

Identificação de espécie e do seu local de origem para a resolução de crimes contra a fauna brasileira: uma atividade para o ensino de genética forense*

Carolina da Silva Carvalho^{1,2}; Maria Augusta Guimarães Carvalho^{1,2}; Rosane Garcia Collevatti^{1,2}

¹ Laboratório de Genética & Biodiversidade, ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

² Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, ICB, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

Autor para correspondência: Rosane Garcia Collevatti rosanegc68@hotmail.com

*Material didático desenvolvido na disciplina Ecologia Molecular, coordenado pela Profa. Rosane Garcia Collevatti, do curso de graduação em Ecologia e Análise Ambiental do Departamento de Ecologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, como uma atividade do Estágio Docência (bolsistas CAPES) das discentes do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução.

Esta atividade tem como público alvo estudantes de ensino superior e apresenta um exemplo de análise forense que possibilita a mobilização de conhecimentos teóricos das áreas de genética mendeliana, molecular e de populações. Por meio da análise de esquemas de géis de eletroforese, os estudantes terão como objetivo caracterizar amostras de carnes apreendidas e determinar as espécies às quais elas pertencem e a procedência das mesmas.

FUNÇÃO PEDAGÓGICA

A principal função da atividade proposta é mostrar como os princípios básicos de genética podem ser aplicados para responder a questões em Ecologia Molecular. A atividade apresenta um caso de genética forense que requer, para sua resolução, a determinação das espécies à qual pertencem amostras de carnes apreendidas, bem como a origem das mesmas, ou seja, se vieram de populações silvestres ou de criadouros autorizados.

Indivíduos oriundos de uma mesma população devem compartilhar alelos com maior probabilidade que indivíduos oriundos de diferentes populações. Isto se deve ao fato de que, ao longo do tempo, a interrupção de fluxo gênico entre indivíduos de diferentes populações pode levar ao acúmulo de diferenças genéticas. Quanto maior o tempo com ausência de fluxo gênico, maior deve ser o número de diferenças acumuladas.

Esta atividade poderá ser utilizada como atividade de aula prática ou como uma atividade complementar à aula expositiva para alunos de ensino superior, estimulando o raciocínio lógico e promovendo uma efetiva aprendizagem de conceitos básicos.

PROBLEMA PROPOSTO

A caça e o tráfico ilegais de animais silvestres ainda são práticas comuns no Brasil. Estas práticas tem sérias consequências na dinâmica e estrutura de populações em florestas tropicais (STONER et al, 2007), além de serem atividades consideradas imorais por destruírem o meio ambiente e causarem a extinção de diversas espécies.

Uma das dificuldades na elucidação dos crimes contra a fauna silvestre é a existência de

provas conclusivas sobre a espécie objeto da caça ou tráfico, já que, em muitos casos, são apreendidos apenas amostras de carne, ovos, penas, peles ou ossos. Além disto, as apreensões ocorrem geralmente em locais distantes da região de origem do animal, ou ainda o local de caça declarado pelo suspeito geralmente não é o correto, pois o mesmo procura omitir sua fonte. Nesses casos, uma das formas para identificar a espécie e excluir ou atribuir o local de origem do animal é o uso de marcadores moleculares (MANEL et al, 2002).

Um órgão de fiscalização ambiental recebeu uma denúncia de que um açougue comercializava carne de caça ilegal. Foram apreendidos três pedaços de carne que o proprietário do açougue alegava ser de bovino, mas tinha aspecto diferenciado das demais vendidas no estabelecimento. Para verificar se as porções de carne realmente eram bovinas, ou pertenciam a outra(s) espécie(s), as carnes foram apreendidas e amostras (pequenos pedaços) foram enviadas para um laboratório especializado em análises genéticas. Além disso, caso as carnes correspondessem a uma ou mais espécies silvestres, era necessário verificar se os animais eram oriundos de criadouro(s) autorizado(s) pelo órgão de fiscalização ou se eram oriundos de caça ilegal.

No laboratório foi extraído DNA dos fragmentos das diferentes amostras encaminhadas. Foram utilizados dois tipos de **marcadores moleculares**:

1. a sequência de um fragmento do gene citocromo B (cytB), localizado no DNA mitocondrial. Este gene codifica uma enzima que participa da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e sua sequência apresenta regiões variáveis úteis para

Marcador molecular

é um fragmento de DNA, oriundo de um segmento específico do genoma, expresso ou não, utilizado para identificar uma região particular do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996)

estudos de **filogenia** e **filogeografia** de mamíferos. A sequência deste gene permite a caracterização de espécies de mamíferos.

- quatro **lôcus** de **microssatélites** do DNA nuclear. A análise desses microssatélites permite determinar o local de origem da amostra analisada.

INSTRUÇÕES PARA O PROFESSOR

Esta atividade pode ser feita individualmente ou em grupo de, no máximo, três pessoas. Uma das maneiras de se aplicar a atividade está descrita a seguir.

Distribuir para cada grupo:

- o problema proposto;
- o procedimento que cada grupo deverá seguir;
- as sequências do gene *cytB* das três amostras de carne apreendidas (Quadro 1);
- as sequências do gene *cytB* características de boi, porco, paca e capivara (Quadro 2);
- as sequências do gene citocromo B (*cytB*) do DNA mitocondrial para a mesma espécie das três amostras de carne apreendida para diferentes localidades dos biomas brasileiros: Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia e Pantanal (Quadro 3);
- as questões A e B, que deverão ser respondidas pelos estudantes.

Discutir com os estudantes as conclusões obtidas com esta análise. Em seguida, distribuir para cada grupo:

- o mapa 1, com os biomas brasileiros e localidades com criadouros autorizados;
- esquema da análise das amostras dos géis de **eletroforese** das amostras apreendidas para quatro regiões de microssatélites (lôcus 1 a 4), para as amostras de diferentes biomas brasileiros e de criadouro autorizado (CR);
- tabela que deverá ser preenchida pelos estudantes após a análise das sequências dos painéis 3 e 4 e do mapa 1;

- as questões 3 e 4, que deverão ser respondidas pelos estudantes.

Discutir com os estudantes as conclusões desta análise. Aconselha-se que a atividade seja aplicada para estudantes já familiarizados com os conceitos da biologia molecular pois, desta forma, os estudantes poderão mobilizar o conhecimento do conteúdo teórico.

PROCEDIMENTO (PARA OS ESTUDANTES)

- Comparar as sequências do gene citocromo B (*cytB*) do DNA mitocondrial para as três amostras de carnes apreendidas (A, B e C) e para diferentes espécies de mamíferos domesticados ou da fauna silvestre mais utilizados na alimentação humana (boi, porco, paca e capivara) Verificar quais delas são iguais ou muito semelhantes e quais são diferentes.
- Responder às questões A e B.
 - Questão A:** A qual(is) espécie(s) correspondem as amostras de carne?
 - Questão B:** Por que foi utilizado marcador molecular do tipo mitocondrial (sequência do gene do citocromo B) para identificar a espécie que deu origem às amostras de carnes apreendidas? A sequência do gene *cytB* é suficiente para distinguir a localidade de origem das carnes apreendidas?
- Analisar o esquema do gel de poliacrilamida para quatro **lôcus** microssatélites, (1 a 4), para as amostras de diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica – MA; Cerrado – CE; Pantanal – PA; e Amazonas - AM), para o criadouro autorizado (CR) e para as amostras de carnes apreendidas (Carne). Verificar qual a amostra possui mesmo perfil de bandas no gel de poliacrilamida, que reflete o compartilhamento de alelos da carne apreendida.
- Preencher a tabela 1, após a análise do esquema do gel de eletroforese.
- Identificar, no mapa 1, o local de procedência das amostras apreendidas. Determinar qual a localidade de origem da amostra e verificar se corresponde à mes-

Filogenia

é o estudo das relações evolutivas entre os organismos

A filogeografia

estuda os princípios e processos que controlam as distribuições geográficas de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies intimamente relacionadas. (AVISE, 2000)

Lôcus

é uma região específica do DNA onde se localiza um gene ou um marcador molecular.

Microssatélites

são sequências curtas de nucleotídeos repetidas em tandem, que se encontram dispersas no genoma. Por exemplo, (CA)₁₀ é uma sequência dos nucleotídeos citosina (C) e adenina (A), cujo par de bases CA é repetido 10 vezes. As regiões de microssatélites têm taxa de mutação muito altas e são muito polimórficos, por isso são considerados bons marcadores moleculares para discriminar geneticamente indivíduos (FREELAND, 2005).

Eletroforese

é a migração de moléculas ou fragmentos ionizados em um campo elétrico através de uma matriz de separação com microporos, na presença de uma solução tampão. A matriz de separação pode ser constituída por gel de amido, agarose, acetato de celulose ou poliacrilamida dependendo do tamanho das moléculas que serão fracionadas.

ma localidade indicada pelo sequenciamento do DNA mitocondrial.

6. Após determinação do local de origem, indicar no Mapa de Biomas a espécie e a região das quais as carnes apreendidas são provenientes.

7. Responder às questões C e D.

♦ **Questão C:** A que local as amostras de carnes pertenciam? Quais as consequên-

cias do resultado obtido para o dono do açougue?

♦ **Questão D:** Foi possível identificar o local onde as amostras de carne foram retiradas utilizando os dois tipos de marcadores moleculares (microsatélites e sequência do gene citocromo B)? Por quê?

Quadro 1.

Sequências do gene citocromo B (cytB) do DNA mitocondrial para as três amostras de carne apreendidas (A, B e C).

Amostra A

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Amostra B

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Amostra C

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Quadro 2.

Sequências obtidas do gene citocromo B (cytB) do DNA mitocondrial para diferentes espécies de mamíferos domesticados ou da fauna silvestre mais utilizados na alimentação humana: boi (*Bos taurus*), porco (*Sus scrofa*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

Bos taurus

ATGACTAACATTCGAAAGTCCCACCCACTAATAAAAATTGTAAACAA

Sus scrofa

ATGACCAACATCCGAAAATCACACCCACTAATAAAAATTATCAACAA

Cuniculus paca

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Hydrochoerus hydrochaeris

ATGACCCACCTACGAAAATCACACCCACTAATCAAAATCATCAACCA

Quadro 3.

Sequências do gene citocromo B (cytB) do DNA mitocondrial para a mesma espécie das três amostras de carne apreendida para diferentes localidades dos biomas brasileiros: Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia e Pantanal.

Mata Atlântica

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Cerrado

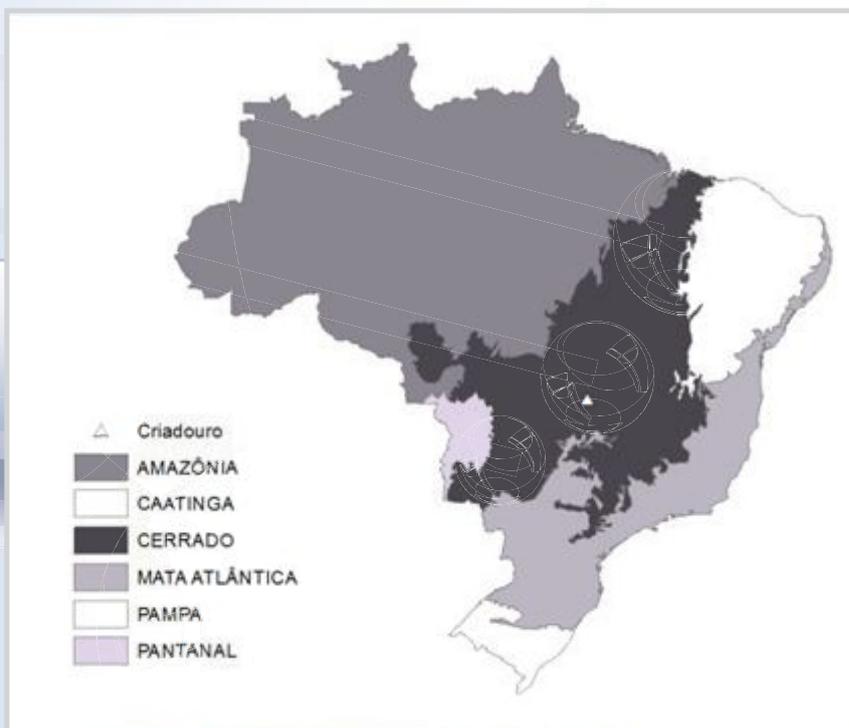
ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Amazônia

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA

Pantanal

ATGACCCACATACGCAAGTCCCACCCGCTAATTAAAATTATAAACCA



Mapa 1.

Biomias brasileiros e localidade do criadouro autorizado cujas amostras foram utilizadas para comparar com as amostras de carnes apreendidas.

		MA	CE	PA	AM	CR	Carne
Lócus 1	a						
	b						
	c						
	d						
Lócus 2	a						
	b						
	c						
	d						
Lócus 3	a						
	b						
	c						
	d						
Lócus 4	a						
	b						
	c						
	d						

Painel 1.

Esquema do gel de poliacrilamida para quatro lócus microssatélites, (lócus 1 a 4), para as amostras de diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica – MA; Cerrado – CE; Pantanal – PA; e Amazonas – AM), para o criadouro autorizado (CR) e para as amostras de carnes apreendidas (Carne).

Genótipos	MA	CE	PA	AM	CR	Carne
Lócus 1						
Lócus 2						
Lócus 3						
Lócus 4						

Tabela 1.

Tabela de genótipos para os quatro lócus microssatélites, (1 a 4), para as amostras de diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica – MA; Cerrado – CE; Pantanal – PA; e Amazonas – AM), para o criadouro autorizado (CR) e para as amostras de carne apreendidas (Carne).

RESPOSTAS DAS QUESTÕES

Questão A: Após a comparação das sequências das amostras A, B e C com as sequências das amostras de boi, porco doméstico, capivara e paca, a sequência de DNA mais similar com as das amostras de carnes apreendidas foi a da paca (*Cuniculus paca*), animal da fauna silvestre brasileira. No entanto, só a identificação da espécie não garante que o animal foi retirado da natureza porque pode ser proveniente de um criadouro autorizado. Portanto, é necessário identificar a origem dessa carne apreendida. Foi utilizado o marcador molecular do tipo mitocondrial porque este marcador tem taxas de mutação não tão altas quando comparada ao marcador microsatélite, por isso é possível fazer a identificação taxonômica. No entanto, essa identificação

taxonômica só é possível se existir um banco de sequência no qual a sequência alvo é comparada com sequências de diferentes grupos taxonômicos, como por exemplo o GenBank (veja no sítio www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Questão B: Quando comparadas, as amostras de carnes apreendidas com as amostras de diferentes biomas e com a de um criadouro autorizado, chegou-se à conclusão de que as amostras apreendidas foram provenientes de uma população do Cerrado, já que o padrão de bandas foi muito similar entre essas duas amostras (veja o resultado do Pannel 5 abaixo). Neste caso, como foi encontrado que as amostras de carnes apreendidas eram de paca silvestre, o dono do açougue pode ser acusado de crime contra a fauna silvestre.

Tabela 1. (preenchida com os genótipos dos quatro locus analisados)

– Tabela de genótipos para os quatro locus microsatélites, locus 1 a 4, para as amostras de diferentes biomas brasileiros (Mata Atlântica – MA; Cerrado – CE; Pantanal – PA; e Amazonas – AM), para o criadouro autorizado (CR) e para as amostras de carnes apreendidas (Carne).

Genótipos	MA	CE	PA	AM	CR	Carne
Locus 1	dd	bb	aa	cc	cc	bb
Locus 2	bb	aa	cc	dd	cc	aa
Locus 3	bb	aa	dd	cc	bb	aa
Locus 4	bc	aa	dd	dd	bc	aa

A constituição genética (alelos) de um indivíduo para um ou mais locus é definida como **genótipo**.

Questões C e D: Não foi possível identificar o local de onde a amostra de carne foi retirada utilizando a sequência do gene do citocromo B. Com os marcadores microsatélites isto foi possível, pois estes marcadores têm uma taxa de mutação mais alta, o que permite a identificação individual, sendo assim, mais apropriados para resolver problemas intraespecíficos. Ao contrário, o marcador baseado na sequência do gene mitocondrial *cytB*, que tem uma taxa de mutação mais baixa, é mais apropriado para responder a problemas interespecíficos como, por exemplo, a identificação da espécie à qual as amostras de carnes apreendidas pertencem.

REFERÊNCIAS

- AVISE J.C., *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Harvard University Press, 447p, 2000.
- FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares e análise genética*. Brasília, Embrapa CENARGEN, 220 p, 1996.
- FREELAND, J. *Molecular Ecology*. Chichester, John Wiley & Sons, 388 p. 2005.
- FUTUYMA, D. *Biologia Evolutiva*, 3o.ed. São Paulo, Funpec. 832 p, 2009.
- GALETTI, M.; GIACOMINI, H.; BUENO, R.; MARQUES, R. M.; BERNARDO, C. S. S.; BOVENDORP, R.; GOBBO S.; DONATTI, C.; STEFFLER, C.E.; MEIRELLES, F.; ANZOLIN, R.B.; NOBRE, R.; CHIARELLO, A.; PERES, C. A. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation*, v 142, p 1229–1241, 2009.
- MANEL, S.; BERTHIER, P.; LUIKART, G. Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with Bayesian assignment tests and multi locus genotypes, *Conservation Biology*, v 16, p 650–659, 2002.
- ROBINSON, J. G.; REDFORD, K. H.; BENNETT, E. L. Wildlife Harvest in Logged Tropical Forests. *Science*, v 284, n 5414, p 595-596, 1999.
- STONER, K. E.; VULINEC, K.; WRIGHT, S. J.; PERES, C. A. Hunting and Plant Community Dynamics in Tropical Forests: A Synthesis and Future Directions. *Biotropica*, v 39, n 3, p 385–392, 2007.
- TOBE, S. S.; LINACRE, A. Identifying endangered species from degraded mixtures at low levels. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v 2, n 1, p 304-305, 2009.