USO DA GENÉTICA FORENSE NA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE MAMÍFEROS AMEAÇADOS DE EXTINÇÃO NOS CAMPOS GERAIS PARA AUXÍLIO NO COMBATE A CRIMES AMBIENTAIS

Maria Elvira de Oliveira (Fundação Araucária), Mateus Henrique Santos (Orientador), e-mail: mhsantos@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa
Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética

Ciências Biológicas 2.00.00.00-6 2.02.04.00-0 Genética Molecular 2.02.05.00-7

Palavras-chave: DNA mitocondrial, Conservação animal, Caça Ilegal.

Resumo

O comércio ilegal de animais silvestres é um dos fatores associados com a degradação ambiental sendo o mesmo, conexo com a expansão de atividades antrópicas que acaba por agravar a perda de espécies. Na região dos Campos Gerais, já foram apontadas mais de 10 espécies ameaçadas de extinção. Isso se intensifica, com a prática de caça ilegítima. Com o intuito de controlar essa situação, é utilizada a aplicação da Genética da Conservação. Nesse caso, com a subvenção de técnicas que auxiliam na identificação molecular, foi efetuada a extração de DNA com protocolos distintos, em 20 amostras de indivíduos diversos, com a previamente identificação realizada, foram obtidas diferentes amostras, tanto de material sanguíneo como de material tecidual, sendo os melhores resultados alcançados os de amostras de tecido, material com maior concentração de DNA. Através do sequenciamento da fita de DNA, e comparação com o Banco de Dados NCBI, foi possível identificar um indivíduo apreendido que necessitava ser identificado para auxiliar no combate a caça ilícita. O resultado obtido, mostrou a importância das técnicas no auxílio da problematização com ameaça de extinção das espécies da fauna local.

Introdução

O crescimento demográfico humano teve como efeito direto a degradação da biodiversidade (FRANKHAM et al, 2004). Podemos considerar como efeito desse crescimento a extinção de diversas espécies, só em relação à fauna esta já chega a 1600 espécies extintas (FRANKHAM et al, 2004). No estado do Paraná essa ameaça de extinção chega a ser vista em mais de 30 ordens diferentes de animais (TOSSULINO et al, 2006). Mais especificamente na região dos Campos Gerais se tratando só de mamíferos temos relatados mais de 10 diferentes espécies ameaçadas de extinção (TOSSULINO et al, 2006).

Uma das grandes causas da extinção de mamíferos é o fato de serem utilizados como fonte alimentar, comercial e medicinal para as populações de áreas rurais e até urbanas (FERNANDES-FERREIRA et al, 2009). Sendo assim, a super-exploração como a caça gerou um impacto muito maior do que se imaginava ao longo dos anos (ARAUJO, 2007). Visando minimizar os efeitos da perda da biodiversidade, a Genética da Conservação vem se mostrando cada vez mais importante. A Genética da Conservação auxilia por meio de análises com vários marcadores moleculares, como o sequenciamento do DNA para identificar espécies,

como nos casos onde não se sabe de qual espécie é o material que está sendo analisado ou com a construção de banco de dados, para acompanhar o número de espécies ameaçadas e realizar estudos populacionais (FRANKHAM et al, 2004). Uma vez que o Estado do Paraná sofre muito com a degradação, principalmente do bioma Mata Atlântica, é importante que novas abordagens que auxiliem na conservação como a Genética da Conservação se desenvolvam no Estado.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 20 amostras de mamíferos da região dos Campos Gerais, próximas ao município de Ponta Grossa – PR, parcialmente identificadas. Uma das amostras, não identificada foi levada até o laboratório, sob suspeita de ser carne de capivara apreendida ilegalmente.

As extrações de DNA das amostras de tecidos, foram realizadas mediante o protocolo de Murray e Thompson (1980) com modificações. As extrações de DNA das amostras de sangue, inicialmente seriam realizadas com base no protocolo Sambrook e Russel (2001), porém ao decorrer da experimentação feita foram utilizados protocolos distintos: Método de fenol-clorofórmio (Sambrook e cols., 1989). Para as amostras de 30µl de papa de hemácias, foram utilizados 220µl de tampão de lise (Tris-HCl 10mM, pH 8,5 e KCl 50mM), 15µl de proteinase K; a partir de 5ml de sangue periférico, foi obtido DNA de células brancas, pelo método de OLERUP e ZETTERQUIST (1992). A integridade das amostras de DNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, como também os produtos da PCR.

As amostras de DNA extraídas foram diluídas para concentração final de 100 ng/µL para as amplificações e padronizações das reações de PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Cyt B: L14841 (5'AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGAAA3') (IRWIN et al, 1991) e H15915 (5'AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC3') (KOCHER et al, 1989) e para o gene COI: LCO1490 (5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3') e HC02198 (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3') (VRIJENHOEK et al, 1994). As reações de amplificação foram realizadas em tubo tipo eppendorf com: 1X tampão Taq DNA polimerase; 2,5 mM de MgCl2; 0,2 mM de solução dNTP; 1 µM de primers (forward e reverse); 0,75 U de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA molde para um volume final de reação de 20 µL. Após esta etapa, os produtos de PCR estão sendo submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 1% para verificação da qualidade dos produtos amplificados. Em seguida, os produtos que obtiveram sucesso foram purificados por meio do kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification" (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

As sequências nos sentidos "Foward" e "Reverse" produzidas foram alinhadas pelo programa Muscle (EDGAR, 2004) e corrigidas para as amostras que apresentaram resultados positivos. Após essa etapa, as amostras foram submetidas ao programa BLAST (ALTSCHUL et al, 1990) e comparadas ao banco de dados do NCBI para verificação das possíveis espécies correspondentes ao material analisado. As amostras com resultados positivos nas etapas anteriores e, após sequenciamento, foram comparadas e suas sequencias, armazenadas no Laboratório de Genética Evolutiva localizado no setor de Biologia Genética e Molecular da Universidade Estadual de Ponta Grossa, no município de Ponta Grossa, Paraná, servindo de base para auxiliar na resolução de crimes ambientais.

Resultados e Discussão

As amostras obtidas por diversas fontes, como clínicas veterinárias de animais silvestres da região, polícia ambiental e moradores dos arredores da região dos Campos Gerais foram: 4 amostras de sangue identificadas como “veado”, 1 amostra de soro sanguíneo identificada como “Cervo”, 1 amostra de soro sanguíneo identificada como “Lobo”, 2 amostras de sangue identificada como “Gato do Mato”, 2 amostras de sangue identificadas como “Suçuarana”, 7 amostras de sangue identificadas como “Bugio”, 1 amostra de tecido muscular identificada como “Jaguatirica”, 1 amostra de tecido muscular identificada como “Capivara” e 1 amostra de tecido muscular identificada como “Suspeita”.

As bandas de DNA, das amostras de sangue, em grande parte não se apresentaram íntegras, com ausência de bandas ou degradação do DNA. Ao contrário das hemácias de aves e répteis que são nucleadas, o sangue de mamíferos contém suas hemácias anucleadas e, portanto, sem DNA genômico, podendo afetar os resultados sem a utilização de kits específicos. Esse fato por si já dificulta a extração de DNA o que aliado aos métodos inadequados de coleta e armazenamento acabaram por degradar de forma significativa o DNA contido nas amostras de sangue.

Na tentativa de resolver esses problemas, foi aplicado um protocolo de extração de DNA e de Leucócitos (Olerup & Zetterquist, 1992) aplicado em sangue humano, quatorze amostras passaram pelo processo de extração, dessa vez, obtendo sucesso em sua primeira etapa, passaram pela quantificação, e doze delas estavam aptas para fazer PCR, dentre essas apenas, cinco apresentaram resultados e foram encaminhadas para sequenciamento. Essas sequencias foram alinhadas e comparadas com o Banco de Dados do NCBI.

Durante as análises, utilizou-se uma amostra de tecido de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), previamente identificada para comparação e a sequência sem identificação teve sua identificação confirmada tanto pela comparação com a amostra identificada quanto por comparação em bancos de dados como o NCBI. Desta maneira, a amostra suspeita pôde ter sua identificação confirmada como uma amostra de carne de caça ilegal, pertencente à espécie *Hydrochoerus hydrochaeris.* A partir dessa informação, os responsáveis por enviar a amostra serão comunicados do resultado para que as providências legais sejam tomadas.

Conclusões

As amostras de tecido, previamente identificadas como jaguatirica (J17), capivara (CAP) e material não identificado (NAD), são resistentes as diversas formas de armazenamento, mesmo inadequado, sendo o material mais indicado para os procedimentos de identificação molecular. Entretanto, as amostras provenientes de sangue, não apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando que a falta de cuidado ou armazenamento inadequado no momento da coleta foram críticos para as etapas seguintes.

Trabalhos de conscientização e também o fornecimento de material adequado para a conservação do material em campo são estratégias que deveriam ser levadas

em conta para a obtenção de material biológico de qualidade para a realização desses procedimentos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Médico Veterinário Robson Klimionte e a Força Verde do estado do Paraná, por gentilmente nos cederem as amostras, sem as quais esse trabalho não poderia ser realizado. Ao PIBIC e fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudo

Referências

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.

ARAUJO, M.A.R. Unidades de Conservação no Brasil: da República à Gestão de Classe Mundial Belo Horizonte Ed. SEGRAC 2007

EDGAR RC, MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004) Nucleic acids research 32 (5) :1792-7

FERNANDES-FERREIRA H, MENDONÇA SV, CRUZ, RL, BORGES-NOJOSA DM & ALVES RRN. Hunting of Herpetofauna in montane, coastal and dryland areas of Northeastern Brazil. Herpetological Conservation and Biology

FRANKHAM, R. BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A..Fundamentos da Genética da Conservação. Ribeirão Preto, SP: SBG, 2008.

GONÇALVES, BP. Genética da conservação aplicada ao tráfico ilegal de aves Saúde, Ética & Justiça. 2013;18(Ed. Especial):79-83

GUADALUPE, M. et al.. Fauna do Paraná em Extinção Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, 2006. 272p.:

IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. J Mol Evol, v. 32, n. 2, p. 128-144, 1991

KOCHER, Thomas D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

KOCH, et al. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão Biblioteca Setorial 2008.

MACHADO; COSTA. Biolegalidade, imaginário forense e investigação criminal. Rev. Crítica de Ciencias Sociais. 2012.

OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSCP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39: 225-235.

SAMBROOK J, FRITSCH EF and MANIATIS T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol, v. 3, p. 294-299, 1994.