

As Ferramentas Moleculares aplicadas na conservação dos Crocodilianos

Pablo Ariel Siroski^{ab}, Patricia Susana Amavet^{bc}, Gisela Laura Poletta^{bd} e Luis Antonio Bochetti Bassetti^e

^a Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada (LEMA-ICIVET-CONICET - Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P. Kreder 2805, CP S3080HOF Esperanza, Santa Fe, Argentina; pablo.siroski@icivet.unl.edu.ar

^b Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL/MASPyMA) Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria-Paraje El Pozo, CP S3000, Santa Fe, Argentina

^c Laboratorio de Genética, Departamento de Cs. Naturales (FHUC-UNL), CONICET-Paraje El Pozo, CP S3000, Santa Fe, Argentina; pamavet@gmail.com

^d Cátedra de Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, (FBCB-UNL), CONICET - Paraje El Pozo, CP S3000, Santa Fe, Argentina; gisepoletta@hotmail.com

^e Laboratório de Ecologia Isotópica, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo, Av. Centenário, 303, Piracicaba/SP, Brasil; luisbassetti@gmail.com

Resumo

Nos últimos tempos, estudos de genética cresceram rapidamente graças ao avanço da tecnologia e das ferramentas moleculares, e os resultados obtidos nas análises genéticas se tornaram importantes ferramentas para a conservação e manejo, permitindo aprofundamento sobre a estrutura populacional, padrões de dispersão, fluxo gênico e hibridização interespecífica, dentre outros parâmetros. Os crocodilianos são um dos grupos de vertebrados mais fascinantes. Além de suas características intrínsecas (i.e., longevidade), representam um grupo bem-sucedido de organismos que sofreram poucas alterações ao longo de milhões de anos, sendo estes animais importante fonte de informação para quem pesquisa os avanços do ponto de vista molecular. A capacidade de resistir ao ataque de microrganismos poderia ser um dos motivos de seu sucesso e longevidade e, por isso, a descoberta dos componentes moleculares envolvidos permitiria um conhecimento aprofundado desses fatos. Neste aspecto, o entendimento dos processos evolutivos frequentemente requer a análise de marcadores polimórficos. Além disso, o impacto biológico resultante da interação com componentes sensíveis à contaminação em diferentes espécies de jacarés pode se manifestar nos níveis genético, imunológico e bioquímico, exercendo um efeito marcante de longo prazo nas populações. Marcadores moleculares, imunológicos e bioquímicos constituem uma bateria de ferramentas complementares altamente explicativas na avaliação dos efeitos nos crocodilianos causados pelo uso massivo dos pesticidas, permitindo obter mais informações sobre o significado biológico específico e o impacto real das alterações produzidas por defensivos agrícolas, gerando ferramentas preditivas para a proteção ambiental dessas e de outras espécies silvestres de nossa região. Especificamente, em toda a sua área de distribuição, um grande número de espécimes de *C. latirostris* foram caçados ilegalmente, razão pela qual foi necessário estabelecer diferentes estratégias para evitar sua extinção. Em conclusão, os recursos genéticos têm permitido abordar o estudo dos crocodilianos do ponto de vista populacional, ecológico, ecossistêmico e produtivo.

Abstract

Lately, genetics studies advanced quickly using molecular tools and the technology. Besides their intrinsic characteristics like longevity, habitats, and some other interesting aspects, crocodilians are one of the most fascinating groups within vertebrates. They represent a successful group of organisms that have suffered little alteration over millions of years, thus these animals are an important source of information for those researching advances from a molecular point of view. The ability to resist the attack of microorganisms could be one of the reasons for their success and longevity so the discovery of the molecular components involved would allow a thorough understanding of these facts. In addition, the information acquired from genetic analyses is important for conservation and management and allow to depth on population structure, patterns of dispersal and gene flow, interspecific hybridization, among other parameters, as to understand evolutionary processes require the analysis of polymorphic markers. Also, the biological impact resulting from the interaction with contamination-sensitive components in caiman species can be manifested at the genetic, immunological, and biochemical levels, exerting a marked long-term effect on populations. Genetic, immunological and biochemical molecular markers constitute a battery of complementary tools that are highly explanatory in the evaluation of the effects caused by mass use

pesticides on crocodylians and will allow us to obtain more information regarding the specific biological significance and real impact of the alterations produced by pesticides on these species, providing predictive tools for the environmental protection of these and other wild species in our region. Specifically, throughout its range of distribution, a large number of *C. latirostris* specimens were hunted illegally and different strategies to avoid their extinction were necessary. In conclusion, the genetic resources have allowed to approach the study of the crocodiles from a population, ecological, ecosystemic and productive point of view.

Introdução

Nas últimas décadas os estudos genéticos em répteis têm avançado de maneira significativa e em conjunto com o desenvolvimento da tecnologia aplicada aos estudos moleculares. Atualmente, a aplicação dessas técnicas nos estudos dos crocodylianos constituem um campo de grande interesse devido, principalmente, ao enorme potencial que possuem para clarear os conflitos taxonômicos existentes, além de promoverem conhecimentos à conservação das espécies e ao meio em que vivem, basicamente porque este grupo possui características intrínsecas interessantes, tais como longevidade, baixa capacidade de dispersão e uma alta dependência das condições ambientais (POLETTA et al., 2013). Neste sentido, os crocodylianos são um dos grupos de vertebrados mais fascinantes, pois apresentam complexa biologia e comportamento, além de serem considerados excelentes modelos para a exploração de problemas filogenéticos, já que contam com uma baixa diversidade específica atual, abundantes registros fósseis e uma ampla gama de divergências entre as espécies viventes (BROCHU, 2003).

A Ordem Crocodylia está, neste momento, representada por 24 espécies reconhecidas, porém, a sistemática do Grupo se encontra em constante revisão frente aos avanços dos conhecimentos. As relações filogenéticas entre os crocodylianos têm sido estudadas em repetidas ocasiões mediante as comparações morfológicas e de sequências de genes, tanto nucleares quanto mitocondriais. Em muitos dos estudos realizados foi difícil cobrir os sítios representativos de distribuição de todos os membros da Ordem, e isso pode reduzir a habilidade para discernir se os marcadores utilizados foram apropriados e se os resultados obtidos foram consequência ou não da falta de amostras e do intervalo completo de distribuição, para que todas as linhagens se localizem em suas verdadeiras posições filogenéticas.

A genética da conservação tem como propósito estudar a diversidade e estrutura genética das populações, sendo aplicada para resolver problemáticas da

conservação da biodiversidade (FRANKHAM et al., 2002). Utiliza ferramentas de biologia molecular que se articulam com as características ecológicas das populações, de forma a permitir descrever essas populações e as comunidades que elas compõem, conhecer sua história filogeográfica e identificar espécies que contribuem para a resolução de conflitos taxonômicos. Os resultados obtidos são ferramentas fundamentais para o desenvolvimento de planos de restauração de ecossistemas, bem como para a definição de unidades de manejo e conservação. O jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) é considerado um crocodyliano de médio porte, tendo seu tamanho máximo descrito em 3,16 metros (D. Dutra-Araújo, com. Pers. 2018). A distribuição geográfica da espécie inclui as bacias dos rios Paraná, Paraguai e São Francisco, se estendendo pelas regiões nordeste da Argentina, sudeste da Bolívia, Paraguai e norte do Uruguai. Também inclui uma grande quantidade de pequenos canais de drenagem da costa atlântica, desde Natal, no extremo oriente do Brasil até o nordeste do Uruguai. Uma mesma realidade de habitat é compartilhada entre os países, mas de forma geral, a espécie se caracteriza por se adaptar em todo tipo de ambiente, desde os mais caudalosos, como as cachoeiras de Iguaçu, até os poços construídos como reservatórios de água com fins agrícolas ou fonte de água para o gado, até os mangues das ilhas no sudeste do Brasil. Na Argentina, uma grande quantidade de exemplares de *C. latirostris* foram caçados ilegalmente durante vários anos para comercialização de suas peles, o que provocou a redução drástica de suas populações. No ano de 1990 foi estabelecido em Santa Fé o primeiro programa de uso sustentável de jacarés (Proyecto Yacaré), que implementou o sistema de *Ranching*, que implica na colheita de ovos na natureza, incubação artificial e cria de animais em ambiente fechado. Uma parte desses espécimes nascidos no cativeiro se destina ao uso comercial (pele e carne) e outra para liberação de animais em ambientes naturais. Devido ao sucesso deste programa na recuperação das populações naturais de jacarés, outros dois programas similares foram implantados da

Argentina, produzindo benefícios econômicos e sociais a nível regional e nacional. Cabe destacar estes programas envolvem habitantes locais, que buscam ninhos na natureza e coletam ovos para posterior incubação no cativeiro, recebendo compensação financeira, que resulta na proteção de ninhadas e dos animais adultos por parte das comunidades locais. Através dos estudos desenvolvidos ao longo desses anos, na Argentina, foi possível reunir uma quantidade importante de conhecimentos básicos e indispensáveis para o estudo da biologia integral dessas espécies autóctones de importância comercial. Particularmente, os estudos genéticos contribuíram de forma transcendental e foram estritamente necessários para o projeto e aplicação de programas de uso sustentável.

Citogenética

Inicialmente realizaram-se análises citogenéticas comparativas entre as duas espécies de caimans presentes na Argentina, *Caiman latirostris* e *Caiman yacare* (AMAVET et al., 2003) aplicando bandas diferenciais (C e NOR) através das quais foi confirmado que ambas as espécies não possuem diferenciação de cromossomos sexuais e apresentam padrões de bandas muito semelhantes. Os resultados obtidos mostraram uma grande semelhança entre os dois cariótipos, com um número diplóide de 42 cromossomos, incluindo 12 pares telecêntricos e nove pares bibráquiais, dois dos quais são microcromossomos. Devido à falta de diferenças relevantes entre os cariótipos dessas espécies, decidiu-se iniciar a aplicação de marcadores moleculares e bioquímicos para aprofundar as análises genético-populacionais.

Genética de populações

Os crocodilianos estão expostos a múltiplas ameaças, sendo uma das principais a perda da variabilidade genética. Suas populações decresceram drasticamente nos últimos anos, principalmente devido à redução de seu habitat induzida pela modificação dos cursos e corpos de água. Este é um dos fatores mais importantes que contribuiu para a fragmentação das populações reprodutivas e uma diminuição no número de indivíduos. Devido ao interesse em se conhecer a história natural das espécies de crocodilianos, incluindo algumas de interesse econômico, foram realizados estudos para determinar a situação real para cada espécie. Os estudos de genética de população ainda são escassos, porém

essenciais, uma vez que o estudo da dinâmica genética de populações de crocodilianos é um aspecto fundamental para estabelecer políticas de manejo que garantam seu futuro.

A metodologia de eletroforese permite a separação de proteínas enzimáticas (aloenzimas) de acordo com sua carga elétrica líquida, peso molecular e estrutura tridimensional. Devido ao seu baixo custo, facilidade de uso e quantidade de *loci* que podem ser examinados, o polimorfismo de proteínas revelado por eletroforese em gel e técnicas específicas de coloração foi uma das ferramentas mais amplamente utilizadas para investigar os níveis de variabilidade genética populações naturais (LEWONTIN, 1991). Os resultados obtidos em populações de *C. latirostris* de Santa Fé, Argentina, indicaram que todas as amostras analisadas tinham a mesma estrutura isoenzimática e, portanto, o mesmo alelo em homocigotos (AMAVET et al., 2010). Com base nesses resultados, foi necessário o uso de marcadores moleculares no nível genômico para aprofundar essas análises.

A primeira técnica molecular aplicada ao estudo genético de populações de jacarés na Argentina foi a amplificação com marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente). Esta técnica utiliza iniciadores de 10 a 20 pares de bases (pb) de comprimento para amplificar regiões do DNA genômico. Os produtos de PCR são transformados em géis, que normalmente detectam várias bandas que representam diferentes fragmentos (*loci*) amplificados. Se houver variação na região de aparelhamento do primer, algumas bandas revelarão padrões de presença/ausência. Este método analisa muitos *loci* sem exigir o sequenciamento do genoma ou projetar iniciadores específicos para as espécies em estudo. Sua desvantagem é o modo dominante de herança e o considerável cuidado que deve ser respeitado nos protocolos de trabalho para obter resultados repetíveis (HADRYN et al., 1992). Para a análise RAPD, foram utilizados dez indivíduos de diferentes ninhos de cada uma das quatro populações estudadas de *C. latirostris*, perfazendo um total de 40 animais. Todas as amostras foram amplificadas usando oito primers RAPD da Promega®.

Os níveis de variabilidade genética nas populações foram estimados usando o número médio de alelos por *locus* (*A*), a porcentagem de *loci* polimórficos (*P*) e a heterozigose esperada (*He*). O valor de *A* é a soma de todos os alelos detectados em todos os *loci*, dividido pelo

número total de *loci*. *P*, de acordo com CAVALLI-SFORZA e BODMER (1971), é o aparecimento de dois ou mais alelos no *locus* em uma população, cada um com frequência significativa. Na prática, um limite superior para a frequência alélica mais comum é decidido arbitrariamente, e nesses trabalhos foi utilizado o de 0,95. Finalmente, *He* representa a proporção esperada de indivíduos heterozigotos dentro de uma população para uma espécie diplóide; é a medida de variabilidade mais usada porque tem significado biológico (HEDRICK, 1983). Os resultados obtidos na análise de 233 *loci* em 40 indivíduos mostraram que apenas 32% dos marcadores eram variáveis, e as taxas de variabilidade genética mostraram valores baixos a moderados. Também foi observada diferenciação entre as populações analisadas devido à detecção de alguns *loci* considerados exclusivos de uma delas (AMAVET et al., 2007; 2009).

Posteriormente, para aprofundar as análises genéticas populacionais de crocodilianos na Argentina, os *primers* foram projetados para amplificar *loci* microssatélites desenvolvidos a partir de sequenciamento parcial, usando o *Next Generation Sequencing* (NGS) do genoma de *C. latirostris*. Os microssatélites têm a vantagem sobre outros marcadores por serem altamente polimórficos e codominantes, ou seja, detectam genótipos heterozigotos. Por esse motivo, eles se tornaram os marcadores de escolha em estudos genéticos de base populacional. No entanto, existem deficiências que limitam seu uso em espécies onde a informação genômica é escassa. Em particular, sua amplificação requer a identificação das sequências de flanqueamento para obter iniciadores específicos.

Os marcadores projetados por este grupo de trabalho foram isolados usando *software* desenvolvido especificamente em nosso laboratório para isolamento de microssatélites e *design* de *primers* (METZ et al., 2016). A partir dos dados obtidos, foi possível projetar nove pares de *primers* para amplificar amostras de *C. latirostris* que foram aplicadas com sucesso em análises genético-populacionais (OJEDA et al., 2016; AMAVET et al., 2017).

Os parâmetros de variabilidade genética das populações de *C. latirostris* foram comparados entre quatro locais de estudo em três períodos diferentes (2001/03, 2007 e 2011/12) para se avaliar o impacto das atividades do Programa de Uso Sustentável que inclui essa espécie em Santa Fé, denominado “Projeto Jacaré”, que teve seu início em 1990. O tamanho efetivo da

população (*Ne*) também foi estimado para detectar possíveis eventos de gargalo. Para a realização desses estudos, foram analisados dez *loci* microssatélites e um fragmento de 1077 pb do gene do citocromo b mitocondrial (*cyt b*). Os fragmentos amplificados para cada região de microssatélites e o gene *cyt b* foram analisados com um sequenciador ABI 3730xl® (*Applied Biosystems*). As estimativas de variabilidade obtidas com marcadores microssatélites foram superiores às obtidas com marcadores RAPD. Mas esses valores não podem ser comparáveis devido às diferenças nos níveis de polimorfismos que podem ser detectados pelos dois tipos de marcadores. Os valores estimados de variabilidade para as populações analisadas de *C. latirostris* foram de baixos a intermediários e foram semelhantes entre os locais estudados em cada período de amostragem, existindo pouca diferenciação genética entre eles. (Tabela 1).

Sítios	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>A</i>	<i>Rg</i>
EEE -01/03	0.26 (0.32)	0.58 (0.12)	3.4 (1.0)	1.58
CSA -01/03	0.15 (0.19)	0.53 (0.25)	3.7 (2.0)	1.60
EDP -01/03	0.18 (0.20)	0.42 (0.25)	2.9 (2.16)	1.49
AES-01/03	0.23 (0.20)	0.63 (0.14)	4.1 (1.86)	1.63
Global 01/03	0.23 (0.19)	0.61 (0.10)	6.4 (3.16)	3.49
EEE-07	0.41 (0.32)	0.63 (0.19)	4.5 (1.5)	1.64
CSA -07	0.26 (0.27)	0.63 (0.13)	4.6 (1.68)	1.63
EDP- 07	0.32 (0.31)	0.71 (0.11)	4.9 (1.92)	1.71
AES- 07	0.29 (0.20)	0.61 (0.23)	4.9 (1.97)	1.61
Global 07	0.33 (0.23)	0.73 (0.08)	8.8 (2.7)	4.59
EEE-11/12	0.31 (0.23)	0.61 (0.23)	5.1 (2.3)	1.61
CSA -11/12	0.30 (0.29)	0.52 (0.27)	4.0 (2.3)	1.60
EDP-11/12	0.33 (0.35)	0.62 (0.14)	4.0 (1.3)	1.62
AES-11/12	0.40 (0.28)	0.53 (0.23)	3.8 (2.31)	1.53
Global 11/12	0.37 (0.24)	0.73 (0.08)	8.4 (2.87)	4.43

Tabela 1. Parâmetros de variabilidade estimados com microssatélites por sítio e período amostral: *Ho* e *He*: Heterozigosis observada e esperada respectivamente; *A*: Número observado de alelos; *rg*: Riqueza alélica. Entre parênteses se mostra o desvio padrão (Tabela modificada a partir de AMAVET et al., 2017).

No entanto, o histórico genético de cada local de amostragem se modificou com o tempo, com os índices de variabilidade aumentando ligeiramente, tendo como suposição que esse fato possa ser decorrente do fluxo de indivíduos de diferentes origens, devido às atividades de manejo e repovoamento desenvolvidas pelo “Proyecto Yacaré” (AMAVET et al., 2017).

Em relação às análises realizadas com o marcador mitocondrial entre as 15 sequências analisadas com o *cit b*, foram encontrados apenas quatro haplótipos, com valores de baixa diversidade genética. Além disso, levando em consideração os valores de *He* e a estimativa de $Ne = 2,1$, pode-se supor que eventos de gargalo realmente ocorreram no passado recente (AMAVET et al., 2017), coincidindo com a drástica redução da população que essa espécie sofreu nos anos 1970 devido à caça furtiva e ao comércio ilegal de seus produtos (WALLER e MICUCCI, 1995).

Os resultados obtidos nos estudos mencionados sugerem que, além de aumentar o tamanho da população de *C. latirostris*, as atividades de manejo desenvolvidas pelo Proyecto Yacaré em Santa Fé manteriam a variabilidade genética das espécies.

No entanto, as informações ainda estão incompletas e o monitoramento genético deve continuar regularmente para otimizar as atividades de manejo populacional.

Estudos de sistemas de acasalamento

De um modo geral, as populações de crocodilianos são frequentemente subdivididas em pequenas unidades (demos) devido a inúmeros fatores ambientais e antropogênicos e, nesse contexto, as estratégias de acasalamento podem determinar diferenças genéticas entre as populações. É muito comum em crocodilianos que, por razões de domínio hierárquico, alguns indivíduos não consigam se estabelecer em seu habitat original durante a época de corte e de acasalamento, portanto, migram para outros habitats em busca de oportunidades de reprodução. Isso resulta em um fluxo gênico entre populações que é altamente benéfico, especialmente para populações pequenas, pois reduz o risco de depressão por endogamia e deriva genética (KONUMA et al., 2000).

Por tudo isso, o conhecimento de estratégias reprodutivas contribui fundamentalmente para a conservação de uma espécie. A paternidade múltipla, isto é, a existência de mais de um genótipo paterno em uma ninhada, foi descrita como um agente que aumenta o tamanho efetivo da população (SUGG e CHESSER, 1994), elevando potencialmente a diversidade genética das populações que sofreram eventos recentes de deriva genética, como exemplo, gargalos (MC VAY et al., 2008). Marcadores microssatélites têm sido utilizados como uma ferramenta para analisar o comportamento reprodutivo em crocodilianos, para o qual existem poucos

dados porque o acasalamento ocorre quase que exclusivamente na água. Para realizar estudos do sistema de acasalamento em *C. latirostris*, na Argentina, foram obtidas amostras do DNA de fêmeas que cuidavam de ninhos e filhotes que ali eclodiram. Foram utilizados quatro marcadores microssatélites, com os quais 16 famílias foram analisadas, buscando reconstruir os genótipos dos filhotes e seus supostos pais. Os resultados mostraram que na maioria das ninhadas, a fêmea amostrada foi confirmada como a verdadeira mãe dos filhotes. Além disso, os genótipos paternos foram reconstruídos e foram encontradas evidências da existência de mais de um progenitor para os filhotes em duas famílias (AMAVET et al., 2008; 2012). No caso de *Caiman yacare*, 10 *loci* microssatélites foram amplificados em 148 amostras de indivíduos de 13 ninhadas, das quais a suposta mãe não era conhecida. Como resultado, o genótipo materno pôde ser determinado em nove dos 13 ninhos e, em seis deles foi encontrado mais de um genótipo paterno, com um máximo de três pais por ninho (OJEDA et al., 2016).

Assim como em outras espécies de crocodilianos, a estratégia reprodutiva de múltipla paternidade, verificada em ambas as espécies durante estes experimentos, certamente pode aumentar a variabilidade genética de suas populações, pois o *pool* genético beneficiaria suas populações, fornecendo ferramentas para melhorar a capacidade de enfrentar as adversidades ambientais.

Estratégias de reintrodução de crocodilianos

Existem inúmeros programas e zoológicos que contemplam a liberação de animais criados *ex situ* em habitats naturais, mantendo ou não seus locais de origem. Essa sempre foi uma questão controversa sobre como a liberação afetaria uma população através da introdução de animais de uma outra população, mesmo que essas atividades fossem realizados com as melhores das intenções, embora normalmente sejam realizadas de forma irracional, sem conhecimento ou embasamento científico adequado. Algumas discussões são orientadas no sentido de que essas ações podem produzir o efeito de funil e evitar a redução da variabilidade genética, desencadeando consequências sérias. Isso ocorre porque as populações de uma determinada espécie possuem um conjunto de genes que lhes permitem se adaptar ao ambiente em que são encontradas. Assim, quando uma população local é abastecida por indivíduos de programas

que contemplam a criação em cativeiro ou de outras populações, os genes nativos associados à sobrevivência naquele habitat podem ser reduzidos ou perdidos. Portanto, é aconselhável tentar aumentar as populações, mantendo a variabilidade genética da população receptora. Desta maneira, o monitoramento genético prévio dessas populações é necessário e essencial para evitar situações indesejadas.

Genética forense

A caça furtiva de animais e o comércio ilegal de seus produtos representam uma grande ameaça para muitas espécies, não só aos crocodilianos. Para que as leis nacionais e os tratados internacionais que regulam o comércio da vida selvagem sejam aplicados, é necessário ser capaz de identificar inequivocamente a quais espécies os produtos animais pertencem (EATON et al. 2010). Atualmente, uma ferramenta que pode auxiliar a taxonomia na identificação de espécies e taxa mais alta é um sistema de identificação microgenômica chamado “*barcoding*” (HEBERT et al., 2003). No contexto desta técnica, uma região, conhecida como *barcode*, de aproximadamente 650 pares de passagens (bp) do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade 1 (COI) é usada como marcador para identificação de espécies (TRIVEDI et al., 2016).

A técnica de *barcoding* busca comparar as sequências do material genético em estudo com uma sequência de referência, pesquisando similaridades entre as sequências de DNA ou por reconstrução filogenética (DAWNAY et al., 2007). Essa metodologia permite superar os déficits apresentados pela abordagem morfológica do reconhecimento de espécies, permitindo a identificação específica de uma amostra em qualquer estágio da vida do indivíduo e até mesmo de amostras em estado subótimo (putrefato ou tratado) (DAWNAY et al., 2007). Para que as sequências de *barcode* sejam usadas para a identificação correta das espécies é necessário existirem sequências de referência, obtidas a partir de espécimes identificados morfológicamente e de acordo com sua distribuição primária (DAWNAY et al., 2007; SONET et al., 2013).

A conservação dos crocodilianos e a consequente implementação de planos de manejo apropriados requerem a aplicação de novas técnicas (i.e., *barcoding*) que otimizam os estudos de identificação de espécies. Como as análises filogenéticas desempenham um papel fundamental nessa identificação, é imperativo avaliar a

eficácia da análise de sequência molecular para descobrir as relações filogenéticas entre os crocodilianos (MEGANATHAN et al., 2013). Todavia, deve ter-se em mente que o que se obtém a partir da reconstrução filogenética de um marcador molecular é uma árvore de um gene e não uma árvore de espécies.

DNA Ambiental

DNA ambiental (*eDNA*) é definido como o material genético obtido diretamente de amostras ambientais (solo, sedimentos, água, etc.), ou seja, os estudos de *eDNA* são baseados no fato de que todos os organismos vivos deixam vestígios de DNA nos ambientes em que habitam. Atualmente, existem alguns avanços no estudo para espécies raras que habitam lugares pouco acessíveis ou difíceis de observar direta e indiretamente. Nesses casos, essa nova metodologia oferece uma alternativa importante para a realização de inventários e programas de monitoramento (SMART et al., 2015; THOMSEN e WILLERSLEV, 2015). Juntamente com a técnica de *metabarcoding*, representam ferramentas poderosas para investigar a complexidade dos sistemas naturais e estudar sua biodiversidade. Essa nova abordagem combina duas tecnologias: identificação de espécies com base no DNA ambiental e sequenciamento massivo ou *High Throughput Sequencing* (HTS). A enorme quantidade de informações geradas pela aplicação dessas metodologias requer a aplicação de ferramentas computacionais complexas que são constantemente atualizadas e análises de dados que geram novas perspectivas de interpretação.

Os protocolos que utilizam esta técnica permitem a coleta rápida e padronizada de dados sobre a distribuição das espécies e sua abundância relativa (DOI et al., 2017). Assim, é usada para detectar espécies antes de avistamentos confirmados, determinar a área de distribuição, traçar as frentes de invasão e obter estimativas relativas de biomassa, abundância e riqueza taxonômica de espécies de vertebrados (PILLIOD et al., 2013; DOI et al., 2017). Neste contexto, o DNA ambiental tornou-se uma ferramenta genética eficaz para monitorar a biodiversidade e detectar espécies enigmáticas ou de baixa densidade quando os métodos convencionais falham (BOHMANN et al., 2014; THOMSEN e WILLERSLEV, 2015).

No entanto, há pouco histórico de seu uso em todo o mundo, incluindo alguns testes em crocodilianos, uma

vez que deve ser ajustado para uso em diferentes tipos de ambientes e para diferentes tipos de organismos.

Dano genético em espécies de crocodilianos

Nas últimas décadas tornou-se evidente que poluentes ambientais podem afetar espécies de répteis, incluindo os crocodilianos (CAMPBELL, 2003; SPARLING, 2010). No entanto, na maioria dos casos, esses animais são excluídos dos estudos de poluição ambiental e da avaliação de riscos ecológicos, mesmo sendo elos importantes em áreas úmidas. Os crocodilianos (jacarés, crocodilos e gaviais) são carnívoros longevos, localizados no topo da cadeia trófica, com áreas de vida bastante restritas e, necessariamente, associadas à água, habitando regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Por estes motivos, considera-se que os crocodilianos possam mostrar qualquer efeito associado à poluição ambiental (GARDNER, 2005).

A contaminação ambiental pode interferir no desenvolvimento e crescimento de organismos, mas o dano genético causado por exposições crônicas, mesmo em concentrações muito baixas dos agentes é, talvez, o efeito biológico mais relevante. Os agentes genotóxicos podem afetar a aptidão de populações de espécies selvagens devido à sua incidência na frequência de mutações somáticas e herdáveis, que aumentam a instabilidade genômica e podem ter um efeito seletivo em fenótipos sensíveis (VIARENGO et al., 2007). Portanto, a avaliação do potencial genotóxico de um determinado agente ou de suas misturas é essencial para estimar o risco ambiental e contribuir para a conservação dessas espécies.

Os marcadores de genotoxicidade destacam particularmente as alterações produzidas em nível genético por agentes químicos, físicos e biológicos, dentre outros. Genotoxicidade é um conceito amplo que inclui dano direto à molécula de DNA ou qualquer alteração que leve a um defeito nos mecanismos relacionados ao "maquinário genético", como variações na expressão de enzimas que participam nos processos de replicação ou reparo do DNA, bem como alterações nas fibras do eixo ou os centríolos, que produzem fenômenos de não disjunção cromossômica (mecanismos indiretos de dano) (CARBALLO e MUDRY, 2006). Acredita-se que esses mecanismos indiretos de dano envolvam atividade aneugênica, dano oxidativo a lipídios e proteínas, citotoxicidade, adutos de proteínas ou inibição de

enzimas associadas à síntese ou reparo de DNA. O termo genotoxicidade inclui conceitos que se referem a três fenômenos diferentes: mutagênese, carcinogênese e teratogênese. A exposição de um organismo a um agente genotóxico pode iniciar uma cascata de eventos em nível individual e depois populacional, sendo que o equilíbrio entre a conservação da informação genética e sua variação é um aspecto crucial da conservação e sobrevivência das espécies. O reparo do DNA é integrado à replicação, transcrição, controle do ciclo celular e apoptose, formando redes reguladoras destinadas a transmitir as informações presentes no momento da divisão celular. Dentro desses sistemas de controle, há uma tolerância à mudança (CARBALLO e MUDRY, 2006). Os biomarcadores de genotoxicidade, especialmente aqueles baseados em métodos não destrutivos, são de crescente interesse e relevância para medir efeitos potenciais em estudos de laboratório e monitoramento de campo. Entre eles, a análise de micronúcleos (MN) e outras anormalidades nucleares (ANs), bem como o dano ao DNA detectado pelo *Comet Assay* (CA) são os pontos finais de análises mais frequentes para detectar genotoxicidade em toxicologia ambiental. O teste MN detecta danos cromossômicos ao identificar fragmentos acêntricos ou cromossomos desgarrados que são separados do núcleo principal e são vistos como "pequenos núcleos" (FENECH et al., 2016). Pode ser aplicado a qualquer população de células em proliferação, independentemente do cariótipo da espécie, o que a torna particularmente importante no estudo dos efeitos genotóxicos em espécies selvagens (COSTA et al., 2011; GUIZI et al., 2016). Recentemente, diferentes autores também recomendaram a incorporação da análise de outras anormalidades nucleares como marcadores apropriados à contagem de frequências MN (FMN) (LAJMANOVICH et al., 2014; POLLO et al., 2015). Por sua vez, o CA detecta alterações específicas no nível da molécula de DNA, como quebras de cadeia simples e dupla, locais alcalinos lábeis e oxidação de bases em diferentes tipos de células sem a necessidade de proliferação, oferecendo a possibilidade de medir a integridade do DNA no nível das células individuais. Assim, células com maior dano ao DNA apresentam mais "fragmentos" que migram do núcleo, formando uma "cauda de cometa" (Figura 1; AZQUETA et al., 2014).

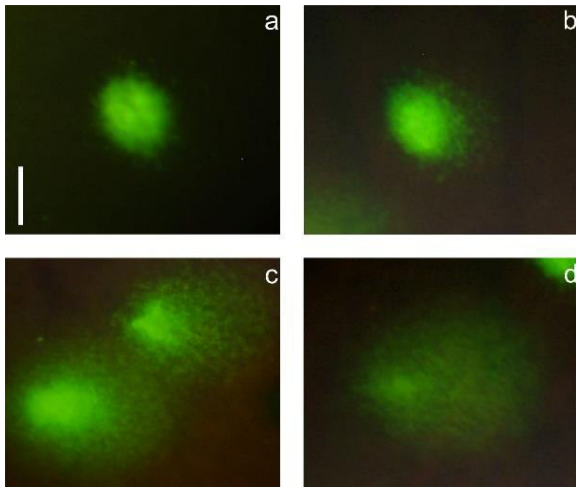


Figura 1: Imagens de cometas de diferentes classes de dano obtidas de eritrócitos de sangue periférico. (a) classe 1, (b) classe 2, (c) classe 3, (d) classe 4. Barra = 10 μ m

Na América do Sul, a superposição de áreas de distribuição natural de muitas espécies de crocodilianos com extensas áreas de cultivo podem afetar, a longo prazo, a dinâmica populacional, pois existem contínuas descargas de xenobióticos nos corpos hídricos onde estas espécies habitam. Com o objetivo de avaliar o possível impacto que os contaminantes químicos associados à atividade agrícola têm sobre o jacaré-de-papo-amarelo, há mais de 13 anos começou a ser estudado o efeito genotóxico de pesticidas nessa espécie (POLETTA et al., 2008). Nesse contexto, em nosso grupo de trabalho, os biomarcadores de genotoxicidade foram validados, introduzindo as modificações necessárias para possibilitar sua aplicação nos eritrócitos dessa espécie; e os valores basais de dano (neonatos-adultos) foram estabelecidos, mostrando que eles têm pouca variabilidade e que o jacaré-de-papo-amarelo é um organismo sentinela adequado para avaliação da genotoxicidade química e física (POLETTA et al., 2008). Nesse contexto, em nosso grupo de trabalho, os biomarcadores de genotoxicidade foram validados, introduzindo as modificações necessárias para possibilitar sua aplicação nos eritrócitos dessa espécie; e os valores basais de dano (neonatos-adultos) foram estabelecidos, mostrando que eles têm pouca variabilidade e que o jacaré-de-papo-amarelo é um organismo sentinela adequado para avaliação da genotoxicidade química e física (POLETTA et al., 2008).

Em seguida, o efeito genotóxico foi demonstrado pela exposição embrionária e pós-natal de jacarés-de-papo-amarelo sobre a formulação Roundup® (glifosato)

(POLETTA et al., 2009; LÓPEZ GONZÁLEZ et al., 2013, Figura 2). Os primeiros efeitos genotóxicos dos pesticidas nesta espécie e em todas as espécies de crocodilianos e répteis foram relatados por POLETTA et al. (2009).

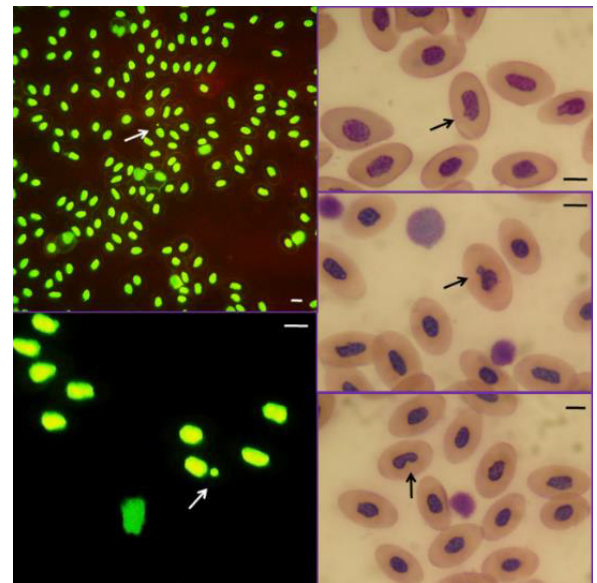


Figura 2: Eritrócitos de *Caiman latirostris* com diferentes anormalidades nucleares. Esquerda: eritrócitos tingidos com Laranja de Acridina mostrando micronúcleos; Direita: eritrócitos tingidos com Giemsa mostrando um broto nuclear (*bud*, acima), um micronúcleo (médio) e um núcleo com corte (*notched nucleus*, abaixo). Régua = 10 μ m.

Além disso, foi estabelecido que, independentemente do tempo em que eles são expostos durante o período embrionário (início-meio-final), a genotoxicidade é induzida nos eritrócitos dos animais expostos (BURELLA et al., 2017; Figura 3).

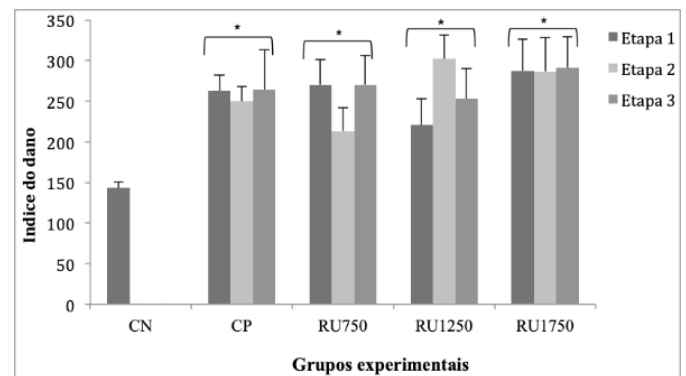


Figura 3. Índice de dano (ID, ensaio do cometa, média \pm erro padrão) observado em eritrócitos de caimans expostos em diferente momento do desenvolvimento embrionário à formulação a base de glifosato Roundup® (RU) em diferentes

concentrações (750, 1250 e 170 mg/huevo); CP: controle positivo. *Estatisticamente significativo frente ao controle negativo (CN; ANOVA, $p < 0.05$).

Por outra parte, danos ao DNA foram verificados em neonatos nascidos de ninhos expostos a formulações de pesticidas e suas misturas comumente usadas em práticas agrícolas, em condições que simulavam circunstâncias semelhantes às que poderiam ocorrer em ambientes naturais próximos às culturas (POLETTA et al., 2011). Além disso, os efeitos dos inseticidas Endosulfan, Cipermetrina e Clorpirifos em embriões e filhotes foram estudados por diferentes métodos de exposição, fornecendo resultados altamente interessantes sobre os efeitos desses compostos e suas interações em misturas binárias e ternárias (LÓPEZ GONZÁLEZ et al., 2017; 2019; BURELLA et al., 2018). Para avaliar a contribuição do dano oxidativo no DNA, foi utilizada uma modificação do CE com endonucleases específicas (formação de DNA-glicosilase e endonuclease III), o que nos permite ver o efeito gerado pela oxidação de bases puricas e/ou pirimidinas (POLETTA et al., 2016). Muitos dos compostos analisados evidenciaram esse mecanismo de dano.

Recentemente, começou a avaliar-se o efeito potencial desses compostos na expressão de genes de interesse, como os relacionados às vias de defesa antioxidante, reparação do DNA e controle do ciclo celular, que podem ser usados para detectar o estresse celular devido à exposição a xenobióticos com grande sensibilidade (PIÑA et al., 2007). Inicialmente, os protocolos foram adaptados para a preservação de amostras e extração de RNA de sangue e fígado (LÓPEZ GONZÁLEZ et al., in press), que atualmente também é usado para a extração de RNA de outros tecidos, como baço, gônadas e coração, com produtos de muito boa qualidade para o estudo de padrões de expressão de diferentes genes de interesse. A expressão dos genes correspondentes às enzimas antioxidantes (cat e sod) diminuiu em neonatos e juvenis de *C. latirostris* expostos a formulações de pesticidas e suas misturas, diminuição acompanhada por genotoxicidade e dano oxidativo ao DNA (Figura 4.; ODETTI et al., 2020). Os marcadores de expressão gênica seriam mais sensíveis e complementares à análise da atividade enzimática, já que a mesma não manifestou nenhuma diferença (ODETTI et al., in press).

Por fim, a realização de uma transcriptômica por meio de RNAseq (Illumina) em caimans expostos a uma

formulação de glifosato, permitiu identificar a expressão diferencial de 201 genes no sangue e 605 no fígado, destacando a alteração de vias associadas ao metabolismo lipídico, imunoglobulinas, regulação de transcrição, sinalização e adesão celular (POLETTA et al., 2018).

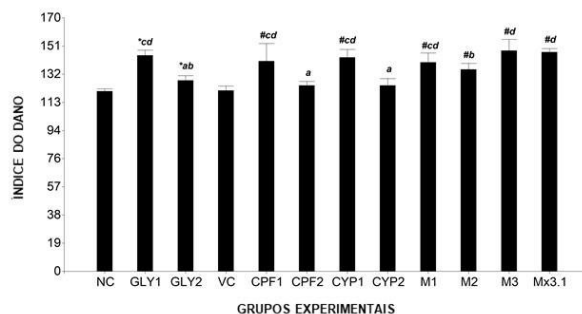


Figura 4. Dano oxidativo ao DNA detectado mediante o ensaio cometa modificado com utilização de endonucleases em recém nascidos de *Caiman latirostris* expostos a diferentes formulações de praguicidas e suas misturas durante o desenvolvimento embrionários. NC: controle negativo; VC: control de veículo; GLY1: formulação de glifosato a 2%; GLY2: formulação de glifosato a 1%; CPF1: formulação de clorpirifós a 0.8%; CPF2: formulação de clorpirifós a 0.4%; CYP1: formulação de cipermetrina a 0.12%; CYP2: formulação de cipermetrina a 0.06%; M1: mistura GLY1 + CYP1; M2: mistura CPF1 + CYP1; M3: mistura CPF1 + GLY1; Mx3.1: mistura das três formulações em concentrações utilizadas no campo: CYP1 + CPF1 + GLY1; Mx3.2: mistura das três formulações à metade da concentração de campo: CYP2 + CPF2 + GLY2. *Estatisticamente significativo a $p < 0.05$ comparado com o NC. # Estatisticamente significativo a $p < 0.05$ comparado com o VC. Letras diferentes (a, b, c e d) indicam diferença significativa a $p < 0.05$ entre misturas e seus componentes individuais ou entre duas concentrações do mesmo praguicida aplicado de forma individual.

Identificação e caracterização genética de componentes ativos

Os crocodilianos exibem comportamentos sociais bem definidos e respostas a estressores que podem desencadear uma série de reações agonísticas e até conflitos com humanos, que geralmente culminam em lesões graves, incluindo a perda de membros inteiros. Em muitos casos, esses animais vivem em ambientes que contêm uma alta concentração de microrganismos patogênicos, tanto em sistemas naturais quanto em cativeiro. Essas interações, em alguns casos, podem se tornar benéficas ao hospedeiro, em um exemplo de comensalismo, ou ter nenhum efeito sobre sua saúde. Todavia, frente algumas circunstâncias, a interação com bactérias exógenas pode causar danos e infecções

oportunistas podem aparecer (BASSET, 2016). Mas, mesmo que a combinação desses fatores possa causar um processo infeccioso local ou sistêmico, os crocodilianos parecem tolerar bem a maioria dessas situações, geralmente, sem demonstrar sinais clássicos de doença. Por esse motivo, suspeita-se que a eficácia desses mecanismos possa ser uma das causas mais relevantes de sua longevidade e para que eles tenham permanecido praticamente inalterados por milhões de anos. Todos os mecanismos imunológicos detectados até agora nessas espécies despertaram particular interesse. Por essa razão, o estudo dos mecanismos de defesa desses animais sofreu um impulso significativo devido à necessidade de se descobrir os componentes mais representativos do sistema imunológico inato, de modo que, por síntese recombinante, os mesmos resultados possam ser replicados em outras espécies.

Estudos sobre o sistema imunológico de vertebrados ectotérmicos mostraram progresso significativo. Nos últimos anos, um número significativo de genes que codificam moléculas imunes foram identificados em crocodilianos, e espera-se que a maioria deles seja clonada. As plataformas e programas de análise genética são usados para detectar certos genes desses componentes, que fornecem uma rede aberta de ferramentas interconectadas para gerenciar, analisar e visualizar dados do genoma. O genoma sequenciado e mapeado de muitas espécies está disponível nessas plataformas e são usados fragmentos ou sequências completas desses componentes, de espécies filogeneticamente próximas (aves, peixes, outros répteis) disponíveis nas bases de dados.

Embora tenha havido progresso na compreensão dos mecanismos imunológicos que favorecem a resposta imune em crocodilianos, as informações conhecidas sobre os componentes ainda são limitadas. Por exemplo, a composição e a bioatividade das citocinas foram estudadas em muitas espécies, mas não em crocodilianos. Existem poucos estudos que fornecem informações preliminares sobre a presença e expressão desses componentes em jacarés como indicadores do estado de saúde (SIROSKI e MOLEÓN, 2020). Com base nessas informações, as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias dos jacarés foram identificadas como excelentes candidatas ao uso nesses dois grupos de animais (aves e peixes) devido à sua proximidade filogenética. A expressão de citocinas identificadas será

avaliada como imunomoduladora, além da identificação e caracterização de outras citocinas.

As sequências de IgY e peptídeo antimicrobiano (PATM) estão sendo avaliadas atualmente. Esses genes de interesse potencial estão sendo avaliados por análise bioinformática e, em seguida, esses componentes devem ser sintetizados e testados quanto à atividade em trabalhos futuros. No caso do PATM, eles foram avaliados através da purificação dos glóbulos brancos de *C. latirostris*, sendo que os diferentes extratos foram analisados quanto à sua capacidade antimicrobiana. Essas informações serão enriquecidas com anotações genéticas, que relacionam informações do contexto do genoma, porcentagem de similaridade, dados experimentais e integrações de outros recursos etc. O sequenciamento do genoma abre uma nova janela no conhecimento dos componentes imunológicos dos crocodilianos, com a possibilidade de identificar mais proteínas desse grupo, além de analisar a maneira pela qual eles realizam suas atividades no organismo e em um contexto ecológico, com altíssima potencialidade terapêutica.

A terapia com anticorpos faz parte do que é conhecido como imunoterapia, onde são utilizadas imunoglobulinas de origem heteróloga e homóloga. A semelhança estrutural com IgY de aves permite tentar avaliar a produção destas com objetivos orientados para o tratamento de doenças infecciosas, alterações imunes ou inflamatórias. A ciência atual permitiu substituir alguns dos componentes do sistema imunológico, diminuir sua resposta através de métodos farmacológicos e biológicos e, modular ou aumentar a capacidade de resposta contra diferentes antígenos, especialmente aqueles de origem microbiana. Como perspectiva futura se propõe isolar, sequenciar e identificar o gene IgY2 completo (incluindo as regiões não codificantes), bem como para os demais isotipos de Ig. Por esse motivo, acreditamos que uma análise mais aprofundada focada no estudo da produção de IgY em crocodilianos esteja sendo abordada e, em breve, teremos resultados promissores. Do mesmo modo, estão sendo realizados estudos para a produção de proteína recombinante do componente central do sistema de complemento (C3), produto obtido a partir da purificação, avaliado em uma série de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Recentemente, uma série de estudos sobre indicadores de saúde de caimans foi desenvolvida e usada para avaliar os efeitos do estresse ambiental em espécies de interesse regional. Esses indicadores se referem ao

grau de afetamento dos estressores, tais como: situações climáticas extremas, distúrbios antrópicos, uso indiscriminado de pesticidas de habitats naturais etc. Entre esses testes indicadores estão a concentração de anticorpos naturais, a medição da atividade do sistema complemento, a contagem total e diferencial de leucócitos, a atividade fagocítica dos macrófagos, dentre outros.

O conhecimento das sequências genéticas de alguns componentes relevantes do sistema imunológico dos caimans contribuirá para a valorização de um enorme grupo de produtos potencialmente ativos, ainda hoje desconhecidos.

Conclusões

A caça ilegal de caimans na Argentina produziu uma série de gargalos junto às suas populações naturais, dentre os quais, e talvez o mais importante, a perda da variabilidade genética. Essa perda pode reduzir a capacidade desses animais de lidar com várias situações ambientais ou fatores antropogênicos, portanto, a qualidade dessa população deve ser monitorada periodicamente.

Os dados aqui apresentados sobre os caimans sulamericanos mostram evidências concretas sobre a contribuição dos dados genéticos para o desenho e avaliação de programas de manejo e planos de conservação. Especificamente, o estudo da estrutura genética das populações permite delimitar unidades de conservação que podem ser objetos de diferentes estratégias de uso sustentável, bem como as análises de variabilidade e o sistema de aparelhamento aporta à detecção de eventos de deriva genética, endogamia e outros agentes de mudança evolutiva que podem afetar as populações de crocodilianos. Todas essas informações

são relevantes para o monitoramento das populações de espécies crípticas e a identificação e monitoramento de produtos apreendidos e amostras desconhecidas. Da mesma forma, as consequências da perda de habitat e exposição a poluentes foram destacadas.

Em condições de cativeiro, se apresentam uma diversidade de características nos animais, diretamente relacionadas com sua conformação genética. Existem algumas ferramentas baseadas em evidências genéticas que permitem incrementar ou melhorar certas características desejáveis para a produção animal. Portanto, a avaliação genética de um criadouro permite identificar pontos fortes e fracos para estabelecer um programa de seleção genética para identificar os “jacarés” portadores de genes que expressem características desejáveis. A partir desta seleção, os animais selecionados irão se tornar os progenitores das gerações futuras. Essas condições de produtividade vão condicionar favoravelmente os parâmetros relacionados aos benefícios associados à produção.

Toda essa informação representa um avanço notável no conhecimento científico aplicável à conservação de espécies e nos permite propor diferentes metodologias de trabalho para monitorar ações antropogênicas em populações selvagens de crocodilianos autóctones. Neste sentido, faz alguns anos que os marcadores mencionados estão sendo utilizados para avaliar as populações naturais de *C. latirostris*. Os dados populacionais coletados desta forma, permitem o desenvolvimento e avaliação de planos de manejo e uso sustentável de espécies de crocodilos para uso comercial.

Além disso, existem várias perspectivas futuras em relação à busca de produtos alternativos derivados de espécies selvagens que atualmente estão sob programas de uso sustentável.

Referências

- AMAVET PS, MARKARIANI R, FENOCCHIO A. Comparative Cytogenetic Analysis of the American Alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. **Caryologia** 56: 489-493. 2003.
- AMAVET PS, ROSSO EL, MARKARIANI RM, LARRIERA A. Analysis of the population structure of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) in Santa Fe, Argentina, using the RAPD technique. **Journal of Herpetology** 41: 285-295, 2007.
- AMAVET PS, ROSSO E, MARKARIANI R, PIÑA CI. Microsatellite DNA markers applied to detection of multiple paternity in *Caiman latirostris* in Santa Fe, Argentina. **Journal of Experimental Zoology** 309A: 637-642. 2008.
- AMAVET P, VILARDI JC, ROSSO E, SAIDMAN B. Genetic and morphometric variability in *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman), Reptilia, Alligatoridae. **Journal of Experimental Zoology** 311A: 258-269. 2009
- AMAVET PS, VILARDI JC, MARKARIANI R, RUEDA E, LARRIERA A, SAIDMAN BO. Genetic variability in *Caiman latirostris* (broad- snouted caiman) (Reptilia, Alligatoridae). **Contributions to the sustainable use of populations recovered from**

- the risk of extinction.** Capítulo 11 en: Species Diversity and Extinction. USA. Ed: Geraldine Tepper. Nova Science Publishers Inc. ISBN: 978-1-61668-343-6. pp 341-359. 2010.
- AMAVET PS, VILARDI JC, RUEDA EC, LARRIERA A, SAIDMAN BO. Mating system and population analysis of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) using microsatellite markers. **Amphibia-Reptilia**. 33:83–93. 2012.
- AMAVET P, RUEDA EC, SIROSKI PA, LARRIERA A, SAIDMAN BO. Isolation and characterization of new microsatellite markers for application in population genetic studies of *Caiman latirostris* and related species. **Amphibia-Reptilia**. 36:175–180. 2015.
- AMAVET P, RUEDA E, VILARDI JC, SIROSKI P, LARRIERA A, SAIDMAN B. The *Caiman latirostris* population recovery in Argentina as a case of genetics conservation. **Amphibia-Reptilia**. 38 (4): 411-424. 2017.
- AZQUETA A, SLYSKOVA J, LANGIE SAS, GAIVÃOI O, COLLINS A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. **Front Genetics** 5: 1–8. 2014.
- BASSET, LAB. **Estado sanitário do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em paisagens antropizadas no Estado de São Paulo.** Tese. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 85p. 2016.
- BOHMANN K, EVANS A, GILBERT MTP. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. **Trends Ecology Evolution** 29: 358-367. 2014.
- BROCHU CA. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences** 31 (1): 357-97. 2003.
- BURELLA PM, SIMONIELLO M, POLETTA GL. Evaluation of Stage-Dependent Genotoxic Effect of Roundup (Glyphosate) on *Caiman latirostris* Embryos. **Archives Environmental Contamination Toxicology** 72: 50-57. 2017.
- BURELLA PM, ODETTI LM, SIMONIELLO MF, POLETTA GL. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad snouted caiman) exposed *in ovo* to pesticide formulations. **Ecotoxicology Environmental Safety** 161: 437-443. 2018.
- CAMPBELL KR. Ecotoxicology of crocodylians. **Apply Herpetology** 1: 45-163. 2003.
- CARBALLO MA, MUDRY MD. Indicadores y marcadores biológicos. In: MUDRY, M.D.; CARBALLO, M.A. (Eds.) **“Genética Toxicológica”**, De los Cuatro Vientos Editorial. Buenos Aires, Argentina, ISBN: 978-987-564-563-9, p. 632. 2006.
- CAVALLI-SFORZA LL, BODMER WF. **The Genetics of Human Populations**. San Francisco, USA: Freeman. 1971.
- COSTA PM, NEUPARTH TS, CAEIROA S, LOBO J, MARTINS M, FERREIRA AM, CAETANO M, VALE C, DELVALLS TA, COSTA MH. Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus *in situ* studies. **Environmental Research**. 111, 25-36. 2011.
- DAWNAY N, OGDEN R, MCEWING R, CARVALHO GR, THORPE YRS. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. **Forensic Science International** 173 (1): 1-6. 2007.
- DOI H, INUI R, AKAMATSU Y, et al. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. **Freshwater Biology** 62: 30-39. 2017.
- EATON M, MEYERS GL, KOLOKOTRONIS SO, LESLIE MS, MARTIN AP, AMATO G. Barcoding bushmeat: Molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. **Conservation Genetics** 11 (4): 1389-1404. 2010.
- FENECH M, KNASMUELLER S, BOLOGNESI C, BONASSI S, HOLLAND N, MIGLIORE L, PALITTI F, NATARAJAN AT, KIRSCH-VOLDERS M. Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. **Mutation Research** 770: 12-15. 2016.
- FRANKHAM R, BALLOU JD, BRISCOE DA. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2002.
- GARDNER SC. Introduction to Reptilian Toxicology **in: Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment**, ed. S. C. Gardner and E. Oberdörster, Taylor & Francis Group, Florida, 2005, pp. 1-8.
- GHISI DE CASTILHOS N, DE OLIVEIRA EC, PRIOLI AJ. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere** 145: 42-54. 2016.
- HADRY S H, BALICK M, SCHIERWATER B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology** 1: 55–63. 1992.
- HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL SL, DE WAARD JR. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceeding Royal Socociety London B** 270: 313-21. 2003.
- HEDRICK PW. **Genetics of populations**. Boston, USA: Science books international. 1983.
- LAJMANOVICH RC, CABAGNA-ZENKLUSEN MC, ATTADEMO AM, JUNGES CM, PELTZER PM, BASSÓ A, LORENZATTI E. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty® and glufosinate-ammonium. **Mutation Research** 769: 7-12. 2014.
- LEWONTIN RC. **Biology as ideology: The doctrine of DNA**. New York, USA: Harper Collins. 1991.
- LÓPEZ GONZÁLEZ EC, LATORRE MA, LARRIERA A, SIROSKI PA, POLETTA GL. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed *in vivo* to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 105: 131-134. 2013.
- LÓPEZ GONZÁLEZ EC, LARRIERA A, SIROSKI PA, POLETTA GL. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. **Ecotoxicology Environmental Safety** 136: 84-91. 2017.
- LÓPEZ GONZÁLEZ EC, SIROSKI PA, POLETTA GL. Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman). **Chemosphere** 232: 337-344. 2019.

- LÓPEZ GONZÁLEZ EC, ODETTI LM, POLETTA GL, DENSLOW N, KROLL KJ, SIROSKI PA AND PARACHÚ MARCÓ MV. Optimizing protocols for high-quality RNA extraction from blood and liver tissues of the Broad-snouted caiman. **Russian Journal of Herpetology**, 2020. *in press*.
- MCVAY JD, RODRIGUEZ D, RAINWATER TR, DEVER JA, PLATT SG, MCMURRY ST, FORSTNER MRJ, DENSMORE LD. Evidence of multiple paternity in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) in Belize, CA, inferred from microsatellite markers. **Journal of Experimental Zoology** 309A: 643-648. 2008.
- MEGANATHAN PR, BHAWNA D, KOTHAKOTA NJ, IKRAMUL H. Identification of Indian crocodile species through DNA barcodes. **Journal of Forensic Sciences** 58 (4): 993-98. 2013.
- METZ S, CABRERA JM, RUEDA E, GIRI F, AMAVET P. FullSSR: microsatellite finder and primer designer. **Advances in Bioinformatics**, Article ID 6040124, 2016.
- ODETTI LM, LÓPEZ GONZÁLEZ EC, ROMITO ML, SIMONIELLO MF, POLETTA GL. Genotoxicity and oxidative stress in *Caiman latirostris* hatchlings exposed to pesticide formulations and their mixtures during development through incubation material. **Ecotoxicology Environmental Safety** 193: 110312. 2020.
- ODETTI LM, PARAVANI E, SIMONIELLO MF, POLETTA GL. Gene expression patterns of antioxidant enzymes in blood of *Caiman latirostris* hatchling exposed to pesticide formulations. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *in press*.
- OJEDA G, AMAVET P, RUEDA E, SIROSKI P, LARRIERA A. Mating system of *Caiman yacare* (Reptilia: Alligatoridae) described from microsatellite genotypes. **Journal of Heredity** 108 (2): 135-141. 2016
- PILLIOD DS, GOLDBERG CS, ARKLE RS, WAITS LP. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 70:1123-1130. 2013.
- PIÑA B, CASADO M, QUIRÓS L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. **Trends in Analytical Chemistry** 26: 1145- 1154. 2007.
- POLETTA GL, LARRIERA A, KLEINSORGE E, MUDRY MD. *Caiman latirostris* (broad snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: Basal values determination of micronucleus and comet assay. **Mutation Research**. 650: 202-20. 2008.
- POLETTA GL, Kleinsorge E, Mudry MD, Larriera A. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. **Mutation Research** 672: 95-102. 2009.
- POLETTA GL, KLEINSORGE E, PAONESSA A, MUDRY MD, LARRIERA A, SIROSKI PA. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. **Ecotoxicology Environmental Safety** 74: 852-859. 2011.
- POLETTA GL, SIROSKI PA, AMAVET PS, ORTEGA HH, MUDRY MD. Reptiles as Animal Models: Examples of Their Utility in Genetics, Immunology and Toxicology. In: En: Lutterschmidt W. (Ed.) “**Reptiles in Research: Investigations of Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea**”, Chap. 21, Nova Science Publishers, New York, USA, ISBN: 978-1-62808-599-0, p 546. 2013.
- POLETTA GL, SIMONIELLO MF, MUDRY MD. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 179: 29-3. 2016.
- POLETTA GL, LÓPEZ GONZÁLEZ EC, BURELLA PM, ROMITO ML, SIROSKI PA, MUDRY MD. Biomarkers of environmental contamination in reptile species: the effect of pesticide formulations on broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*, Crocodylia, Alligatoridae). In: Larramendy ML. (Ed.) “**Non-Conventional Animal Models in Ecotoxicological and Genotoxicological Studies**”, Volume 1: Aquatic Models”, Royal Soc Chem. Cambridge, UK, ISBN: 978-1-78262-781-4, p. 546. 2017.
- POLETTA GL, PARACHÚ MARCÓ MV, LÓPEZ GONZÁLEZ EC, DENSLOW N, SIROSKI PA. Transcriptomic of blood and liver tissues of *Caiman latirostris* through Next generation sequencing after acute exposure to glyphosate-base formulation Roundup®”. **25th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group (CSG/SSC/IUCN)**, Santa Fe, Argentina. 2018.
- POLLO FE, BIONDA CL, SALINAS ZA, SALAS NE, MARTINO AL. Common toad *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) and its importance in assessing environmental health: test of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes. **Environmental Monitoring Assessment** 187: 581. 2015.
- SIROSKI PA, MOLEÓN BARSANI MS. Review of the Recent Knowledge on the Crocodylian Immune System. **South American Journal of Herpetology**. 2020. *in press*.
- SMART AS, TINGLEY R, WEEKS AR et al. Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. **Ecology Applied** 25:1944-1952. 2015.
- SONET G, JORDAENS K, BRAET Y, BOURGUIGNON L, DUPONT E, BACKELJAU T, MEYER M, DESMYTER S. Utility of GenBank and the Barcode of Life Data Systems (BOLD) for the identification of forensically important Diptera from Belgium and France. **ZooKeys** 365: 307-28. 2013.
- SPARLING DW, LINDER G, BISHOP CA, KREST SK. Recent advancements in amphibian and reptile ecotoxicology in **Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles**, ed. D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop and S.K. Krest, CRC Press, New York, pp. 1-14. 2010.
- SUGG DW, CHESSER RK. Effective population size with multiple paternity. **Genetics** 137: 1147-1155. 1994.
- THOMSEN PF, WILLERSLEV E. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological Conservation**. 183: 4-18. 2015.
- TRIVEDI S, ABDULHADI AA, REHMAN H, SAGGU S, GHOSH S. DNA barcoding: Tool for assessing species identification in Reptilia. **Journal of Entomology and Zoology Studies** 332 (41): 332-37. 2016.

VIARENGO A, LOWE D, BOLOGNESI C, FABBRI E, KOEHLER A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry Physiology C** 146, 281–300. 2007.

WALLER T, MICUCCI P. Los Yacarés en Argentina. Hacia un Aprovechamiento Sustentable. En: Larriera A, Verdade LM, editors. *La Conservación y el Manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina*. Vol. I. Santo Tomé, Santa Fe (Argentina): Fundación Banco Bica. p. 81–112. 1995.