

ANÁLISE DE FEROMÔNIOS NOS RÉPTEIS DA ESPÉCIE *Tropidurus torquatus* (SQUAMATA, TROPIDURIDAE) DA CIDADE DE AVARÉ: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E INFLUÊNCIA NA REPRODUÇÃO.

NATHALLY G. ALUQUERQUE ROBERTO¹, LÍVIA C. SANTOS².

¹ Graduanda em Licenciatura em Ciências Biológicas, Bolsista PIBIC, IFSP, Câmpus Avaré, nathalbuquerque@gmail.com

² Professora Doutora do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, IFSP, Câmpus Avaré, liviasantosbio@gmail.com
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.04.03.00-3 Fisiologia dos Grupos Recentes

Apresentado no
10º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP
27 e 28 de novembro de 2019- Sorocaba-SP, Brasil

RESUMO: Dentre as estratégias reprodutivas de répteis Squamata existem os feromônios, hormônios secretados por glândulas exócrinas com papel importante na comunicação química, bastante utilizada para reprodução, permitindo que os indivíduos de uma espécie sejam capazes de se reconhecer. O objetivo deste estudo é investigar a presença de glândulas exócrinas, que liberam feromônios, através de análises histológicas na região pré-cloacal da espécie *Tropidurus torquatus*, além da análise da composição química e do papel dos feromônios na reprodução. Para as análises histológicas, foram utilizados espécimes previamente depositados em coleção zoológica. Para as análises de composição química dos feromônios, foram realizadas coletas na região de Avaré, cidade do interior de São Paulo, uma vez por semana, ao longo de nove meses. A busca dos indivíduos foi visual e a captura manual, e os lagartos capturados passaram então pelo método de esfregaço na região pré-cloacal para coleta de secreções glandulares, antes de serem soltos no mesmo local. A análise química das secreções foi realizada em um cromatógrafo gasoso. Como resultado da análise química encontramos 27 compostos diferentes, pertencentes a diferentes classes, como os ácidos carboxílicos. Já na análise histológica foi possível identificar glândulas acinosas, havendo variação no diâmetro das glândulas em diferentes períodos do ano.

PALAVRAS-CHAVE: Feromônios; *Tropidurus torquatus*; Perfil cromatográfico; Reprodução; Glândulas pré-cloacais.

ANALYSIS OF THE PHEROMONES ON REPTILES OF THE SPECIES *Tropidurus torquatus* (SQUAMATA, TROPIDURIDAE) FROM AVARÉ MUNICIPALITY: CHEMICAL COMPOSITION AND INFLUENCE ON REPRODUCTION.

ABSTRACT: Among the reproductive strategies of Squamata reptiles are pheromones, hormones secreted by exocrine glands that play an important role in chemical communication, widely used in reproduction, allowing individuals of a species to be able to recognize each other. The aim of this study is to investigate through histological analysis the presence of exocrine glands which release pheromones, in the pre-cloacal region of *Tropidurus torquatus*, as well as the analysis of chemical composition and the role of pheromones in reproduction. For histological analyses, specimens previously deposited in zoological collection were used. For the analysis of the chemical composition of the pheromones, collections were performed in the region of Avaré, city of the interior of São Paulo, once a week, during nine months. The search for individuals was visual and followed by manual capture of the lizards. A smear collection was then made in the pre-cloacal region to collect glandular secretions, before releasing the lizard at the same site. Chemical analysis of secretions was performed on a gas chromatograph. As a result of chemical analysis, we found 27 different compounds, belonging to different classes, such as carboxylic acids. By means of histological analysis it was possible to identify acinar glands, with variation in the diameter of the glands in different periods of the year.

KEYWORDS: Pheromones; *Tropidurus torquatus*; Chromatographic profile; Reproduction; Precloacal glands.

INTRODUÇÃO

A biologia reprodutiva de répteis Squamata inclui diversos aspectos, como por exemplo o dimorfismo sexual, acasalamento e ciclos reprodutivos (SEIGEL; FORD, 1987 apud ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Para se estudar o ciclo reprodutivo é necessário ter conhecimento de diversas estratégias reprodutivas da espécie, como estocagem de esperma, ovulação e crescimento folicular, entre outros (ALMEIDA-SANTOS et al., 2014). Os feromônios também fazem parte da estratégia reprodutiva das espécies e, trata-se de hormônios secretados por glândulas exócrinas (ESCOBAR et al., 2001), com papel importante na comunicação química intraespecífica (KHANNON; EL-GENDY; HARDIGE, 2011), sendo importante na reprodução e papel social, permitindo que indivíduos possam se reconhecer (ALBERTS, 1990).

Entre os Squamata, várias espécies possuem glândulas epidérmicas que podem estar relacionadas com a produção de feromônios (JARED, 1999). Os principais locais em que os lagartos produzem esses compostos químicos são a cloaca, os poros pré-cloacais e os poros femorais e tais estruturais não são encontrados nos lagartos do gênero *Torquatus* (ESCOBAR, 2001; IMPARATO et al., 2007; RODRIGUES, 1986). É possível que, nas espécies desse gênero, haja a presença de glândulas secretoras de feromônios na cavidade cloacal, ou glândulas epidérmicas com poros inconspícuos, o que até o momento não foi analisado.

A proposta deste estudo é investigar a presença de glândulas exócrinas, que liberam feromônios, através de análises histológicas na região pré-cloacal, analisar a composição química e o papel dos feromônios na reprodução dos lagartos da espécie *Tropidurus torquatus*, a fim de se conhecer um dos possíveis fatores da reprodução dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas em Avaré, cidade do interior de São Paulo. A espécie *Tropidurus torquatus* tem hábito forrageiro (SCHOENER, 1971), e pode ser encontrada em locais abertos e com substrato rochoso (RODRIGUES, 1987). Sendo assim, as coletas foram realizadas uma vez por semana, durante nove meses (agosto de 2018 a maio de 2019). A busca pela espécie foi visual e a captura manual. Aqueles que foram coletados foram medidos e identificados como macho ou fêmea por meio do dimorfismo sexual. Em seguida, os espécimes passaram pelo método de esfregaço na região cloacal. As secreções coletadas de cada indivíduo foram dissolvidas em n-hexano, e as amostras de indivíduos do mesmo sexo que foram coletadas no mesmo mês foram misturadas para que as amostras obtivessem maior concentração de compostos.

CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA

A análise química foi realizada em um cromatógrafo gasoso. As secreções coletadas foram misturadas a um solvente, n-hexano, e então armazenadas a -18°C até o momento da análise. Posteriormente foi injetado 1µl de cada amostra no CG para análise do perfil cromatográfico.

HISTOLOGIA DA REGIÃO CLOACAL

Durante o estudo foi feita a análise histológica da região pré-cloacal de dois machos e duas fêmeas *T. torquatus* disponíveis na coleção zoológica do IFSP – Campus Avaré, sendo um macho coletado no mês de julho e outro no mês de setembro de 2017, e uma fêmea coletada no mês de agosto e outra no mês de outubro de 2017. As amostras coletadas foram alocadas em frascos com etanol 70% e enviadas ao laboratório de análises clínicas veterinárias VETPAT, em Campinas (SP), para produção das lâminas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, e então analisados. Para as análises foi utilizado microscópio trinocular Zeiss com câmera e software de captura de imagens, para obtenção de fotos dos cortes. As lâminas permitiram identificar a presença de glândulas exócrinas que podem liberar feromônios. Para evidenciar a variação de diâmetro das glândulas das fêmeas do mês de agosto para o mês de outubro, foi feita uma média de diâmetro dessas glândulas em cada um desses

meses e feita análise de variâncias (ANOVA) para testar se há variação significativa. O mesmo foi feito com os machos. Posteriormente fizemos a discussão da relação desses dados com o ciclo reprodutivo do *T. torquatus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AMOSTRAS

Durante os meses de setembro de 2018 a abril de 2019 foram coletados 52 indivíduos da espécie *Tropidurus torquatus*, sendo 30 fêmeas e 22 machos.

ANÁLISE QUÍMICA

O resultado da análise química é correspondente a amostras de fêmeas coletadas em novembro de 2018 e janeiro, março e abril de 2019, e amostras de machos coletados em setembro e outubro de 2018 e janeiro, março e abril de 2019. Foram observados 27 compostos diferentes ao total, pertencendo a diferentes classes, sendo 16 alcanos, 1 composto artefato do equipamento (Silane, cyclohexyldimethoxymethyl), 1 aldeído (dodecanal), 1 fenol, 3 ácidos graxos (ácido oleico, ácido dodecanóico e ácido hexadecanóico), 1 benzeno, 2 plastificantes, 1 ácido carboxílico (ácido hexanedióico) e 1 composto não identificado (figura 1).

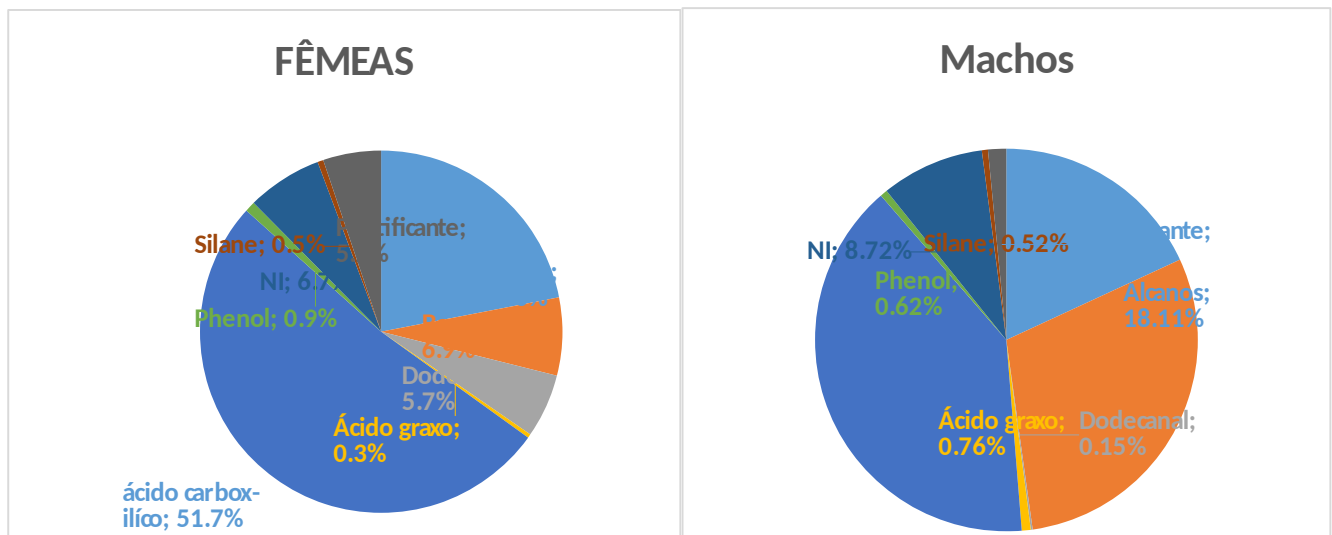


FIGURA 1. Porcentagens de cada classe de compostos químicos encontrados, separados por sexo.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

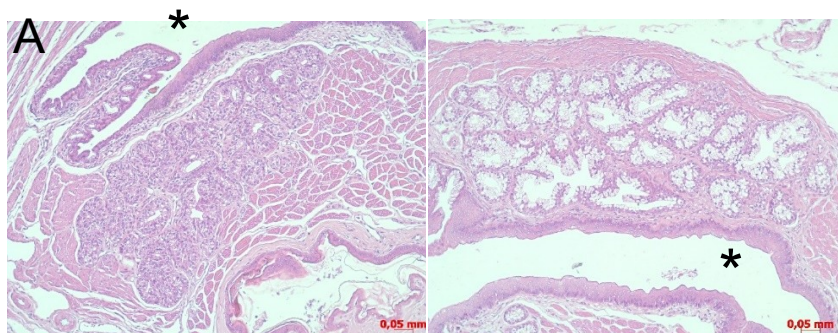
Fêmeas

Nas duas lâminas analisadas das fêmeas foi possível observar regiões do tecido em que há uma concentração de glândulas acinosas em locais próximos à cavidade cloacal, como é possível observar na figura 2. Foi possível notar também uma diferença significativa no diâmetro médio das glândulas ($p=0,0004$) (tabela 1).

TABELA 1. Média das circunferências glandulares.

Fêmea – Agosto 2017	Fêmea - Outubro 2017
0,008 mm	0,027 mm

B



FONTE: ROBERTO, N.G.A., 2019

FIGURA 2. Microscopia eletrônica mostrando região próxima a cavidade cloacal com glândulas acinosas. (A) Fêmea de agosto de 2017. (B) Fêmea de outubro de 2017. (*) Cavidade cloacal.

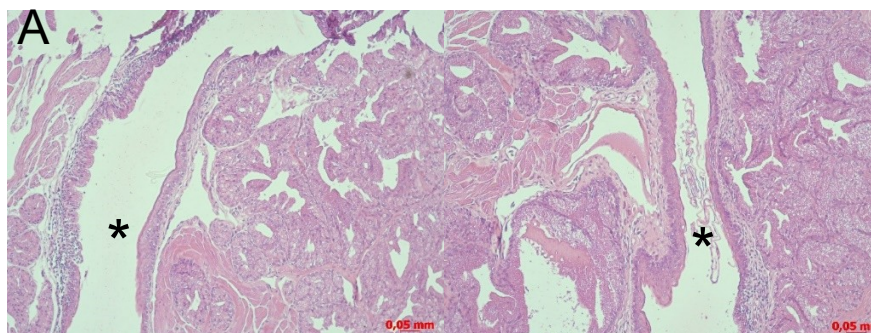
Machos

Nas duas lâminas analisadas dos machos também foi possível observar regiões do tecido em que há uma concentração de glândulas acinosas em locais próximos à abertura e canal cloacal, como indicado na figura 3. A diferença de diâmetro das glândulas entre as lâminas do mês de julho e setembro de 2017, como foi observado nas fêmeas, não foi evidente nos machos ($p = 0,44$) (tabela 2).

TABELA 4. Média das circunferências glandulares.

Macho – Julho 2017	Macho – Setembro 2017
0,0269 mm	0,0260 mm

B



FONTE: ROBERTO, N.G.A., 2019

FIGURA 3. Microscopia eletrônica mostrando região próxima a cavidade cloacal com glândulas acinosas. (A) Macho de julho de 2017. (B) Macho de setembro de 2017. (*) Cavidade cloacal.

SAZONALIDADE

O fato de os *Tropidurus torquatus* apresentarem reprodução sazonal torna a comunicação química um possível fator de influência, pois através dos feromônios liberados os indivíduos podem identificar a época reprodutiva, além de comunicar-se. Na maior parte dos estudos sobre caracterização química de secreções glandulares, cloacais e epidérmicas, os compostos comumente encontrados são os lipídios, esteroides, ácidos graxos e ácidos carboxílicos (ALBERTS, 1990; ESCOBAR et. al, 2001; LOPÉZ E MARTIN, 2005, entre outros), compostos estes que também foram encontrados no presente trabalho, porém em baixas quantidades. Quanto à sazonalidade na produção de feromônios, que pode ser um fator importante para influenciar na reprodução sazonal, não foi observada no presente estudo. A análise estatística usada para testar a sazonalidade dos feromônios demonstra que não podemos afirmar que há uma variação sazonal na quantidade dos compostos. Esse resultado pode ter sido obtido tanto por conta da falta de amostragem dos outros meses do ano, tanto por conta da baixa quantidade de secreções cloacais obtida através do esfregaço, impedindo que outros compostos fossem identificados ou que houvesse uma variação em suas quantidades. Entretanto na análise estatística para

testar a variação de diâmetro médio das glândulas observadas nas lâminas de fêmeas demonstra que há uma variação significativa, o que pode indicar que há uma variação no volume de secreção entre os meses.

CONCLUSÕES

A nossa hipótese sobre a presença de feromônios pode ser reforçada pela presença de compostos como ácidos carboxílicos e ácidos graxos nas análises, comumente presentes em trabalhos com feromônios. Já a hipótese de sazonalidade dos compostos não pode ser observada, entretanto ressaltamos a necessidade de maiores estudos com a espécie, obtendo maior número amostral, para melhor identificar compostos presentes nas secreções de cada mês e dessa forma testar tal hipótese. Quanto à análise histológica, foi possível confirmar a presença de glândulas exócrinas, sendo elas acinosas, identificando também uma maior atividade dessas glândulas no período reprodutivo, principalmente nas fêmeas, mas ainda ressaltamos a necessidade de diferentes colorações histoquímicas do material para identificar o tipo de secreção dessa glândula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq por ter financiado esse projeto, permitindo a sua realização, agradeço a minha orientadora pelas dicas, ajudas e muito aprendizado, agradeço aos amigos e meu parceiro pelas ajudas nas coletas e apoio durante todo projeto e agradeço minha família por mesmo longe estar tão perto.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, A.C. Chemical properties of femoral gland secretions in the desert Iguana, *Dipsosaurus dorsalis*. **Journal of chemical ecology**, Department of zoological society of San Diego, v.16, No. 1, 13-22, 1990.
- ALMEIDA-SANTOS, S.M.; BRAZ, H.B.; SANTOS, L.C.; SUEIRO, L.R.; BARROS, V.A.; ROJAS, C.A.; KASPEROVICZUS, K.N. Biologia reprodutiva de serpentes: recomendações para coleta e análise de dados. **Herpetologia brasileira**, v.3, No. 1, 14-24, 2014.
- ESCOBAR, C.A.; LABRA, A.; NIEMEYER, H.M. Chemical composition of precloacal secretions of *Liolaemus* lizards. **Journal of chemical ecology**, departamento de ciencias ecológicas da universidade do Chile, v.27, No. 8, 1677-1690, 2001.
- KHANNOON, E.R.; EL – GENDY, A. e HARDEGE, J.D. Scent marking pheromones in lizards: cholesterol and long chain alcohols elicit avoidance and aggression in male *Acanthodactylus boskianus* (Squamata: Lacertidae). **Chemoecology**, v. 21, 143–149, 2011.
- IMPARATO, B. A.; ANTONIAZZI, M. M.; RODRIGUES, M. T.; JARED, C. Morphology of the Femoral Glands in the Lizard *Ameiva ameiva* (Teiidae) and Their Possible Role in Semiochemical Dispersion. **Journal of Morphology**, v. 268, n. 7, p. 636-648, 2007.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M.M.; SILVA, J.R.M.C.; FREYMÜLLER, E. Epidermal Glands in Squamata: Microscopical Examination of Precloacal Glands in *Amphisbaena alba* (Amphisbaenia, Amphisbaenidae). **Journal of morphology**, v. 241, p. 197-206, 1999.
- LÓPEZ, P.; MARTÍN, J. Intersexual differences in chemical composition of precloacal gland secretions of the amphisbaenian *Blanus cinereus*. **Journal of chemical ecology**, 2005.
- RODRIGUES, M. T. Um novo *Tropidurus* com crista dorsal do Brasil, com comentários sobre as suas relações, distribuição e origem (Sauria, Iguanidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 36, n. 17, p. 171-179, 1986.
- RODRIGUES, M. T. Sistemática, ecologia e zoogeografia dos *Tropidurus* do grupo Torquatus ao Sul do Rio Amazonas (Sauria, Iguanidae). **Arquivos de Zoologia**, v. 31, n.3, p. 105–230, 1987.
- SCHOENER, T.W. Theory of feeding strategies. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 2, p. 369-404, 1971.