayr, E. *Animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, EUA, 1963.
- Mayr, E. *Wu's genic view of speciation*. Journal of Evolutionary Biology, **14**, p. 866-867, 2001.
- Meijaard, E.; Groves, C.P. *A taxonomic revision of the Tragulus mouse-deer (Artiodactyla)*. Zoological Journal of the Linnean Society, **140**, p. 63-102, 2004.
- Menotti-Raymond, M.A.; David, V.A.; O'Brien, S.J. *Pet cat hair implicates murder suspect*. Nature, **386**, p. 774, 1997.
- Meyer, A. *Phylogenetic relationships and evolutionary processes in east African cichlid fishes*. Trends in Ecology and Evolution, **8**, p. 279-284, 1993.
- Miranda, G.H.B. *Ecologia e conservação do tamanduá-bandeira (Myrmecophaga tridactyla, Linnaeus, 1758) no Parque Nacional das Emas*. Tese de Doutorado, Programa-de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, 2004.
- Mittermeier, R.A.; Gil, C.G.; Mittermeier, C.G. (eds.). *Megadiversity: earth's biologically wealthiest nations*. Cemex, México, 1997.
- Miyaki, C.Y. *Um estudo filogenético de psitacídeos (Psittaciformes, Aves) baseado em seqüências de genes mitocondriais*. São Paulo, 1996. 129 f. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- Miyaki, C.Y.; Mattioli, S.R.; Burke, T.; Wajntal, A. *Parrot evolution and paleogeographical events: mitochondrial DNA evidence*. Molecular Biology and Evolution, **15**(5), p. 544-551, 1998.
- Montón, M. *Algunos aspectos significativos en la adaptación de los psitácidos de Sudamérica*. Revista del Parque Zoológico de Barcelona, **30**, p. 19-22, 1977.
- Moore, W.S. *Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees*. Evolution, **49**, p. 718-726, 1995.

- Moreira, M.A.M. *SRY evolution in Cebidae (Platyrrhini: Primates)*. Journal of Molecular Evolution, **55**, p. 92-103, 2002.
- Moritz, C.; Dowling, T.E.; Brown, W.M. *Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics*. Annual Review of Ecology and Systematics, **18**, p. 269-292, 1987.
- Moscarella, R.A.; Aguilera, M.; Escalante, A.A. *Phylogeography, population structure and implications for conservation of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) in Venezuela*. Journal of Mammalogy, **84**(4), p. 1300-1315, 2003.
- Moura, M.O.; Carvalho, C.J.B.; Monteiro-Filho, E.L.A. *A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná*, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, **92**(2), p. 269-274, 1997.
- Müllенbach, R.; Lagoda, P.J.I.; Welter, C. *An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues*, Trends in Genetics, **5**, p. 391, 1989.
- Mundy, N.I.; Pissinatti, A.; Woodruff, D.S. *Multiple nuclear insertions of mitochondrial cytochrome b sequences in callitrichine primates*. Molecular Biology and Evolution, **17**(7), p. 1075-1080, 2000.
- Murakami, T.; Asano, M.; Ohtaishi, N. *Mitochondrial DNA variation in the japanese marten Martes melampus and japanese sable, Martes zibellina*. The Japanese Journal of Veterinary Research, **51**(3-4), p. 135-142, 2004.
- Nei, M.; Kumar, S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Reino Unido, 333 p., 2000.
- Nowak, R.M. *Walker's mammals of the world online, version 5.1*. Johns Hopkins University Press, 1997. http://www.press.jhu.edu/books/walkers_mammals_of_the_world/
- Oliveira-Costa, J. *Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios*. Millennium Editora, Campinas/SP, 257 p., 2003.
- Pace, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, **276**, 734-740, 1997.
- Paegel, B.M.; Emrich, C.A.; Wedemayer, G.J.; Scherer, J.R.; Mathies, R.A. *High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **99**(2), p. 574-579, 2002.

- Palumbi, S.R.; Cipriano, F. Species identification using genetic tool: the value of nuclear and *mitochondrial gene sequences in whale conservation*. *Journal of Heredity*, **89**, p. 459-464, 1998.
- Palumbi, S.R.; Martin, A.; Romano, S.; McMillan, W.O.; Stice, L.; Grabowski, G. *The simple fool's guide to PCR, version 2.0*. University of Hawaii Press, Honolulu, 1991.
- Parson, W.; Pegoraro, K.; Niederstätter, H.; Föger, M.; Steinlechner, M. *Species identification by means of cytochrome b gene*, *International Journal of Legal Medicine*, **114**, p. 23-28, 2000.
- Pascali, V.L.; Bisol, G.D.; Dobosz, M.; d'Aloja, E.; Paonessa, G.; Mereu, U. *Chimpanzee DNA profiles on trial*. *Nature*, **367**, p. 692-693, 1994.
- Paxinos, E.; McIntosh, C.; Ralls, K.; Fleischer, R. *A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung*. *Molecular Ecology*, **6**, p. 375-381, 1994.
- Pereira, S.L.; Baker, A.J. *Low number of mitochondrial pseudogenes in the chicken (Gallus gallus) nuclear genome: implications for molecular inference of population history and phylogenetics*. *BMC Evolutionary Biology*, **4** (17), 2004.
- Pfunder, M.; Holzgang, O.; Frey, J.E. *Development of microarray-based diagnostics of voles and shrews for use in biodiversity monitoring studies, and evaluation of mitochondrial cytochrome oxidase I vs. cytochrome b as genetic markers*, *Molecular Ecology*, **13**(5), p. 1277-1286, 2004.
- Pierce, S.K.; Massey, S.E.; Curtis, N.E.; Smith, G.N.; Olavarria, C.; Mangel, T.K. *Microscopic, biochemical, and molecular characteristics of the Chilean Blob and a comparison with the remains of other sea monsters: nothing but whales*. *The Biological Bulletin*, **206**, p. 125-133, 2004.
- Pierpaoli, M.; Birò, Z.S.; Herrmann, M.; Hupe, K.; Fernandes, M.; Ragni, B.; Szemethy, L.; Randi, E. *Genetic distinction of wildcat (Felis silvestris) populations in Europe, and hybridization with domestic cat in Hungary*. *Molecular Ecology*, **12**(10), p. 2585-2598, 2003.
- Piganeau, G.; Gardner, M.; Eyre-Walker, A. *A broad survey of recombination in animal mitochondria*. *Molecular Biology and Evolution*, **21**(12), p. 2319-2325, 2004.

- Pitra, C.; Fickel, J.; Meijaard, E.; Groves, P.C. *Evolution and phylogeny of old world deer*. Molecular Phylogenetics and Evolution, **33**, p. 880-895, 2004.
- Randi, E.; Mucci, N.; Pierpaoli, M.; Douzery, E. *New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences, **265**, p. 793-801, 1998.
- Randi, E.; Alves, P.C.; Carranza, J.; Milosevic-Zlatanovic, S.; Sfougaris, A.; Mucci, N. *Phylogeography of roe deer (Capreolus capreolus) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics*. Molecular Ecology, **13**(10), p. 3071-3083, 2004.
- Ray, D.A.; Dever, J.A.; Platt, S.G.; Rainwater, T.R.; Finger, A.G.; McMurry, S.T.; Batzer, M.A.; Barr, B.; Stafford, P.J.; McKnight, J.; Densmore, L.D. *Low levels of nucleotide diversity in Crocodylus moreletti and evidence of hybridization with C. acutus*. Conservation Genetics, **5**, p. 449-462, 2004.
- Reich, D.E.; Wayne, R.K.; Goldstein, D.B. *Genetic evidence for a recent origin by hybridization of red wolves*. Molecular Ecology, **8**(1), p. 139-144, 1999.
- RENTAS (Rede Nacional de Combate ao Tráfico de Animais Silvestre), *Animais silvestre: vida à venda*. Brasília/DF, 220 p., 2002.
- Rhymer, J.M.; Williams, M.J.; Braun, M.J. *Mitochondrial analysis of gene flow between New Zealand mallards (Anas platyrhynchos) and grey ducks (A. superciliosa)*. The Auk, **111**(4), p. 970-978, 1994.
- Rhymer, J.M.; Simberloff, D. *Extinction by hybridization and introgression*. Annual Review of Ecology and Systematics, **27**, p. 83-109, 1996.
- Ribas, C.C.; Miyaki, C.Y. *Molecular systematics in Aratinga parakeets: species limits and historical biogeography in the 'solstitialis' group, and the systematic position of Nandayus nenday*. Molecular Phylogenetics and Evolution, **30**, p. 663-675, 2004.
- Ribeiro, A.M. *Revisão dos psittacideos brasileiros*. Revista do Museu Paulista, **12**(2), p. 1-82, 1920.
- Ricchetti, M.; Tekaia, F.; Dujon, B. *Continued colonization of the human genome by mitochondrial DNA*. PLoS Biology, **2**(9), 1313-1324, 2004.

- Russello, M.A.; Amato, G. *Application of a noninvasive, PCR-based test for sex identification in an endangered parrot, Amazona guildingii*. Zoo Biology, **20**, p. 41-45, 2001.
- Russello, M.A.; Amato, G. *A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation*, Molecular Phylogenetics and Evolution, **30**(2), p. 421-437, 2004.
- Rylands, A.B.; Bampi, M.I.; Chiarello, A.G.; da Fonseca, G.A.B.; Mendes, S.L.; Marcelino, M. *Cebus xanthosternos*, 2003. In: *2004 IUCN red list of threatened animals*. <www.redlist.org>. Acessado no dia 29.11.04.
- Rylands, A.B.; Schneider, H.; Langguth, A.; Mittermeier, R.A.; Groves, C.P.; Rodríguez-Luna, E. *An assessment of the diversity of New World primates*. Neotropical Primates, **8**(2), p. 61-93, 2000.
- Saccone, C.; Pesole, G.; Sbisa, E. *The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure,-function model and evolutionary pattern*. Journal of Molecular Evolution, **24**, p. 83-91, 1991.
- Saccone, C.; DeCarla, G.; Gissi, C.; Pesole, G.; Reynes, A. *Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system*. Gene, **238**, p. 195-210, 1999.
- Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. *Enzimatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, **230**, 1350-1354, 1985.
- Saitou, N.; Nei, M. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology and Evolution, **4**, p. 406-425, 1987.
- Sambrook, J.; Fritish, E.F.; Maniatis, T. (eds.) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. 3v.
- Sanderson, M.J. *Objections to bootstrapping phylogenies: a critique*. Systematic Biology, **44**(3), p. 299-320, 1995.
- Sanger, F. *Sequences, sequences, sequences*. Annual Review of Biochemistry, **57**, p. 1-28, 1988.
- Sato, A.; O'hUigin, C.; Figueroa, F.; Grant, P.R.; Grant, B.R.; Tichy, H.; Klein, J. *Phylogeny of Darwin's finches as revealed by mtDNA sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **96**, p. 5101-5106, 1999.

- Savolainen, P.; Lundeberg, J. *Forensic evidence based on mtDNA from dog and wolf hairs*. Journal of Forensic Sciences, **44**, p. 77-81, 1999.
- Schneider, H. *The current status of the New World monkey phylogeny*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, **72**(2), p. 165-172, 2000.
- Schneider, H.; Canavez, F.C.; Sampaio, I.; Moreira, M.A.M.; Tagliaro, C.H.; Seuánez, H.N. *Can molecular data place each neotropical monkey in its own branch?* Chromosoma, **109**, p. 515-523, 2001.
- Schroeder, H.; Klotzbach, H.; Elias, S.; Augustin, C.; Pueschel, K. *Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses*, Forensic Science International, **132**, p. 76-81, 2003.
- Seuánez, H.N.; Bonvicino, C.R.; Moreira, M.A.M. *The primates of the Neotropics: genomes and chromosomes*. Cytogenetic and Genome Research, **108**, p. 38-46, 2005.
- Seuánez, H.N.; Armada, J.L.; Freitas, L.; da Rocha e Silva, R.; Pissinatti, A.; Coimbra-Filho, A.F. *Intraspecific chromosome variation in Cebus apella (Cebidae, Platyrrhini): the chromosomes of the yellow-breasted capuchin Cebus apella xanthosternos Wied, 1820*. American Journal of Primatology, **10**, p. 237-247, 1986.
- Shapiro, L.H.; Cantenbury, R.A.; Stover, D.M.; Fleischer, R.C. *Reciprocal introgression between Golden-Winged Warblers (Vermifora chrysoptera) and Blue-winged Warblers (V. pinus) in eastern North America*. The Auk, **121**, p. 1019-1030, 2004.
- Sick, H. *Birds in Brazil*. Princeton University Press, Princeton, NJ, EUA, 1993.
- Sick, H. *Ornitologia brasileira, uma introdução*. Nova Fronteira, Rio de Janeiro, 1997.
- Simpson, G.G. *Splendid isolation, the curious history of South American mammals*. Yale University Press, New Haven, EUA, 266 p., 1980.
- Sites, J.A.; Marshall, J.C. *Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology*. Trends in Ecology and Evolution, **18**(9), p. 462-470, 2003.
- Sorenson, M.D.; Quinn, T.W. *Numts: a challenge for avian systematics and population biology*. The Auk, **115**(1), 214-221, 1998.
- Sorenson, M.D.; Ast, J.C.; Dimcheff, D.E.; Yuri, T.; Mindell, D.P. *Primers for PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates*. Molecular Phylogenetics and Evolution, **12**(2), p. 105-114, 1999.

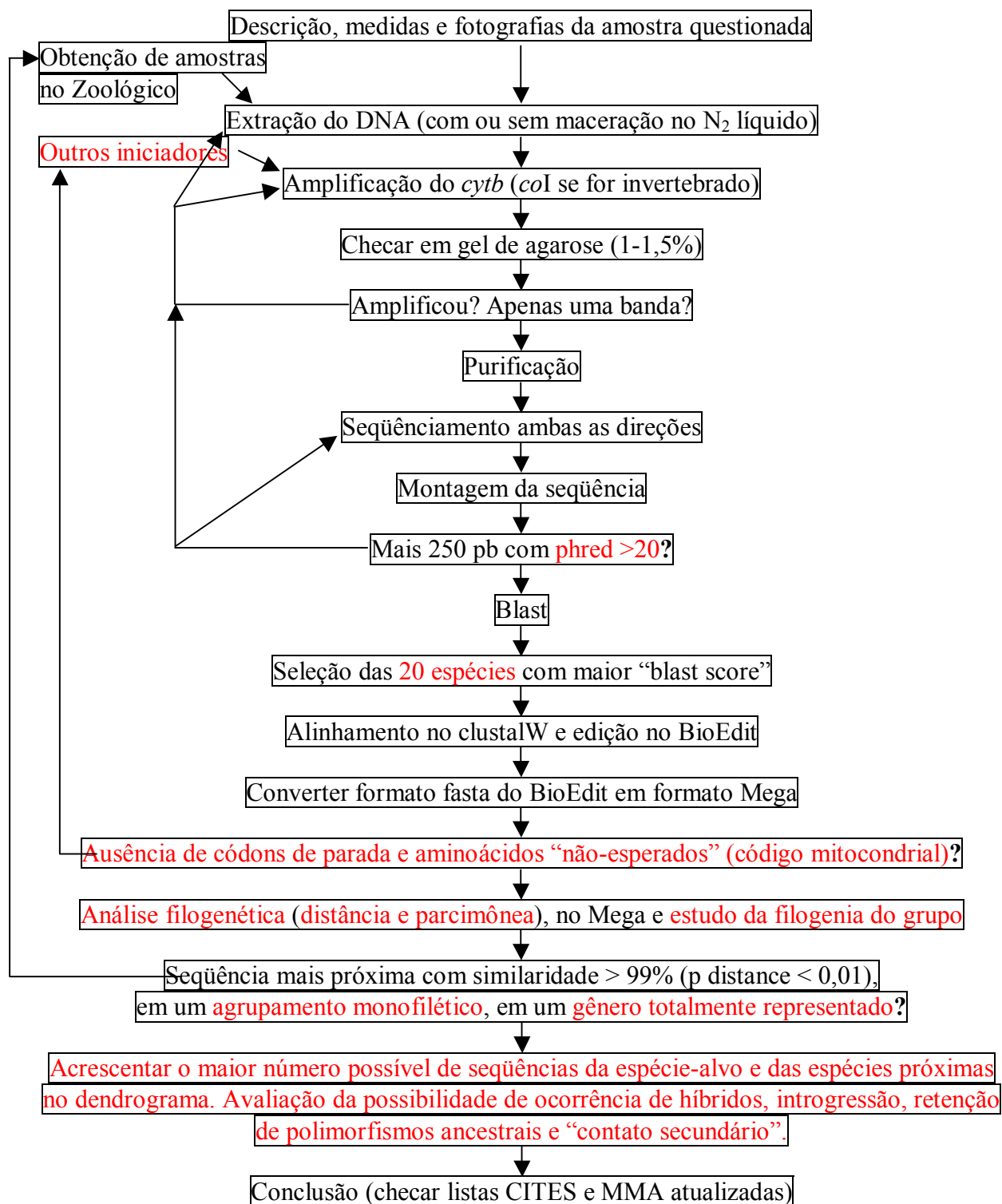
- Sowls, L.K. *Javelinas and other peccaries*. Texas A&M University Press, EUA, 1997.
- Sperling, F.A.H.; Anderson, G.S.; Hickey, D.A. *A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation*. Journal of Forensic Sciences, **39**(2), p. 418-427, 1994.
- Spotorno, A.E.; Valladares, J.P.; Marín, J.C.; Zeballos, H. *Diversidad molecular entre cuyes domésticos (Cavia porcellus) y su relación filogenética cercana con la especie silvestre andina Cavia tschudii*. Revista Chilena de Historia Natural, **77**, p. 243-250, 2004.
- Takahata, N.; Slatkin, M. *Mitochondrial gene flow*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **81**, p. 1764-1767, 1984.
- Tavares, E.S.; Yamashita, C.; Miyaki, C.Y. *Phylogenetic relationships among some neotropical parrot genera (Psittacidae) based on mitochondrial sequences*. The Auk, **121**(1), p. 230-242, 2004.
- Taylor, V.J.; Dunstone, N. *The exploitation of mammal populations*. Chapman & Hall, Londres, Reino Unido, 415 p., 1996.
- Terol, J.; Mascarell, R.; Fernandez-Pedrosa, V.; Perez-Alonso, M. *Statistical validation of the identification of tuna species: bootstrap analysis of mitochondrial DNA sequences*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**(5), p. 963-969, 2002.
- Thalmann, O.; Hebler, J.; Poinar, H.N.; Pääbo, S.; Vigilant, L. *Unreliable mtDNA data due to nuclear insertions: a cautionary tale from analysis of humans and other great apes*, Molecular Ecology, **13**, p. 321-335, 2004.
- Theimer, T.C.; Keim, P. *Geographic patterns of mtDNA variation in Arizona collared peccaries*. Journal of Mammalogy, **75**(1), p. 121-128, 1994.
- Theimer, T.C.; Keim, P. *Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences*. Journal of Mammalogy, **79**(2), p. 566-572, 1998.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Research, **22**, p. 4673-4680, 1994.
- Thomsen, J.B.; Mulliken, T.A. *Trade in neotropical psittacines and its conservation implications*. In: Beissenger, S.R.; Snyder, N.F.R. (ed.). *New World parrots in crisis: solutions from conservation biology*. Smithsonian Institution, EUA, 288p., 1992.

- Tosi, A.J.; Morales, J.C.; Melnick, D.J. *Paternal, maternal, and biparental molecular markers provide unique windows onto the evolutionary history of macaque monkeys*. *Evolution*, **57**(6), p. 1419-1435, 2003.
- UNEP (United Nations Environment Programme). *Global biodiversity assessment*. Cambridge University Press, Reino Unido, 1140 p., 1995.
- Verma, S.K.; Singh, L. *Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application*, *Molecular Ecology Notes*, **3**, p. 28-31, 2003.
- Wan, Q.H.; Fang, S.G. *Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species*, *Forensic Science International*, **131**, p. 75-78, 2003.
- Wang, H.C.; Lee, S.H.; Chang, T.J.; Wong, M.L. *Examinations of meat components in commercial dog and cat feed by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLPs) technique*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, **66**(7), p. 855-859, 2004.
- Wells, J.D.; Pape, T.; Sperling, F.A.H. *DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera)*. *Journal of Forensic Sciences*, **46**(5), p. 1098-1102, 2001.
- Wetton, J.H.; Tsang, C.S.; Roney, C.A.; Spriggs, A.C. *An extremely sensitive ARMs PCR test for the presence of tiger bone DNA*. *Forensic Science International*, **140**(1), p. 139-145, 2004. [correção do artigo publicado em 2002].
- Werle, E.; Schneider, C.; Renner, M.; Völker, M.; Fiehn, W. *Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing*. *Nucleic Acids Research*, **22**(20), p. 4354-4355, 1994.
- Whalther, D.; Bartha, G.; Morris, M. *Basecalling with LifeTrace*. *Genome Research*, **11**(5), p. 875-888, 2001.
- Wheeler, D.L.; Chappey, C.; Lash, A.E.; Leipe, D.D.; Madden, T.L.; Schuler, G.D.; Tatusova, T.A.; Rapp, B.A. *Databases resources of the National Center for Biotechnology Information*. *Nucleic Acids Research*, **28**(1), p. 10-14, 2000.
- Wilson, D.E.; Reeder, D.M. *Mammal species of the world*. Smithsonian Institution Press, 1206 p., 1993. Disponível em “<http://nrmhgoph.si.edu/msw/>”.

- Wilson, E. *O Futuro da Vida: um estudo da biosfera para a proteção de todas as espécies, inclusive a humana*. Editora Campus, Rio de Janeiro/RJ, 242 p., 2002.
- Wilson, M.R.; Polansky, D.; Butler, J.; Dizinno, J.A.; Repogle, J.; Budowle, B. *Extraction, PCR amplification and sequencing of mtDNA from human hair*, *Biotechniques*, **18**, p. 662-669, 1995.
- Woese, C.R. *Interpreting the universal phylogenetic tree*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, p. 8392-8396, 2000.
- Woese, C.R.; Fox, G.E. *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **74**, p. 5088-5090, 1977.
- Woischnik, M.; Moraes, C.T. *Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome*. *Genome Research*, **12**, p. 885-893, 2002.
- Yamashita, C.; Barros, Y.M. *The blue-throated macaw Ara glaucogularis: characterization of its distinctive habitats in savannahs of the Beni, Bolivia*. *Ararajuba*, **5**(2), p. 141-150, 1997.
- Yao, Y.G.; Bravi, C.M.; Bandelt, H.J. *A call for mtDNA data quality control in forensic science*. *Forensic Science International*, **141**(1), p. 1-6, 2004.
- Zardoya, R.; Meyer, A. *Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates*. *Molecular Biology and Evolution*, **13**(7), p. 933-942, 1996.
- Zehner, R.; Amendt, J.; Schütt, S.; Sauer, J.; Krettek, R.; Povolny, D. *Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae)*, *International Journal of Legal Medicine*, **118**(4), p. 245-247, 2004.
- Zhang, D-X.; Hewitt, G.M. *Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers*. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**, 247-251, 1996.

AnexoI: Fluxograma para identificação de espécies usando genes mitocondriais

Siga o fluxograma de cima para baixo.
Quando a resposta for **não**, siga a seta para esquerda.
Em **vermelho**, passos sugeridos por Jacques, G.S. (2005)



Anexo II: Sequências obtidas.

Aves, família Psittacidae

Amazona xanthops (papagaio-galego) AY669861

CTTTGGGTCCCTCCTAGGAATCTGCCTAACAAACACAAATCCTAACAGGCCTACTCCTAGCCGCCATTACACTGC
AGACACCTCCTAGCCTTCTCATCCGTAGCCAACATATGCCGAAACGTACAATACGGCTGACTAATCCGCAACCT
CCATGCAAATGGAGCCTCACTCTTCTTTATCTGCATTTACCTACATATCGCCCGGGGCTTCTACTACGGCTCATA
CCTATATAAAGAAACCTGAAACACAGGAATTATCCTCCTCCTCACCTTATAGCAACAGCCTTTGTAGGCTACGT
CCTACCA

Ara chloroptera (arara-vermelha) AY669858

CTTCGGGTCCCTCCTTAGGAATCTGCTTAACAACACAAATCCTAACAGGCCTACTCCTAGCTGCCATTACACTGC
AGACACCTCCTGCGCTTCTCTTCTGTGGCTAATATGTGTGAAACGTACAATATGGTTGACTAATTCGAAACCT
CCATGCAAACGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTACCTTCATATCGCCCGAGGCTTTTATTACGGCTCATA
CCTATACAAAAGAAACCTGAAACACAGGTATCATCCTTCTACTTACCCTCATAGCCACAGCCTTTGTGGCTATGT
CTTACCA

Ara glaucogularis (arara-do-pescoço-vermelho) AY669859

TCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGATCCCTCCTAGGAATCTGCCTAACAAACACAAATCCTAACTGGCCTA
CTCCTAGCTGCCATTACACTGCAGACACCTCCCTAGCCTTTTCTTCCGTGGCTAACTTATGTGCGAAACGTACAA
TATGGCTGACTAATTCGAAACCTCCATGCAAATGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTATCTCCACATTGCT
CGAGGATTTTACTACGGCTCATACTTATATAAAGAAACCTGAAACACAGGTATCATCCTCCTGCTTACCCTCATA
GCCACTGCCTTTGTGCGTTATGTTTTACCA

Ara macao (arara-vermelha) AY669860

TCCAACATCTCCGCATGATGAAACTTCGGATCCCTCCTAGGAATCTGCCTAACAAACACAAATCCTAACCGGTCTG
CTCCTAGCTGCCATTACACTGCAGACACCTCTTTGGCCTTCTCTTCTGTGGCCAATATGTGTGCGAAACGTACAA
TATGGTTGACTAATTCGAAACCTCCATGCAAATGGAGCCTCATTCTTCTTCATCTGTATCTACCTTCATATCGCC
CGAGGCTTTTATTATGGCTCTTACCTATACAAAAGAAACCTGAAACACAGGTATCATCCTCCTACTTACCCTCATG
GCCACAGCCTTTGTGGTTATGTCCTACCA

Pionus maximiliani (maritaca-verde) AY669862

CTTACAGGCCTACTCCTAGCCGCCACTACACCGCAGACACCTCTCTAGCCTTCTCATCCGTGGCCAACATATGC
CGAAACGTACAATACGGCTGACTAATCCGCAACCTTCACGCAAACGGAGCCTCACTCTTCTTCATCTGTATCTAC
CTACACATCGCCCGAGGCTTCTACTACGGCTCATATCTATACAAAAGAAACCTGAAACACAGGAGTCATCCTCCTC
CTCACCTTATAGCAACAG

Mamíferos (Mammalia)

Blastocerus dichotomus (cervo-do-pantanal) AY886748

ATGACTAATATCCGAAAACTCACCCACTAATAAAAAATTGTAAACAACGCATTCATTGACCTCCCAACTCCATCA
AACATTTTCATCATGATGAAACTTTGGTTCTCTACTAGGAATTTGCTTAGTTTTACAAATCCTCACTGGCCTATTC
TTAGCAATACACTACTCATCCGACACAACAACAGCATTTTTCCTCTGTACCCCATATCTGCCGAGATGTCAATTAT
GGTTGAATTATTTCGATATATGCATGCTAACGGAGCATCAATATTTTTCATTTGCCATTTTATACATGTGGGACGA
GGCTATACTATGGATCATAT

Porção terminal do *cytb* (3') (Verma & Singh, 2003) AY886749

TTCCATACATTGGCACAAACTTAGTTGAATGAATTTGAGGGGGCTTTTCTGTAGATAAAGCAACTCTAACCCGAT
TCTTCGCTTTTCACTTTATTTCTCCCATTCATTATTTATAGCACTTGCATAAATCCACTTACTTTTCTCCATGAAA
CAGGATCTAATAACCCAACAGGAATCCCATCAGACACAGACAAAAATTCATTCCACCCCTTACTACACCATTAAG
ACATTCTAGGGGCTCTGATTTTAATTTCTTTTCTTAATACTATTAGTACTATTTTACACCAGATCTACTCGGAGACC
CAGACAACCTATACCCCAGCAAACCCACTTAATACCCCTCCTCATATTTAAA

Cebus xanthosternos (macaco-prego-de-peito-amarelo) AY886750

ACCTCTTCCCGCAAAACATACCCACTAATAAAAAATTATTAATAGCTCATTATTTGACCTCCCTACACCATCCAAC
ATCTCCTCCTGATGAAACTTCGGATCACTTCTAGGCGCCTGCCTAATAATTCAAATCACCACAGGCCTATTCTTA
GCAATACACTACACGCCAGACACCTCAACCGCCTTCTCTTTCAGTAGCACATATCACCCGAGATATCAACTACGGC
TGAATAATCCGCCTCCTACACGCCAATGGTGCCTCCCTATTTTTTTGTATGCTTATTTCCACATCGGCCGAGGC
CTCTACTACGGATCTTTTCTCTCTCTAAAGACCTGAAATATCGGCACAATCCTACTGCTAACAACAATAGCCACA
GCCTTTATAGGTTACGTATTGCCA

Herpailurus yaguaroundi (jaguarundi) AY886751

TTTTGGTTCCCTGTTAGGAGTCTGCCTAATCCTACAAATCCTAACCGGCCTTTTCCCTAGCTATACTACACATC
AGACACAACAACCTGCCTTTTTCATCAGTCACCCACATCTGCCGCGACGTTAACTATGGCTGAATTATCCGATACAT
ACATGCTAACGGGGCTCCATATTTCTTTATCTGCTTGTACATACACGTAGGACGAGGAATATATTACGGCTCCTA
CACCTTCTCAGAAACATGGAATATTGGAATTATACTACTATTTACGGTCATAGCCACAGCCTTTATAGGATATGT
CCTGCCA

Leopardus tigrinus (gato-do-mato-pequeno) AY886752

GCTCCTTGCTAGGAGTCTGCCTAGTCCTACAAATCCTTACCGGCCTTTTCCCTAGCCATACACTACACATCAGACA
CAACAACCTGCCTTCTCATCAGTCACCTCACATCTGCCGCGACGTCAACTATGGCTGAATTATCCGATACATACATG
CTAACGGAGCTTCCATATTTCTTTATTTGCTTATACATACACGTAGGACGAGGAATATACTACGGCTCCTACACTT
TCTCAGAAACATGAAACATCGGAATTATACTATTATTTACAGTCATAGCCACAGCCTTTCATAGGATACGTCTAC

Mazama gouazoupira (veado-catingueiro) AY886753

CTTTGGTTCTCTATTAGGAATTTGCTTGATCCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCCCTAGCAATACACTATAACATC
CGACACAATAACAGCATTTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTCAATTATGGCTGAATTATCCGATATAT
ACATGCAAAACGGAGCATCAATATTTTTCATTTGCCATTTTATACATGTGGGACGAGGCCTATACTATGGATCATA
CACTTTCTTAGAAACATGAAACATCGGAGTAATTTCTCCTATTTCACAGTGATA

Porção terminal do *cytb* (3') (Verma & Singh, 2003) AY886754:

TCGAATGAATCTGAGGAGGCTTTTCCGTAGACAAAGCAACCCTGACCCGATTCTTTGCTTTTCACTTTATTCTCC
 CCTTTATCATCATAGCACTTGCTATAGTCCATTTACTTTTCCCTCCACGAAACAGGATCTAATAACCCAACAGGAA
 TCCCATCAGACGCAGATAAAAATTCATTTACCCCTACTACACCATTAAAGACATTTTAGGCGCCCTACTCTTAT
 TTCTATTCCTAATACTATTAGTACTATTACACCAGACCTCCTCGGAGATCCAGACAACCTACACCCCAGCAAACC
 CACTCAATACTCCTCCTCATATTAACCTGAATGATATTTTTTATTTGCATACGCAATTTTA

***Myrmecophaga tridactyla* (tamanduá-bandeira)**

Haplótipo 1 AY886755:

CCTTTGGCTCCCTACTAGGAATTTGCTTAATCATCCAAATCCTAACAGGCCTTTTCCCTAGCAATACATTATACATC
 AGACACAATCACAGCATTCTCATCAGTTACCCACATTTGCCGGGACGTAAACTATGGTTGACTCATCCGTTACAT
 CCACGCCAACGGGGCCTCAATATTCTTCATATGTCTTTACTTACATGTAGGCCGTGGCTTGTATTACGGCTCCTA
 CCTATACATAGAAACTTGAAACATTGGAGTCGTCTCCTACTAGTAACTATAGCAACCGCATTTCATAGGCTATGT
 CCTCCCA

Haplótipo 2 AY886756:

CCTTTGGCTCCCTACTAGGAATTTGCTTAATCATCCAAATCCTAACAGGCCTTTTCCCTAGCAATACATTATACATC
 AGACACAATCACAGCATTCTCATCAGTTACCCACATTTGCCGGGACGTAAACTATGGTTGACTCATCCGTTACAT
 CCACGCCAACGGGGCCTCAATATTCTTCATATGTCTTTACTTACATGTAGGCCGTGGCTTATATTACGGCTCCTA
 CCTATACATAGAAACTTGAAACATTGGGGTCGTCTCCTACTAGTAACTATAGCAACCGCATTTCATAGGCTATGT
 CCTCCCA

Haplótipo 3 AY886757:

CCTTTGGCTCCCTACTAGGAATTTGCTTAATCATCCAAATCCTAACAGGCCTTTTCCCTAGCAATACATTATACATC
 AGACACAATCACAGCATTCTCATCAGTTACCCACATTTGCCGGGACGTAAACTATGGTTGACTCATCCGTTACAT
 CCACGCCAACGGGGCCTCAATATTCTTCATATGTCTTTACTTACATGTAGGCCGTGGCTTGTATTACGGCTCCTA
 CCTATACATAGAAACTTGAAACATTGGAGTCGTCTCCTACTAGTAACTATAGCAACCGCATTTCATAGGCTATGT
 CCTCCCA

Haplótipo 4 AY886758:

CCTTTGGCTCCCTACTAGGAATTTGCTTAATCATCCAAATCCTAACAGGCCTTTTCCCTAGCAATACATTATACATC
 AGACACAATCACAGCATTCTCATCAGTTACCCACATTTGCCGGGACGTAAACTATGGTTGACTCATCCGTTACAT
 CCACGCCAACGGGGCCTCAATATTCTTCATATGTCTTTACTTACATGTAGGCCGTGGCTTATATTACGGCTCCTA
 CCTATACATAGAAACTTGAAACATTGGAGTCGTCTCCTACTAGTAACTATAGCAACCGCATTTCATAGGCTATGT
 CCTCCCA

***Pecari tajacu* (cateto) AY886759**

CCCCATCAAACATTTTCATCATGATGAAACTTCGGATCTCTCCTGGCAGTCTGCCTACTACTACAAATTC AACAG
 GCCTATTCCCTAGCCATACACTACACACCAGATAACAACCACCGCCTTTTCATCAGTAACCCACATCTGCCGAGACG
 TAAACTACGGATGAATTATCCGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATATTCTTCATCTGCCTCTTTATCCACG
 TAGGCCGAGGACTATACTATGGGTCTACCTATTTCTAGAAACATGAAACATCGGAGTTATTCTCCTACTAACAG
 TAATAGCAACCGCCTTTATAGGATATGTCTACCA

Anexo III – Artigo: *Identification of avian eggs using cytochrome b gene sequences.*

Species Identification of Avian Eggs Using Cytochrome b Gene Sequence

Jacques, G. S.^{1,2}; Grattapaglia, D.^{2,3}

¹Instituto Nacional de Criminalística/DPF

²Universidade Católica de Brasília

³EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

Illegal trade of birds is a serious problem in Brazil that threatens the most uncommon and endangered species. Animal dealers usually take eggs from their natural habitat to developed countries, where they are used as pets. In this study we show the application of cytochrome b gene sequencing as a mean of identifying the bird species. DNA sequences from 58 eggs were compared to public databases using BLAST. New sequences, from phylogenetic related species of the closest BLAST hits absent in GenBank, were also obtained. Further phylogenetic investigation was performed using MEGA2 program. We identified 4 different species, being 2 short-tailed parrots, 1 macaw and 1 owl.

INTRODUCTION

Illegal trade of animals is a global concern, mainly in developing countries, such as Brazil, where its huge biodiversity attracts wild animal dealers.

The illegal trade of animals is usually focused on a few sort of rare species, prompting their extinction. The wild tropical species are often taken to developed countries, where they are used by the skin and pharmacological industries or simply as pets.

The improvement of Brazilian legislation to prevent those kinds of crimes in the last decades is remarkable. The Justice, however, requires the species identification, mainly to find out its origin (native or exotic) and conservation status (threatened or not).

Although the animal species can be often promptly assigned using a traditional taxonomic approach, sometimes the remnants are only blood, hair, feathers, teeth or other biological samples that requires further investigation.

The molecular approach, using the mitochondrial cytochrome b gene sequence (PARSON *et al.*, 2000) is the current method of choice, since its large applicability, forensic validation (BRANICKI *et al.*, 2003) and the huge availability of this gene sequences from many different animal species in public databases.

Here we describe the species identification using cytochrome b gene of 58 eggs confiscated by Brazilian Federal Police in the northeastern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Questioned Biological Samples:

We received fifty eight white and frozen eggs for identification. The eggs were confiscated in the state of *Pernambuco* and frozen after the confirmation that the embryos were not alive, probably by inadequate incubation conditions. The eggs were opened and the embryos were stored in ethanol at - 20° C until extraction. There was no apparent embryo in one of the eggs, so we collected the yolk, which was stored in the same way.

Reference Samples:

Reference samples were collected from *Amazona xanthops*, *Ara chloroptera*, *Ara glaucogularis*, *Ara macao* and *Pionus maximiliani*. The samples were 2 or 3 blood drops stored on FTA paper, except for *A. glaucogularis*, that were stored in ethanol and *A. macao*, that were two feathers. The samples were collected in the local zoo (Zoológico de *Brasília*), except for *A. glaucogularis*, that was collected in *Rio de Janeiro Zoo*.

DNA Extraction:

DNA was extracted from the samples using a salt-chloroform technique described by Müllenbach *et al.* (1989) and stored in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Total DNA was visualized in ethidium bromide stained agarose gels and aliquots were diluted in ultra pure water.

Amplification and purification:

A 358 bp fragment of the cytochrome b gene was amplified using the primers and PCR conditions described by Branicki *et al.* (2003). The amplification products were visualized in ethidium bromide stained agarose gels. Purification of the amplified fragment prior to sequencing was achieved using the EXO-SAP method (Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase digestion at 37° C).

Sequencing:

Chain termination sequencing using fluorescently labeled dideoxynucleotides was performed using Big Dye v. 3.1 kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer instructions. Sequences were read in an ABI 377 sequencing (Applied Biosystems).

Sequence Analysis:

Sequence quality was verified using phred (EWING *et al.*, 1998). Sequences with quality values lower than 20 were not considered. Similarity searches were performed using BLAST (www.ncbi.nih.gov/BLAST). Alignments were made using ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) and checked by eye in BioEdit (HALL, 1999). Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 2.1 (KUMAR *et al.*, 2001). Sequences obtained are available in the

GenBank (accession numbers AY669858 to AY669862).

RESULTS

We amplified a 358 bp fragment of cytochrome b gene (*cytb*) from avian embryos, yolk, blood (conserved both in ethanol and on FTA paper) and feathers using the same extraction procedure and PCR conditions. BLAST searches appointed that most of the sequences obtained were similar to *cytb* from parrots (PSITTACIDAE, AVES). Alignment of the obtained sequences with the PSITTACIDAE ones available in *GenBank* and molecular phylogenetic analysis showed four different patterns of sequences, three of them within this taxon.

Group 1, comprising 50 sequences, was intermediate between *Pionus* and *Amazona* genus.

Group 2, comprising 4 sequences, was similar to *Amazona aestiva* and *Amazona ochrocephala xantholaema*.

Group 3, comprising 3 sequences, obtained from the three larger eggs, was similar to *Ara ararauna*.

Group 4, consisted of one egg from a non-psittacidae; similar to owl sequences.

After these results, we decided to sequence the *cytb* from the *Ara ararauna* macaw related species (*A. glaucogularis*, *A. chloroptera* and *A. macao*), in order to verify the *cytb* variability within this genus and to confirm the assignment of the eggs in the Group 3. We also sequenced the *cytb* from *Pionus maximiliani* and *Amazona xanthops*, in order to identify the group 1 sequences. These analyses confirmed that Group 3 sequences were from *Ara ararauna* (Figure 2) and showed that the Group 1 sequences were from *Amazona xanthops* (Figure 1). The phylogenetic analysis showed that the Group 4 sequence was from *Otus choliba* owl (Figure 3).

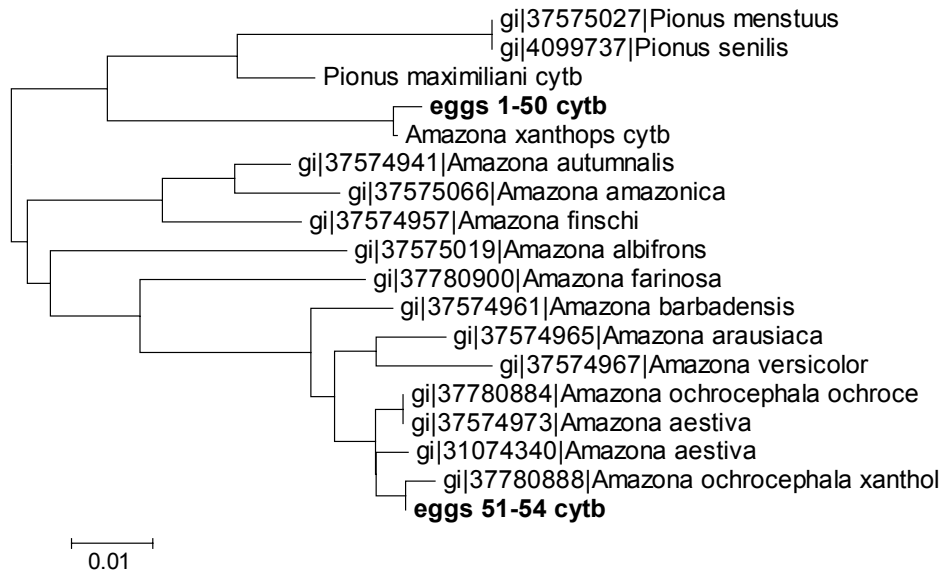


Figure 1: Neighbor-Joining tree, using p-distances of cytochrome b nucleotide sequences, of 54 eggs and its closely related short-tailed parrots species. Numbers after “gi” are the GenBank accession codes. Sequences in bold were obtained from the eggs. Sequences without accession numbers were obtained during this investigation.

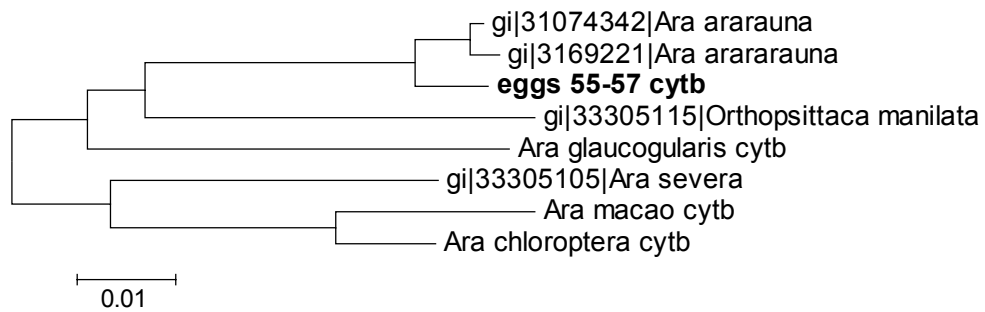


Figure 2: Neighbor-Joining tree, using p-distances of cytochrome b nucleotide sequences, of the 3 larger eggs and its closely related macaw species. Numbers after “gi” are the GenBank accession codes. Sequence in bold was obtained from the eggs. Sequences without accession numbers were obtained during this investigation.

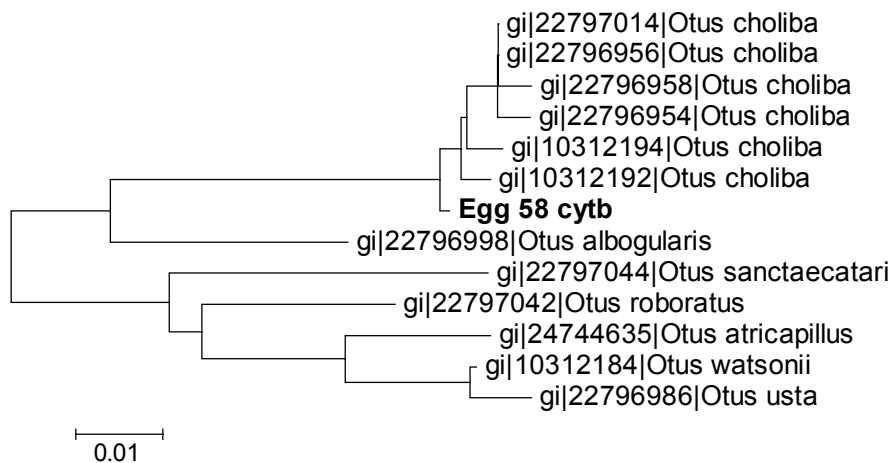


Figure 3: Neighbor-Joining tree, using p-distances of cytochrome b nucleotide sequences, of the owl egg and its closely related species. Numbers after “gi” are the GenBank accession codes. Sequence in bold was obtained from the egg number 58.

	Most similar species	Accession #	Similarity	Second most similar species	Accession #	Similarity
Eggs 1 to 50	<i>Amazona xanthops</i>	AY669861*	99,1%	<i>Amazona amazonica</i>	37575066	93,6%
Eggs 51 to 54	<i>Amazona ochrocephala</i>	37780888	99,6%	<i>Amazona aestiva</i>	31074340	99,2%
Eggs 55 to 57	<i>Ara ararauna</i>	31074342	98,8%	<i>Orthopsittaca manilata</i>	33305115	92,7%
Egg 58	<i>Otus choliba</i>	10312194	99,2%	<i>Otus albogularis</i>	22796998	93,2%

Box 1: Most similar cytochrome b sequences to the ones obtained from the eggs. (*) Sequence obtained in this work.

DISCUSSION

The obtaining of *cytb* from yolk using a regular DNA extraction method confirmed the sensibility of the method, which had been already shown using other kinds of tissues (BRANICKI *et al.*, 2003).

The absence of *cytb* sequences from *Amazona xanthops*, *Ara macao*, *Ara chloroptera* and *Ara glaucogularis* in GenBank by the time of the work turned it more complicated and time-consuming.

The failure to clearly discriminate the Group 2 sequences from *Amazona aestiva* and *Amazona ochrocephala xantholaema* sequences showed the importance of further investigation on those yellow-headed parrots, despite the work done by Russelo & Amato (2003). The yellow-headed parrots also showed how recently diverged species (and subspecies) can difficult the species identification by means of *cytb* without extensive study of the species.

The suggestion that *Amazona xanthops* should be replaced in the *Salvatoria* monotypic genus (DUARTE & CAPARROZ, 1995) is corroborated by the phylogenetic position of these species related to other *Amazona* parrots.

Our phylogenetic analysis suggests that *Orthopsittaca manilata* is a true macaw, between *Ara ararauna* and the red macaws and should be referred as *Ara manilata*, despite Sick (1993) argumentation.

The *cytb* sequence proved to be a useful tool for species identification but it also showed that its usefulness is dependent on the basic molecular phylogenetic knowledge.

REFERENCES

- Branicki, W.; Kupiec, T.; Pawlowski, R. *Validation of Cytochrome b sequence analysis as a method of species identification*, Journal of Forensic Sciences, **48**(1), 83-87, 2003.
- Duarte, J. M. B.; Caparroz, R. *Cytotaxonomic analysis of Brazilian species of the genus Amazona (Psittacidae, Aves) and the confirmation of the genus Salvatoria (Ribeiro, 1920)*, Revista Brasileira de Genética, **18**, 623-628, 1995.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C.; Green, P. *Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment*. Genome Research, **8**(3), pp. 175-185, 1998.
- Hall, T.A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids Symp. Ser. **41**:95-98, 1999.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. B.; Nei, M. *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, Bioinformatics, **17**(12):1244-1245, 2001.
- Müllenbach, R.; Lagoda, P. J. I.; Welter, C. *An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues*, Trends in Genetics, **5**: 391, 1989.
- Parson, W.; Pegoraro, K.; Niederstätter, H.; Föger, M.; Steinlechner, M. *Species identification by means of cytochrome b gene*, International Journal of Legal Medicine, **114**:23-28, 2000.
- Russelo, M. A.; Amato, G. *A molecular phylogeny of Amazona: implications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation*, Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003.
- Sick, H. *Birds in Brazil*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, 1993.