

Carolina Nisa Ramiro

**Caracterização química de secreções de glândulas
pré-anais e femorais de espécies brasileiras de
lagartos da família Teiidae (Squamata)**

Chemical characterization of secretions of preanal and femoral
glands of Brazilian species of lizards of the family Teiidae
(Squamata)

São Paulo

2019

Carolina Nisa Ramiro

**Caracterização química de secreções de glândulas
pré-anais e femorais de espécies brasileiras de
lagartos da família Teiidae (Squamata)**

Chemical characterization of secretions of preanal and femoral
glands of Brazilian species of lizards of the family Teiidae
(Squamata)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Doutor em Zoologia.

Orientador: Miguel Trefaut Rodrigues

Coorientador: Pedro Ismael da Silva Jr.

São Paulo

2019

Ramiro, Carolina Nisa

Caracterização química de secreções de glândulas pré-anais e femorais de espécies brasileiras de lagartos da família Teiidae (Squamata)

267 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Zoologia.

1. Comunicação química. 2. Semioquímicos. 3. Lagartos neotropicais. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora:

Prof.(a) Dr.(a).

Prof.(a) Dr.(a).

Prof.(a) Dr.(a).

Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues (Orientador)

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado (Processo 2015/12841-5), pela bolsa estágio de pesquisa no exterior (Processo 2017/19640-0) e pelo apoio financeiro ao Centro de Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular (Processo 2013/07467-1) do Instituto Butantan, fundamentais para a realização deste projeto, assim como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 472744/2012-7).

Agradeço ao Prof. Dr. Miguel Trefaut Rodrigues e ao Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Jr. por terem embarcado comigo neste projeto que era tão diferente de tudo o que vínhamos fazendo, pelo apoio, pelos ensinamentos e por serem exemplos de profissionais.

Agradeço ao Dr. José Martín por ter me recebido em seu país e por ter me ensinado tanto sobre o tema. Agradeço à Dra. Pílar López e ao Dr. Gonzalo Rodrigues por terem dedicado tempo ao meu projeto e me apresentado aos experimentos comportamentais. Agradeço ao técnico Márcio Nardelli por toda a ajuda na compreensão dos cromatogramas.

Agradeço aos meus amigos de laboratório por todas as conversas, discussões acadêmicas, dicas e, especialmente, pelas risadas e pela amizade. Agradeço aos meus amigos não herpetólogos por não se queixarem das conversas sobre calangos.

Agradeço à minha família, a de sempre e a que ganhei nos últimos anos por acreditarem sempre em mim e no meu trabalho. Agradeço ao Vinícius Primiani não apenas pelo apoio, mas especialmente por ter suportado a distância tantas vezes para que eu pudesse compreender melhor as “linguadas” dos lagartos.

Agradeço, mais uma vez, à Maria Auxiliadora Ribeiro (Dora), ao Niltom Ribeiro (Doga) e ao Nevitom Celso Rabelo (Nevinho) por representarem tão bem as pessoas incríveis que vivem no interior do nosso país e que sempre se mostram tão dispostas a ajudar cientistas perdidos em busca de calangos.

Introdução Geral

Contexto teórico

Os animais estão constantemente interagindo com outros indivíduos, coespecíficos ou não, através da troca de informações de diferente natureza: visuais, auditivas, táteis, elétricas e químicas. A existência de estruturas que permitem a percepção de informações químicas é antiga na história evolutiva, sendo compartilhada por todos os organismos, incluindo as bactérias (WYATT, 2014a) e os animais utilizam os sentidos químicos nos mais diversos contextos. Pernilongos utilizam o dióxido de carbono liberado por mamíferos para localizar a fonte de alimento (WYATT, 2014a), fêmeas de aranhas podem utilizar informações químicas para avaliar o *status* de saúde de potenciais parceiros (GILBERT & UETZ, 2019), lobos utilizam informações químicas nas fezes para marcar território e acessar a idade dos indivíduos (MARTÍN *et al.*, 2010), serpentes utilizam informações químicas de coespecíficos que são melhores forrageadores para tomar decisões de forrageio (CLARK, 2007) e recentemente tem surgido mais evidências de interações químicas em aves (CARO & BALTHAZART, 2010).

Compostos químicos envolvidos na interação entre dois organismos são chamados genericamente de semioquímicos (NORDLUND & LEWIS, 1976). Feromônios são semioquímicos utilizados em interações intraespecíficas e evoluíram como sinais para a comunicação e aleloquímicos são semioquímicos utilizados em interações interespecíficas e seu uso como pista química não tem relação com a sua evolução (KARLSON & LUSCHER, 1959; NORDLUND & LEWIS, 1976; WYATT, 2014a). O estudo moderno das interações químicas (WYATT, 2010) teve início com a percepção da existência dos feromônios (KARLSON & LUSCHER, 1959) e, posteriormente, com a identificação do bombicol, o primeiro feromônio isolado do bicho da seda (BUTENANDT *et al.*, 1961). Sessenta anos se passaram desde a criação do termo feromônio e avanços metodológicos nos permitiram, não apenas identificar milhares de feromônios nos mais diversos grupos do reino animal, como ampliar nossa compreensão sobre seu funcionamento (WYATT, 2014a). Atualmente se sabe que os feromônios, não estão apenas restritos às interações intraespecíficas, como precisam causar uma reação específica no receptor como, por exemplo, um comportamento

estereotipado (WYATT, 2010), o que exige mais informações para determinar se um determinado semioquímico é ou não um feromônio. Diferente de outras modalidades sensoriais, a percepção de semioquímicos não depende de luminosidade e seus sinais podem permanecer no ambiente mesmo após a saída do emissor, o que é particularmente importante para animais que vivem de forma mais solitária (SYMONDS & ELGAR, 2008; MARTÍN & LÓPEZ, 2000; GILLAM, 2011; MARTÍN & LÓPEZ, 2012).

A ordem Squamata (serpentes, anfisbenas e lagartos) é uma das mais diversas radiações de vertebrados, apresentando 10.417 espécies (UETZ *et al.*, 2019). São animais tipicamente solitários (POUGH *et al.*, 2003) e o hábito de dardejar (movimentos sequenciais de extrusão e retração da língua) é uma de suas características mais marcantes (COOPER, 1994). Historicamente as filogenias de Squamata, baseadas em dados morfológicos, suportavam uma divisão entre os Iguania e os Scleroglossa, os últimos incluindo algumas famílias de lagartos, as serpentes e as anfisbenas (ESTES *et al.*, 1988; CONRAD, 2008; LOSOS *et al.*, 2012). Além das diferenças genéricas na morfologia, os dois grupos se diferenciavam pela modalidade sensorial mais explorada: para os Iguania os estímulos visuais teriam maior importância, enquanto para os Scleroglossa, seriam os sinais químicos. COOPER JR. (1996) realizou um trabalho de reconstrução da história evolutiva dos sentidos químicos em Squamata e recuperou a divisão observada nas filogenias morfológicas, porém PYRON e colaboradores (2013) realizaram a primeira grande filogenia molecular para os Squamata revelando uma topologia que não se enquadra com a perspectiva da importância das duas modalidades sensoriais (visual x química). Embora os dados moleculares indiquem relações filogenéticas novas, os termos Iguania e Scleroglossa ainda são utilizados por conveniência, pois permitem que os herpetólogos rapidamente pensem em uma série de características morfológicas e comportamentais.

Os Squamata, assim como a maioria dos vertebrados, apresentam três sistemas quimiossensoriais: sistema olfatório, papilas gustativas e sistema vomeronasal (COOPER JR. & BURGHARDT, 1990; POUGH *et al.*, 2003). Embora genericamente répteis apresentem papilas gustativas na boca e na faringe (KARDONG, 2008), a gustação é o sentido químico menos estudado (COOPER JR. & ALBERTS, 1990). Serpentes não apresentam papilas gustativas, o que permite a exclusão da relação entre

o comportamento de dardejar e a gustação (MORGANS & HEIDT, 1978). Papilas gustativas foram encontradas na maioria das famílias de lagartos, principalmente na língua, e parecem ser mais abundantes entre os Iguania (SCHWENK, 1985), mas a gustação não parece ser suficiente para gerar resposta lingual (dardejar) normal em resposta a novos ambientes e itens alimentares (GRAVES & HALPERN, 1990).

Apesar das similaridades entre os sistemas olfatório e vomeronasal, eles funcionam de formas distintas e não apresentam qualquer conexão, levando COOPER e BURGHARDT (1990) a fazer distinções teóricas entre vomerolfação e olfação e entre vomodor e odor. Os circuitos neurais do órgão vomeronasal e do sistema olfatório correm em paralelo (KARDONG, 2008), porém os nervos do sistema olfatório terminam nos bulbos olfatórios primários, ao passo que os do órgão vomeronasal terminam nos bulbos olfatórios acessórios (COOPER JR. & BURGHARDT, 1990). As células sensoriais do órgão vomeronasal projetam-se por meio de microvilosidades e as do sistema olfativo são ciliadas (KARDONG, 2008). O fluxo de ar que se dirige das narinas para os pulmões permite que o epitélio olfativo entre em contato com compostos químicos presentes no ar, já o órgão vomeronasal recebe compostos químicos presentes na língua e na mucosa oral (KARDONG, 2008). Em serpentes e, provavelmente, em lagartos, após o animal retrair a língua, ele não a encaixa diretamente nas aberturas do órgão vomeronasal, mas a esfrega contra as aberturas dos ductos e contra pequenas elevações posteriores ao órgão, direcionando assim os compostos químicos para o interior das cavidades do órgão vomeronasal (KARDONG, 2008).

Embora muitas linhagens de Squamata apresentem um sistema nasal bem desenvolvido, o olfato parece estar restrito a compostos de baixo peso molecular e elevada volatilidade (HALPERN & KUBIE, 1983) e, em muitas espécies, não parece ser crucial durante o forrageamento e na resposta a feromônios (COOPER JR., 1996). A principal hipótese da função do olfato em serpentes e lagartos seria a de detectar compostos voláteis desencadeando o aumento de dardejadas para obtenção de informações mais detalhadas de compostos de elevado peso molecular e menor volatilidade via vomerolfação (COWLES & PHELAN, 1958; DUVALL, 1981; COOPER JR., 1996 e 2007; FONT *et al.*, 2012). O órgão vomeronasal é mais desenvolvido em Squamata do que em qualquer outra linhagem de vertebrados (POUGH *et al.*, 2003; KARDONG, 2008) e por muitos anos foi considerado como uma estrutura especializada

na detecção de feromônios (BAXI *et al.*, 2006), mas dados revelam também o papel essencial da vomerolfação na detecção de pistas químicas de presas (COOPER JR. & ALBERTS, 1990) e de predadores (AMO *et al.*, 2004) que não podem ser consideradas feromônios (WYATT, 2014a).

Os trabalhos sobre interações químicas em Squamata, embora tenham se mostrado cada vez mais frequentes nos últimos anos, correspondem apenas a 1% de toda a produção científica na área de comunicação química (SYMONDS & ELGAR, 2008) e são basicamente de dois tipos (HOUCK, 2009): (1) comportamentais, que buscam validar as fontes de semioquímicos nas espécies e/ou compreender a função das informações químicas dentro de um determinado contexto social e (2) caracterização química das secreções, buscando determinar quais compostos químicos são utilizados como semioquímicos e como variam entre diferentes espécies ou entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Com base nos trabalhos já realizados, sabemos que lagartos possuem diversas fontes de semioquímicos e de potenciais feromônios (MARTÍN & LÓPEZ, 2011) associadas, principalmente, com a epiderme (WELDON *et al.*, 2008). De forma genérica, as fontes de semioquímicos em lagartos podem ser divididas em pele (superfície do corpo), fezes/cloaca e glândulas femorais e pré-anais (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011).

A pele é a fonte de semioquímicos menos estudada em lagartos (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011), ainda mais quando comparada com a quantidade de informações disponíveis para serpentes (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010). A pele de lagartos apresenta compostos lipídicos que são sequestrados de camadas mais internas da epiderme (MARTÍN & LÓPEZ, 2011) e a cromatografia líquida realizada para extratos da epiderme de 23 espécies de lagartos indicaram a presença de diferentes esteroides e ácidos graxos, além de variações interespecíficas na composição (WELDON & BAGNALL, 1987). Embora as informações sejam escassas, demonstram que os lipídios presentes na pele de lagartos apresentam mais funções do que apenas atuar como barreira para a perda de água (ROBERTS & LILLYWHITE, 1980). Em *Eublepharis macularis* (Eublepharidae) cromatografia gasosa com extratos da pele de machos e fêmeas adultos, revelou diferenças intersexuais significativas, principalmente em relação a presença/ausência de alguns esteroides (MASON & GUTZKE, 1990). Ainda no mesmo trabalho, os autores

demonstraram que o comportamento de machos é alterado por características da pele da fêmea; antes e após o período de troca de pele, machos reagem à fêmea realizando *displays* de corte, porém durante o período de troca de pele, reagem de forma agressiva.

As fezes contêm produtos dos sistemas digestivo e urinário e de glândulas cloacais; atuam como fonte de semioquímicos em algumas espécies de lagartos (LÓPEZ *et al.*, 1998; BULL *et al.*, 1999a e b; LABRA *et al.*, 2002; VALDECANTOS *et al.*, 2015) e podem funcionar como sinais visuais (DUVALL *et al.*, 1987; LÓPEZ *et al.*, 1998), assim como ocorre em mamíferos (MARTÍN *et al.*, 2010; LINKLATER *et al.*, 2013). Embora os dados que revelam fezes como fontes de semioquímicos sejam conhecidos há décadas (DUVALL *et al.*, 1987), pouco se sabe sobre o seu papel no comportamento social de lagartos e sobre a sua composição química. Machos jovens de *Iberolacerta monticola* (Lacertidae) são capazes de discriminar entre juvenis, fêmeas adultas e machos adultos apenas com base em informações químicas presentes nas fezes e evitam locais marcados por machos adultos, reduzindo o risco de encontros agonísticos e predação (MOREIRA *et al.*, 2008). Um experimento comportamental, excluindo o caráter visual das pelotas fecais, revelou que machos adultos de *Liolaemus tenuis* (Liolaemidae) utilizam as informações químicas presentes nas fezes para auto-reconhecimento (LABRA *et al.*, 2002). Em *Egernia striolata* (Scincidae) machos adultos são capazes de discriminar suas fezes das de coespecíficos (BULL *et al.*, 1999a) e não há evidência de que diferenças na dieta estejam influenciando nas respostas observadas (BULL *et al.*, 1999b). No trabalho de BULL e colaboradores (1999b) há indícios de que os semioquímicos presentes nas fezes compreendem compostos lipofílicos, uma vez que machos responderam às fezes quando dissolvidas em diclorometano, mas não o fizeram quando as fezes foram apresentadas dissolvidas em água. Há evidências de que machos de *Crotaphytus collaris* (Crotaphytidae), uma espécie de lagarto conhecida por sua acuidade visual, é capaz de detectar e discriminar coespecíficos apenas com base em informações químicas presentes nas fezes (WILGERS & HORNE, 2009).

A principal, e mais bem estudada, fonte de semioquímicos em lagartos são as glândulas femorais e pré-anais (pré-cloacais). Embora as glândulas femorais e/ou pré-anais estejam presentes em muitas famílias de lagartos e tenham sido utilizadas como caráter taxonômico desde Linnaeus, até o começo da década de 1990 pouco se sabia

acerca da sua composição química e do seu significado funcional (COLE, 1966; MADERSON & CHIU, 1970; ALBERTS, 1990; WELDON *et al.*, 1990). São estruturas homólogas, diferem apenas em relação à posição e são formadas por invaginações do extrato germinativo, produzem secreção holócrina, comunicam-se com o meio externo através de poros e sua posição ventral indica deposição passiva da secreção no substrato durante a locomoção (COLE, 1966; ALBERTS, 1990; IMPARATO *et al.*, 2007). Quando presentes, geralmente, machos e fêmeas apresentam poros femorais/pré-anais, porém há espécies nas quais são encontradas apenas nos machos (COLE, 1966). Mesmo em espécies nas quais as glândulas ocorrem em machos e fêmeas, usualmente machos apresentam glândulas mais desenvolvidas e a produção da secreção é estimulada por hormônios andrógenos (COLE, 1966; ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1992a; CHAMUT *et al.*, 2009). Em machos dominantes de *Iguana iguana* (Iguanidae), a atividade secretória (ALBERTS *et al.*, 1992a), assim como a composição da secreção (ALBERTS *et al.*, 1992b) apresentam variação sazonal e estão associadas aos níveis de testosterona no sangue e aumento do diâmetro dos poros. Glândulas femorais de machos de *Ctenophorus ornatus* (Agamidae) atrofiam após a castração dos indivíduos, porém voltam a apresentar atividade quando níveis de testosterona são recuperados de forma artificial (FERGUSSON *et al.*, 1985). Outro aspecto que está associado com o aumento de atividade glandular é o *status* reprodutivo, com aumento de produção da secreção durante a estação reprodutiva (COLE, 1966; ALBERTS, 1990). Este é um aspecto interessante, uma vez que grande parte da base teórica das glândulas femorais e pré-anais foi construída utilizando como modelos espécies de climas mais temperados e que apresentam reprodução sazonal bem marcada. Em *Ameiva ameiva*, um teídeo de ampla distribuição na América do Sul, machos e fêmeas adultos foram acompanhados pelo período de um ano e não foi observada variação significativa no desenvolvimento glandular e no diâmetro dos poros (IMPARATO *et al.*, 2007).

A composição química detalhada da secreção de glândulas femorais e pré-anais já foi estudada para algumas espécies de poucas famílias de lagartos, mas embora esteja claro que é composta por proteínas e lipídios, não se sabe qual composto ou combinação de compostos é mais relevante nas interações químicas entre indivíduos (ESCOBAR *et al.*, 2001). Dados indicam que as proteínas podem corresponder a até 80% do total da secreção (ALBERTS, 1990) e há variação na composição proteica entre indivíduos da mesma espécie e entre espécies (ALBERTS, 1990 e 1991; MANGIACOTTI *et al.*, 2017

e 2019). Em diferentes grupos animais, proteínas e peptídeos foram identificados como semioquímicos importantes em diversos contextos sociais (WYATT, 2014b), porém os estudos que caracterizaram as proteínas presentes nas secreções femorais e pré-anais de lagartos são raros (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Apesar dos trabalhos liderados por ALBERTS indicando variação na composição proteica das secreções e sua utilização em contextos sociais, por quase 30 anos o papel das proteínas foi negligenciado, sendo consideradas matriz não volátil que daria estabilidade para os compostos lipofílicos, considerados até então os verdadeiros semioquímicos (ESCOBAR *et al.*, 2003; MARTÍN & LÓPEZ, 2011; MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Em relação à composição lipofílica, as principais classes de compostos identificadas nas espécies estudadas foram cetonas, amidas, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos e, principalmente, esteroides (WELDON *et al.*, 2008; MASON & PARKER, 2010; MARTÍN & LÓPEZ, 2011) e até o momento não foram identificados indivíduos com padrões idênticos.

Estudos que tiveram início no final dos anos 1980 e que se estendem até os dias de hoje, além de caracterizarem quimicamente as secreções femorais e pré-anais, demonstraram o seu papel nos mais diferentes contextos sociais de lagartos e buscaram compreender quais fatores estão associados às diferenças observadas. Secreções femorais e pré-anais já foram testadas em contextos de marcação de território, escolha de parceiros durante a estação reprodutiva, reconhecimento específico (BARBOSA *et al.*, 2006), auto-reconhecimento, discriminação de indivíduos familiares e não familiares (ARAGÓN *et al.*, 2001; FONT & DESFILIS, 2002), isolamento reprodutivo (GABIROT *et al.*, 2013), identificação de complexos crípticos de espécies (GABIROT *et al.*, 2012; ZOZAYA *et al.*, 2019) e identificação do *status* de saúde e outras características de coespecíficos (CARAZO *et al.*, 2007; HEATHCOTE *et al.*, 2014; GARCÍA-ROA *et al.*, 2017; NISA *et al.*, 2019). Até o momento, diferentes fatores foram identificados influenciando diretamente a composição química das secreções das glândulas femorais e pré-anais, além de diferenças filogenéticas. Em *Podarcis muralis* (Lacertidae) foram encontradas diferenças significativas na composição química da secreção femoral entre machos com diferentes oportunidades de termorregulação e as fêmeas parecem ser capazes de discriminar, apenas com base em informações químicas, os machos com mais oportunidades (HEATHCOTE *et al.*, 2014). Machos de *Iberolacerta cyreni* (GARCÍA-ROA *et al.*, 2017) e de *I. monticola* (MARTÍN & LÓPEZ, 2006a) apresentam composição química diferente quando recebem suplemento de

vitaminas e as fêmeas, não apenas são capazes de discriminar entre secreções com diferentes quantidades de vitaminas, como demonstram maior interesse pela secreção de machos que receberam suplemento. BAECKENS e colaboradores (2017) comparando a composição química da secreção de dezenas de espécies de Lacertidae, encontraram correlações entre variáveis climáticas e composição química, com espécies de climas mais méxicos (mais úmidos e frios) apresentando maiores quantidades de aldeídos e álcoois de baixo peso molecular (mais voláteis) e espécies de climas mais xéricos (mais quentes e secos) apresentando maiores quantidades de ésteres de ácidos graxos e álcoois de elevado peso molecular (menos voláteis e mais estáveis).

É inegável o aumento da literatura sobre o papel das secreções femorais e pré-anais em aspectos da história de vida de lagartos, assim como a respeito de sua composição química, porém a extensa maioria dos trabalhos foi realizada para espécies do hemisfério norte, principalmente, entre representantes da família Lacertidae. Até onde sabemos, para a América do Sul há dados sobre a composição química das secreções femorais apenas para algumas poucas espécies de *Liolaemus* (LABRA *et al.*, 2001; ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003) e para *Salvator merianae* (Teiidae) (MARTÍN *et al.*, 2011). Atualmente no Brasil são encontradas 287 espécies de lagartos (UETZ *et al.*, 2019) e *S. merianae* é a única espécie que ocorre no país para a qual temos informações da composição química das secreções (MARTÍN *et al.*, 2011). Enquanto os dados de composição química são obtidos de animais de vida livre coletados durante a estação reprodutiva, as informações de *S. merianae* foram obtidas de machos adultos e reprodutivos mantidos em um cativeiro na Argentina e apresentaram um padrão único e discrepante do observado para todos os lagartos até então estudados, não apresentando colesterol (composto mais abundante na extensa maioria das espécie estudadas) e apresentando quantidades elevadas de ácidos graxos (MARTÍN *et al.*, 2011).

Os Teiidae são lagartos do Novo Mundo de tamanho corporal médio a grande, são diurnos e apresentam hábitos que variam entre o terrestre, arbórea e semi-aquático, são ovíparos e os hábitos alimentares são bastante variados (PIANKA & VITT, 2003). Das 161 espécies da família, 42 ocorrem no território brasileiro (UETZ *et al.*, 2019). Três extensos trabalhos buscaram compreender as relações filogenéticas existentes entre gêneros e espécies de Teiidae. Nem o trabalho de HARVEY e colaboradores (2012) com base em 137 caracteres morfológicos, nem os extensos

trabalhos moleculares de PYRON e colaboradores (2013) e GOICOECHEA e colaboradores (2016) foram capazes de solucionar todas as relações à nível genérico dentro da família, indicando a necessidade de novas fontes de informação. Algumas linhagens de Teiidae, principalmente os Teiinae, têm taxonomia bastante complexa, ocorrência de espécies híbridas e partenogenéticas e muitas espécies só muito recentemente foram nomeadas (PIANKA & VITT, 2003; GIUGLIANO *et al.*, 2007; ARIAS *et al.*, 2011; HARVEY *et al.*, 2012; ARIAS *et al.*, 2014). Os Teiidae, além da proximidade filogenética, são considerados equivalentes ecológicos dos Lacertidae (PIANKA & VITT, 2003), a família mais bem estudada do ponto de vista das interações químicas.

Face à necessidade de se conhecer a secreção de glândulas femorais e pré-anais em diferentes espécies de lagartos e à ausência de dados para espécies da América do Sul, procuramos investigar a composição química das secreções de espécies brasileiras de lagartos. Os Teiidae foram escolhidos como modelo por sua ampla diversidade e distribuição e por sua taxonomia complexa que se beneficiaria de novas fontes de informação, além de serem equivalentes ecológicos de Lacertidae e por abrigarem a única espécie que ocorre no Brasil para a qual se tem informações da composição lipídica das secreções. O objetivo geral deste trabalho é caracterizar e comparar a composição química de secreções de glândulas femorais e pré-anais de representantes de gêneros de Teiidae que ocorrem no Brasil, e assim (1) identificar os possíveis compostos químicos que sejam exclusivos de espécies e/ou de sexo e (2) comparar os compostos químicos obtidos em Teiidae com suas funções químicas apresentadas na literatura específica, (3) contribuindo para uma melhor compreensão da evolução da composição química das secreções entre os gêneros de lagartos da família.

Metodologia geral

Protocolo de remoção das secreções

A remoção da secreção das glândulas femorais e pré-anais é bastante simples uma vez que a secreção se apresenta como um cilindro (plugue) sólido que alcança o meio externo através de poros (COLE, 1966; ALBERTS, 1990) (**Figura 1**) e o mesmo protocolo vem sendo utilizado desde os trabalhos realizados na década de 1990. A

remoção da secreção costuma ser realizada em animais vivos e não gera danos físicos, permitindo que os indivíduos sejam liberados após o procedimento. Durante o desenvolvimento deste trabalho validamos a possibilidade de se obter material de indivíduos recém sacrificados com injeção de anestésico, que foram coletados durante viagens de campo realizadas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IBUSP) e que estavam sendo preparados para coleções zoológicas. Os dados obtidos destes indivíduos não apresentaram diferenças marcantes dos dados obtidos de outros indivíduos da mesma espécie que não foram sacrificados previamente à remoção da secreção. Ao se realizar a remoção da secreção de indivíduos recém sacrificados, deve-se apenas tomar cuidado para que não haja contato do anestésico com o cilindro de secreção, porém mesmo que ocorra contaminação, a lidocaína pode ser facilmente identificada no cromatogramas e retirada das análises.

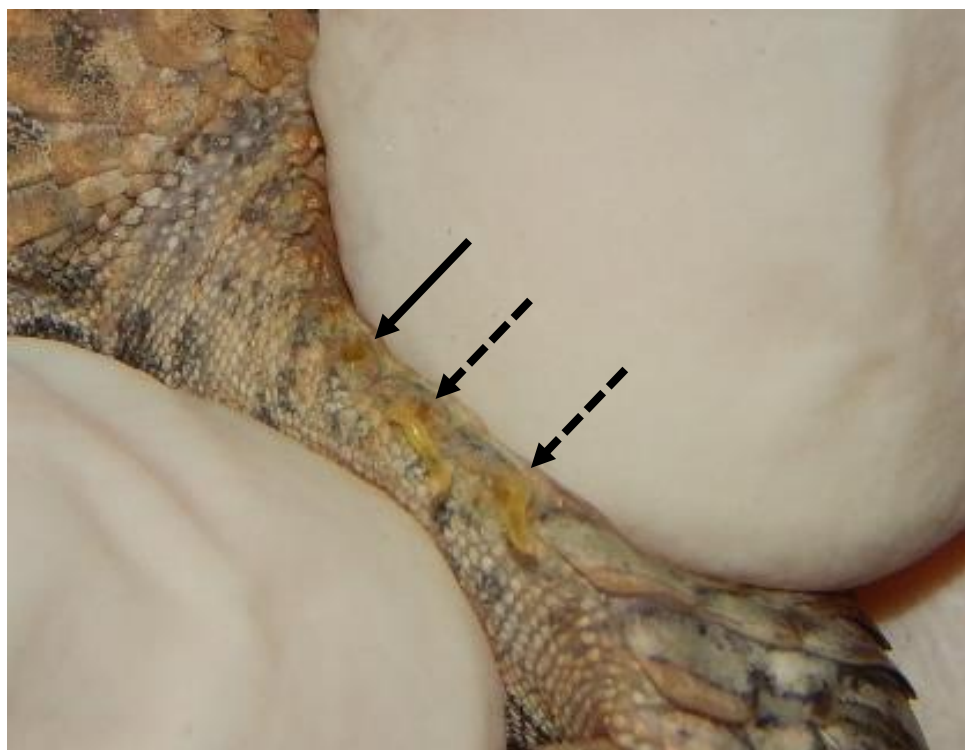


Figura 1. Região femoral do membro posterior esquerdo de um macho adulto de *Ameivula pyrrhogularis*. A ponta da seta sólida indica a escama que contém o poro femoral pelo qual a secreção alcança o meio externo. As duas setas pontilhadas indicam o cilindro de secreção após se pressionar ao redor dos poros femorais.

A secreção foi removida pressionando ao redor dos poros com auxílio de uma pinça metálica limpa para evitar contaminação das amostras (ESCOBAR *et al.*, 2001;

MARTÍN & LÓPEZ, 2006a). Para evitar contaminação cruzada entre amostras de diferentes indivíduos, a pinça foi limpa (com formol 10% e álcool 100%) entre a obtenção da secreção de dois indivíduos diferentes e para evitar a contaminação por meio de compostos naturalmente presentes na pele humana o procedimento foi realizado com luvas. Plugues de um mesmo indivíduo foram armazenados em um mesmo microtubo específico para cromatografia gasosa (microtubo de vidro com tampa de teflon) e as amostras permaneceram em freezer a -20°C sem aplicação de solvente até o início das análises químicas.

Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Até 2017, com a publicação do trabalho de MANGIACOTTI e colaboradores, não havia na literatura uma metodologia clara e atual para a extração das proteínas das secreções de glândulas femorais e pré-anais de lagartos. O protocolo apresentado a seguir foi desenvolvido em 2015 com base no apresentado por ALBERTS (1990) e posteriormente comparado com o desenvolvido por de MANGIACOTTI e colaboradores (2017), do qual difere apenas em pequenos detalhes relacionados à rotina de laboratório.

As secreções femorais/pré-anais foram trituradas em 200 µL de acetonitrila 80% ácido trifluoracético 0,05% (ACN 80% TFA 0,05%) para extração ácida das proteínas. Após a trituração, as amostras permaneceram *overnight* no solvente a -20°C, que foi removido por centrifugação a vácuo (*Speed-Vac Savant*) para obtenção apenas da porção proteica. Os *pellets* proteicos foram dissolvidos em água ultrapura e o volume utilizado variou entre 50 µL e 500 µL, garantindo completa homogeneização da porção proteica. As amostras foram agitadas em vórtex por dois minutos e centrifugadas por cinco minutos a 20 mil xG. Após este procedimento, 1 µL de cada amostra foi analisado utilizando-se o equipamento *NanoDrop* (leitura em A205) para quantificação da concentração de proteína total e cálculo do volume necessário para obtenção de 50 µg de proteína (ALBERTS, 1990) em cada poço do gel. Antes da aplicação no gel, as amostras foram aquecidas a 90°C por cinco minutos em solução tampão (*sample-buffer*: 250 mM Tris-HCL pH 6,8; 300mM SDS; 1mM azul de bromofenol; 40% glicerol, 8% betamercaptoetanol) para linearização das proteínas.

Para a observação do padrão e concentração relativa de bandas proteicas, assim como para o cálculo do peso molecular de cada componente, foram realizadas corridas com géis de poliacrilamida SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) (LAEMMLI, 1970). As corridas foram realizadas em modo descontínuo com gel de empilhamento na concentração de 4,5% de poliacrilamida e o gel de corrida na concentração de 15%. Para a separação das amostras a fonte KASVI foi utilizada com voltagem fixa em 120 V por duas horas e com corrente crescente até 700 mA. Para a visualização das bandas, foi utilizado o corante *Comassie Blue* (45% metanol, 10% ácido acético, 3 mM *comassie brilliant blue R-250*), caso as bandas não fossem visualizadas era realizada uma segunda coloração com nitrato de prata (BASSAM *et al.*, 1991).

Os géis corados foram fotografados e para cada corrida foram obtidas as seguintes informações utilizando o programa PyElph (PAVEL & VASILE, 2012): (1) o peso molecular aproximado de cada banda, estimado através da migração das bandas presentes no marcador de peso molecular e (2) uma matriz com dados de presença/ausência de cada banda em cada amostra para avaliar o grau de similaridade entre diferentes amostras através da análise UPGMA (do inglês, *unweighted pair group method with arithmetic mean*). Devido à impossibilidade de identificação das proteínas, pela ausência de informações em bancos de dados, as bandas foram comparadas apenas pelo peso molecular (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Os padrões de bandas proteicas de cada espécie foram comparados de forma qualitativa com base na presença/ausência de bandas proteicas e nas diferenças de intensidade de cada uma dessas bandas, uma vez que foram aplicadas as mesmas quantidades de proteína total, variações na intensidade das bandas representam maior/menor quantidade de material na mesma.

Cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS)

Os plugues de cada indivíduo foram triturados em 150 µL de diclorometano (DCM) ou hexano, o que não inviabiliza a comparação dos resultados, pois os dois solventes têm características químicas similares para solubilizar compostos lipofílicos e são utilizados nos diferentes trabalhos publicados sobre o tema (KHANNOON *et al.*, 2011a; MARTÍN *et al.*, 2011). A escolha da metodologia para preparação das amostras e programação da CG-MS foi realizada com base no trabalho sobre a composição

química da secreção de *S. merianae*, único Teiidae para o qual se tem informações da composição lipídica das secreções (MARTÍN *et al.*, 2011). As secreções de Teiidae parecem bastante cerosas (IMPARATO *et al.*, 2007; CHAMUT *et al.*, 2009; MARTÍN *et al.*, 2011) e obtivemos melhores resultados para aquelas amostras que eram ativamente trituradas no solvente.

A solução (solvente + plugues triturados) foi agitada em vórtex por 30 minutos para completa homogeneização seguida por centrifugação de 5 minutos a 20 mil xG. Alíquotas de 2 µL de cada amostra foram injetadas no modo *splitless* utilizando hélio como gás portador a 30 cm/s, com temperatura de injeção de 280 °C. A rampa de temperatura utilizada foi a seguinte: 50 °C durante 5 minutos, depois ampliada para 300 °C a uma taxa de 5 °C/min e, finalmente, uma isotérmica de 315 °C por 10 minutos. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (70 eV) a 250 °C. Parte das amostras foi analisada na Espanha durante estágio no exterior financiado pela FAPESP e parte foi analisada na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Embora os equipamentos sejam de marcas diferentes, as colunas utilizadas foram equivalentes (composição da coluna: 5% fenil, 95% polidimetilsiloxano, 0,25x0,25), permitindo que os dados sejam analisados de forma conjunta e comparativa. O mesmo procedimento foi realizado apenas com solvente para identificação de potenciais contaminantes dos solventes e/ou microtubos.

A análise dos cromatogramas foi realizada no programa *GCMS Postrun Analysis* da GCMS Solutions®. Os picos, que representam os compostos lipofílicos, foram integrados manualmente, os compostos foram identificados com base na biblioteca *NIST14*, conferindo os respectivos espectros de massas e tempos de retenção (TR), as quantificações foram realizadas automaticamente pelo programa e representam a porcentagem relativa de cada composto em relação a corrente total de íons (TIC, do inglês *total ion current*). Só foram incluídos os compostos químicos identificados, pelo menos, ao nível de classe (aldeído, esteroide, cetona etc.).

Em todos os capítulos as comparações do padrão de compostos lipofílicos receberam o mesmo tratamento. Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa sobre presença/ausência de compostos em cada grupo analisado. Previamente às comparações estatísticas, para correção do problema de não-independência das porcentagens relativas à corrente total de íons (TIC), foi aplicada a seguinte relação: logaritmo natural

da porcentagem do composto/1 – porcentagem do composto (AEBISCHER *et al.*, 1993). Para explorar potenciais diferenças com base em todos os compostos lipofílicos identificados, foram realizadas análises multivariadas de variância permutacional (PERMANOVA) baseadas nas matrizes de distâncias euclidianas com 999 permutações (ANDERSON, 2001) e uma análise canônica de coordenadas principais (CAP, do inglês *canonical analysis of principal coordinates*) (ANDERSON & WILLIS, 2003).

Após essa exploração inicial, foram selecionados os compostos lipofílicos compartilhados por, pelo menos, três indivíduos de cada grupo a ser comparado. Essa seleção foi realizada visando testar diferenças nas porcentagens apenas dos compostos identificados no maior número de indivíduos porque (1) diferenças entre compostos exclusivos foram avaliadas de forma qualitativa, (2) compostos presentes em poucos indivíduos mostram grande variação interindividual, (3) buscamos por diferenças/similaridades nas porcentagens dos compostos lipofílicos que podem ser encontrados no maior número possível de indivíduos e (4) amostras com tamanho inferior à três não apresentam média e variação que possam ser testadas com análises estatísticas (ZAR, 2010). As porcentagens corrigidas de cada composto químico selecionado foram testadas para normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Levene) (ZAR, 2010). Para avaliar a ocorrência de diferenças nas porcentagens relativas de cada composto (GABIROT *et al.*, 2010), assim como entre classes de compostos, foi realizada a análise univariada de variâncias (ANOVA) seguida do teste *post-hoc* de Tukey quando mais de dois grupos estavam sendo comparados (ZAR, 2010). Compostos que não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias homogêneas foram comparados por Mann-Whitney, equivalente não paramétrico da ANOVA (ZAR, 2010). As porcentagens corrigidas foram utilizadas como variáveis em uma análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*), extraindo sempre o número mínimo de componentes principais responsáveis por aproximadamente 80% da variação entre as espécies (GABIROT *et al.*, 2010 e 2012; ZOZAYA *et al.*, 2019). Uma análise discriminante foi utilizada para avaliar se os compostos selecionados são úteis para predizer a origem da secreção (GABIROT *et al.*, 2010). As análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) e no *Paleontological Statistics* (PAST).

Discussão Geral e Conclusões

No total, analisamos secreções femorais e pré-anais de três espécies de Tupinambinae (*Tupinambis teguixin*, *Salvator merianae* e *Crocodilurus amazonicus*), oito espécies de Teiinae (*Ameiva ameiva*, *Ameivula pyrrhogularis*, *Ameivula sp. nov. 1*, *Ameivula sp. nov. 2*, *Kentropyx pelviceps*, *K. calcarata*, *K. altamazonica* e *Cnemidophorus lemniscatus*) e seis espécies de Gymnophthalmidae (*Riolama sp. nov.*, *Iphisa elegans*, *Neusticurus medemi*, *Leposoma puk*, *L. scincoides* e *Loxopholis snethlageae*).

Com exceção de *Ameivula sp. nov. 1* e *C. lemniscatus*, analisamos a composição química da secreção femoral de fêmeas de todas as espécies de Teiidae citadas no parágrafo anterior que somaram 153 compostos lipídicos. O número de compostos identificados por fêmea variou entre nove (*C. amazonicus*) e 50 (*K. pelviceps*). As três espécies de Tupinambinae somaram 52 compostos e apenas 6% foram compartilhados por *C. amazonicus*, *T. teguixin* e *S. merianae*. Quando comparamos apenas as fêmeas de *S. merianae* e *T. teguixin*, gêneros irmãos (HARVEY *et al.*, 2012; GOICOECHEA *et al.*, 2016), 37% dos compostos foram compartilhados. Entre os Teiinae, foram identificados 142 compostos lipídicos e 11% foram compartilhados por todas as espécies. Fêmeas das três espécies de *Kentropyx* somaram 115 compostos, sendo 28% dos compostos. *K. calcarata* compartilhou 48% do total de compostos com a espécie irmã *K. pelviceps* (GOICOECHEA *et al.*, 2016) e 28% com *K. altamazonica*. *Kentropyx pelviceps* e *K. altamazonica* compartilham 37% do total de compostos identificados no gênero. *Ameivula pyrrhogularis* e *A. ameiva* compartilharam 34% dos 67 compostos identificados nas duas espécies. Em *A. pyrrhogularis* e *Kentropyx*, 16% dos 129 compostos identificados foram compartilhados. *Kentropyx* e *A. ameiva* somaram 131 compostos e compartilham 27% desse total.

Sobre as glândulas femorais de fêmeas de Teiidae sabemos apenas que em *A. ameiva* não há dimorfismo sexual no diâmetro e número dos poros (IMPARATO *et al.*, 2007) e que, em cativeiro, fêmeas de *S. merianae* não apresentam cilindros de secreção (CHAMUT *et al.*, 2009). Nossos resultados demonstram que é possível extrair secreção de fêmeas de Teiidae e que elas apresentam uma composição complexa de compostos lipídicos que podem ser importantes em contextos sociais, convergindo com hipóteses formuladas a partir da observação de casos de necrofilia em *S. merianae* e *A. ameiva*

(COSTA *et al.*, 2010; SAZIMA, 2015). Os trabalhos que caracterizaram quimicamente as secreções femorais de fêmeas são escassos (GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b) e apresentam apenas seu perfil químico e diferenças com o perfil dos machos (LÓPEZ & MARTÍN, 2005b; KHANNOON *et al.*, 2011a; GARCÍA-ROA *et al.*, 2016b; MARTÍN *et al.*, 2016b). Não há na literatura um estudo comparativo avaliando o potencial da composição das secreções femorais de fêmeas na identificação de espécies. De forma qualitativa, notamos que a similaridade entre as espécies nos permite uma distinção entre Tupinambinae e Teiinae, embora seja pouco eficiente para entender as relações entre os gêneros de cada subfamília. Para as espécies de *Kentropyx*, as duas espécies irmãs compartilham entre si maior porcentagem de compostos do que compartilham com *K. altamazonica* (GOICOEHEA *et al.*, 2016), embora o perfil completo não tenha apresentado diferenças estatísticas (CAPÍTULO 4). Ainda comparando com a filogenia (GOICOEHEA *et al.*, 2016), seria esperado que *Ameivula* compartilhasse maior similaridade com *Kentropyx* do que com *Ameiva*, porém isso não foi observado.

Com exceção de uma fêmea de *K. pelviceps*, todas as fêmeas apresentaram colesterol em suas secreções femorais (TIC entre 1,28% e 65,14%), nove fêmeas apresentaram grandes quantidades de compostos odoríferos (ácidos graxos e/ou ésteres) (BAECKENS *et al.*, 2017) e muitas fêmeas apresentaram significativas quantidades de campesterol e de cholest-4-en-3-one. Ao longo dos capítulos discutimos sobre a influência do *status* reprodutivo na composição lipídica das secreções femorais de fêmeas e comparando todas as espécies, confirmamos a tendência observada previamente de que fêmeas com ovos ou evidência de desova recente apresentam maiores quantidades de compostos odoríferos e fêmeas com folículos vitelogênicos apresentam maiores quantidades de esteroides, incluindo o cholest-4-en-3-one, que pode estar associado com a redução de corpos adiposos (SUZUKI *et al.*, 1998). Neste trabalho mostramos que fêmeas de Teiidae produzem secreção femoral e que apresentam diferenças que podem ser importantes tanto do ponto de vista da compreensão das relações filogenéticas, quanto de interações sociais (como, por exemplo, indicar para os machos seu *status* reprodutivo). Um último aspecto das fêmeas de Teiidae, que converge com o observado em muitos lagartos (COLE, 1966; ALBERTS, 1990), é a menor quantidade de secreção obtida quando comparada aos machos. A baixa quantidade de material, dificultou as metodologias de extração, interferindo diretamente na qualidade dos resultados obtidos e no número de amostras

a serem comparadas. O aumento da amostragem de fêmeas nos permitirá compreender como o *status* reprodutivo pode estar de fato interferindo na composição lipídica de diferentes espécies e em quais contextos sociais as secreções femorais de fêmeas são importantes.

Ao contrário do observado para as fêmeas, há uma série de informações na literatura sobre a composição química das secreções femorais de machos. Conhecemos a composição lipídica de diversas espécies de Lacertidae (LÓPEZ & MARTÍN, 2005b; GABIROT *et al.*, 2008; WELDON *et al.*, 2008; GABIROT *et al.*, 2010 e 2012; BAECKENS *et al.*, 2017) e algumas espécies de outras famílias (ALBERTS *et al.*, 1992b; ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003; LOUW *et al.*, 2007; KHANNOON, 2012; MARTÍN *et al.*, 2016b; ZOZAYA *et al.*, 2019). Alguns estudos demonstraram fatores que influenciam a composição química das secreções, seu papel no isolamento reprodutivo e na identificação de complexos crípticos de espécies e sua função em diferentes contextos sociais. Antes da realização deste trabalho, *S. merianae* era a única espécie de Teiidae, e de ocorrência no Brasil, para qual existiam informações sobre a composição lipídica da secreção femoral (MARTÍN *et al.*, 2011). Apresentamos informações inéditas para machos de dez espécies de Teiidae. Nos capítulos anteriores apresentamos resultados que mostram a influência das condições ambientais na composição lipofílica da secreção femoral de indivíduos de *A. ameiva* provenientes da Caatinga e da Amazônia, de diferenças de dieta e *status* reprodutivo em *S. merianae*, comparando o perfil químico de animais de vida livre com os de cativeiro de MARTÍN e colaboradores (2011) e o potencial informativo das secreções femorais na compreensão de complexos crípticos de espécies de *Ameivula*. Discutimos ainda potenciais funções de alguns dos compostos lipídicos identificados nos machos de Teiidae, indicando aspectos interessantes que podem guiar experimentos comportamentais futuros.

Todos os 90 machos, representando 10 espécies de Teiidae, apresentaram colesterol em sua secreção femoral, que variou entre 1,54% (*Ameivula sp. nov. 1*) e 48,64% (*T. teguixin*). Esse resultado revela que a ausência de colesterol em machos de cativeiro de *S. merianae* não é um evento natural entre os Teiidae. ESCOBAR e colaboradores (2003) apresentaram a hipótese de que o colesterol age como matriz não reativa para os verdadeiros semioquímicos, sendo encontrado em maiores quantidades em populações submetidas a temperaturas mais elevadas. Nossas amostras são

provenientes, principalmente, da Amazônia e da Caatinga, dois domínios morfoclimáticos que apresentam elevada temperatura, porém que diferem em termos de umidade (CAPÍTULO 1). A quantidade de colesterol obtido nas amostras dos dois domínios, excluindo as espécies como fator, não revelou diferenças estatísticas entre eles (Kruskal-Wallis: $p = 0,9$). Também não foram observadas diferenças na quantidade de colesterol entre as espécies (Kruskal-Wallis: $p = 0,08$) e em nenhuma espécie observamos forte correlação entre a porcentagem de colesterol e o tamanho corporal. É pouco provável que em Teiidae o colesterol esteja funcionando apenas como matriz não reativa, ainda mais quando levamos em consideração que *A. ameiva* e *S. merianae* apresentam uma camada epitelial ao redor dos cilindros de secreção que conferem maior estabilidade aos semioquímicos (IMPARATO *et al.*, 2007; CHAMUT *et al.*, 2009), mas estudos comportamentais, assim como a caracterização química da secreção de machos subadultos, são necessários para elucidar qual o papel funcional desses esteroides em Teiidae.

Como era esperado, com base nos dados disponíveis para *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), foram encontradas significativas quantidades de ácidos graxos de 16 e 18 carbonos em machos de Teiidae. O ácido esteárico, responsável por mais de 55% da secreção femoral de machos de *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), representou menos de 24% nas demais espécies de Teiidae, sendo observado em quantidades tão elevadas (59%) apenas em machos de *S. merianae* de vida livre. O ácido oleico, que não foi previamente identificado em *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), foi identificado em pequenas porcentagens em machos de vida livre da espécie (TIC < 3%), mas chegou a representar 42% da secreção de um macho de *A. ameiva*. O ácido linoleico, que representa mais de 20% da secreção de *S. merianae* em cativeiro (MARTÍN *et al.*, 2011), foi o ácido menos abundante nos Teiidae estudados neste trabalho, com exceção dos machos de *A. ameiva* da Caatinga. O ácido palmítico, que representou cerca de 7% da secreção de *S. merianae* (MARTÍN *et al.*, 2011), foi o ácido graxo mais abundante em muitas amostras das três espécies de *Ameivula*. As potenciais funções desses ácidos em cada uma das espécies foram discutidas em detalhes nos capítulos anteriores, assim como este padrão não ser comum entre lagartos. É curioso que o macho de *T. teguixin*, os dois machos *C. lemniscatus* e alguns machos de cada uma das outras espécies, não apresentaram esses quatro ácidos em sua secreção femoral, ou o apresentaram em porcentagens muito baixas. Os trabalhos de caracterização química de machos

utilizaram espécies com ciclo reprodutivo conhecido e obtiveram as secreções durante a estação reprodutiva, especialmente no seu início. Para as dez espécies de Teiidae aqui estudadas, há pouca informação sobre aspectos ecológicos, porém as informações disponíveis indicam que a maioria dos Teiidae brasileiros apresentam reprodução prolongada ou, até mesmo, contínua (VITT, 1982; COLLI, 1991; VITT & COLLI, 1994; PIANKA & VITT, 2003; IMPARATO *et al.*, 2007; ROCHA, 2008). Isso possibilita que em uma mesma localidade e na mesma semana podemos encontrar indivíduos em diferentes momentos do estado reprodutivo. Levando em consideração que os ácidos graxos são compostos odoríferos e que aumentam a volatilidade das marcações químicas, aumentando assim seu alcance (ALBERTS, 1992; BAECKENS *et al.*, 2017), é possível que a quantidade de ácidos graxos em machos de Teiidae estejam relacionadas com diferentes momentos de seus respectivos ciclos reprodutivos, que apresenta variação entre indivíduos da mesma espécie.

Foram identificados 176 compostos lipídicos em machos das 10 espécies de Teiidae, apenas três compostos foram identificados em todas as espécies e oito em todos os gêneros. Sessenta e sete compostos (38%) foram identificados em, pelo menos, uma espécie de cada subfamília. As duas espécies de Tupinambinae somaram 74 compostos lipídicos e apenas 10 (13,5%) foram identificados em *S. merianae* e *T. teguixin*. Em Teiinae foram identificados 168 compostos e apenas 19 (11,5%) foram identificados em *Kentropyx*, *Ameivula*, *Ameiva* e *Cnemidophorus*. O baixo número de compostos compartilhados entre ou dentro de cada subfamília deve-se ao fato de que o macho de *T. teguixin* e os dois machos de *C. lemniscatus* apresentaram baixo número de compostos identificados. Excluindo *C. lemniscatus*, os Teiinae somaram 166 compostos, sendo 49 (29,5%) compartilhados por *Kentropyx*, *Ameiva* e *Ameivula*. *Kentropyx* e *Ameivula* somaram 143 compostos e compartilharam 61 (43%) e *Kentropyx* e *Ameiva* somaram 127 compostos e compartilharam 59 (46,5%). *Ameivula* e *Ameiva* somaram 148 compostos e compartilharam 61 (41%). As espécies de *Ameivula* somaram 113 compostos, sendo 44 (39%) compartilhados pelas três. *Ameivula sp. nov. 1* compartilhou 57 (50,5%) compostos com *Ameivula sp. nov. 2* e 56 (49,5%) com *A. pyrrhogularis*. *Ameivula sp. nov. 2* e *A. pyrrhogularis* compartilharam 44 (44%). Avaliando a similaridade (presença/ausência) dos compostos lipídicos entre as espécies através da UPGMA observamos que *A. ameiva* é a espécie que apresenta maior diferença em relação as demais e que as outras nove espécies apresentam uma

divisão entre Amazônia e Caatinga. O fenograma resultante não apresentou quaisquer semelhanças com as relações de parentesco das espécies (GOICOECHEA *et al.*, 2016).

Essa comparação revela aspectos interessantes das secreções femorais de machos de Teiidae. Quando em presença dos *A. ameiva* da Caatinga, *A. pyrrhogularis* apresenta maior similaridade com *Ameivula sp. nov. 1*, mesma relação indicada pelos dados moleculares (RECODER e ARIAS em comunicação pessoal), porém quando os *A. ameiva* são tratados como um único grupo, *A. pyrrhogularis* apresenta maior similaridade com *Ameivula sp. nov. 2*. Para *A. ameiva* essa distância entre os machos da Caatinga e da Amazônia, quando em presença de outras espécies de Teiidae, reforça ainda mais as diferenças consequentes das condições climáticas (CAPÍTULO 1). Mesmo em presença das outras espécies, *Ameivula* apresenta-se como um agrupamento coeso. As incongruências nos dois fenogramas representam mais uma evidência da complexidade das relações interespecíficas de *Ameivula* (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A divisão entre espécies da Caatinga (mais *S. merianae*) e da Amazônia, indica que as condições ambientais podem ter de fato grande influência na composição química das secreções femorais de Teiidae, assim como acontece com outras espécies de lagartos (ESCOBAR *et al.*, 2001 e 2003; BAECKENS *et al.*, 2017). É interessante ressaltar que o fenograma mostrou maior similaridade entre *K. calcarata*, *T. teguixin* e *C. lemniscatus*, que foram as amostras que apresentaram menor número de compostos identificados. Essa proximidade é, provavelmente, reflexo da quantidade de amostra e da qualidade das análises de CG-MS, do que de características reais de suas secreções.

Nosso conhecimento sobre as proteínas nas secreções femorais de lagartos ainda é pequeno (MANGIACOTTI *et al.*, 2017) e as comparações de perfis proteicos são realizadas seguindo o princípio de que duas bandas de mesmo tamanho correspondem ao mesmo componente proteico (ALBERTS, 1991). *Ameiva ameiva*, *S. merianae*, três espécies de *Ameivula*, três de *Kentropyx*, *C. lemniscatus*, *T. teguixin* e *Aspidoscelis tigris* (ALBERTS, 1991) somam 34 bandas entre 6 e 59 KDa e grande diversidade de componentes proteicos com menos de 17 KDa. Comparando a matriz de similaridade dos componentes proteicos com a relação filogenética entre essas espécies (GOICOECHEA *et al.*, 2016), não foi possível identificar componentes proteicos que sejam exclusivos de agrupamentos supra genéricos. Análises UPGMA, realizadas com todos os indivíduos ou apenas com os machos, não recuperaram agrupamentos

convergentes com a filogenia molecular (GOICOECHEA *et al.*, 2016). Quando realizada a UPGMA excluindo as duas espécies de Tupinambinae e as três espécies de *Kentropyx*, o fenograma obtido é similar à filogenia apresentando a seguinte relação de similaridade entre os gêneros (*Ameiva ameiva* (*Aspidoscelis* (*Cnemidophorus* + *Ameivula*))), sendo que os indivíduos de *A. ameiva* da Caatinga apresentaram maior similaridade com os demais gêneros do que os indivíduos da Amazônia.

Em *Podarcis muralis* (Lacertidae) não foram observadas bandas entre 24 e 32 KDa, que são bem representadas nos Iguanidae, levando os autores a interpretarem esse fato como consequência da distância filogenética entre as duas famílias (MANGIACOTTI *et al.*, 2017). Os Teiidae são filogeneticamente próximos aos Lacertidae, mas distantes dos Iguanidae (PYRON *et al.*, 2013) e, com exceção de *Tupinambis teguixin*, todas as espécies de Teiidae apresentaram bandas dentro deste intervalo, incluindo uma banda de 20 KDa que foi identificada em todos os gêneros de Teiinae. Nossos resultados, quando confrontados com as informações anteriores, demonstram a importância de se ampliar a diversidade de espécies analisadas para que possamos compreender as verdadeiras diferenças nos componentes proteicos de grandes agrupamentos filogenéticos. Proteínas nas secreções femorais podem apresentar significativa variação entre indivíduos (ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1993), populações (MANGIACOTTI *et al.*, 2017) e morfotipos (MANGIACOTTI *et al.*, 2019), mas são constantes ao longo do ano (ALBERTS *et al.*, 1993). Assim como para todas as espécies já estudadas, em Teiidae não identificamos dois indivíduos com perfis proteicos idênticos, suportando a hipótese de cada indivíduo tem seu próprio perfil que pode ser utilizado no reconhecimento individual (ALBERTS, 1990). Lagartos poderiam obter informações mais genéricas de compostos lipofílicos e posteriormente obter informações mais detalhadas acerca de identidade do emissor (ALBERTS *et al.*, 1992a), que são mais estáveis e permanecem mais tempo no meio (WYATT, 2014b). Um aspecto técnico da análise da composição proteica refere-se às bandas com menos de 14 KDa, que apresentam grande diversidade nos Iguanidae e nos Teiidae. Bandas abaixo desse valor foram excluídas dos resultados de *P. muralis* por poderem apresentar contaminantes lipídicos (MANGIACOTTI *et al.*, 2017), mas foram apontadas como particularmente importantes para o reconhecimento individual de Iguanidae (ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1993). Uma nova análise UPGMA realizada

removendo os componentes abaixo dos 14 KDa não apresentou diferenças significativas com as realizadas com a totalidade dos componentes proteicos de Teiidae.

Antes da realização deste trabalho, informações sobre a composição proteica de secreções femorais de espécies de Teiidae eram conhecidas para apenas dois machos de *Aspidoscelis tigris* (ALBERTS, 1990; ALBERTS *et al.*, 1993). Nossos resultados fornecem as primeiras informações comparativas para os componentes proteicos das secreções de Teiidae e demonstram que as espécies da família apresentam grau de variabilidade compatível com a utilização dessas informações para o reconhecimento individual. Embora as análises UPGMA não tenham recuperado as relações filogenéticas entre as duas subfamílias de Teiidae, mostram-se mais efetivas quando comparamos agrupamentos mais inclusivos. É importante ressaltar que as comparações realizadas apenas com base no peso molecular de cada componente proteico apresenta significativas limitações e podem estar mascarando diferenças e forçando similaridades. Para compreendermos o papel funcional das proteínas nas secreções de lagartos, assim como suas relações filogenéticas, precisamos dar início à realização de experimentos comportamentais isolando esses componentes e ampliar o número de espécies de diferentes famílias analisadas.

As relações de parentesco entre Gymnophthalmidae e Teiidae são reconhecidas há décadas (ESTES *et al.*, 1988; PYRON *et al.*, 2013; GOICOECHEA *et al.*, 2016). As seis espécies de Gymnophthalmidae somaram 102 compostos lipídicos, mas para as comparações com Teiidae, optamos por excluir as amostras de *Loxopholis snethlageae*, por terem apresentado número muito baixo de compostos, totalizando assim 98 compostos na família. As duas famílias somaram 205 compostos lipídicos, 106 compostos (52%), principalmente odoríferos como, por exemplo, ácidos graxos, ésteres e aldeídos (BAECKENS *et al.*, 2017), foram identificados exclusivamente em espécies de Teiidae. Vinte e oito compostos (14%) foram identificados apenas em Gymnophthalmidae e correspondem basicamente a esteroides. O fenograma gerado pela UPGMA não convergiu com as relações filogenéticas entre os gêneros das duas famílias. Os Gymnophthalmidae aparecem incluídos no agrupamento dos Teiidae da Amazônia e compartilham maior similaridade com as amostras de Teiidae com menor número de compostos identificados (*C. lemniscatus*, *T. teguixin* e *K. calcarata*). Esses resultados podem tanto representar a influência das condições climáticas nas secreções

das duas famílias, como podem ser apenas reflexo de baixa amostragem e problemas metodológicos na análise de CG-MS.

Os resultados apresentados ao longo deste trabalho representam informações inéditas acerca da composição química de espécies de lagartos da família Teiidae, além de informações iniciais para espécies de Gymnophthalmidae que podem guiar futuros estudos. Mostramos que os Teiidae apresentam complexidade química em suas secreções femorais, que podem sofrer influência de condições climáticas e da história evolutiva, e abrimos o caminho para que novos estudos sejam realizados acerca das interações químicas em espécies brasileiras de lagartos. As informações apresentadas ao longo deste trabalho indicam a necessidade de ampliarmos o nosso conhecimento sobre a ecologia das espécies brasileiras para melhoria das interpretações dos perfis químicos de Teiidae. A continuidade deste trabalho envolverá a identificação química dos componentes proteicos, o aumento da amostragem de espécies de Teiidae e a elaboração de uma metodologia para que possamos incluir as informações químicas (qualitativas e quantitativas) em análises filogenéticas.

Resumo

As interações químicas desempenham um papel essencial em diversas interações sociais de lagartos e são mediadas por compostos químicos presentes, principalmente, em suas glândulas femorais e pré-anais. O número de trabalhos caracterizando a composição química da secreção de glândulas femorais e pré-anais, assim como buscando identificar seu papel funcional em contextos sociais, tem aumentado nas últimas décadas. Embora a literatura sobre o tema seja extensa, os dados para espécies neotropicais são raros e para espécies que ocorrem no Brasil, há apenas informação para machos de *Salvator merianae*. Buscando ampliar o conhecimento sobre a composição química da secreção femoral de lagartos neotropicais, este trabalho caracterizou quimicamente a secreção de 11 espécies de Teiidae e seis de Gymnophthalmidae. Foram identificados 205 compostos, sendo 28 exclusivos de Gymnophthalmidae e 106 exclusivos de Teiidae. Demonstramos a influência das condições ambientais na secreção femoral de machos de *Ameiva ameiva* provenientes da Amazônia e da Caatinga, diferenças entre a composição química da secreção de machos de *S. merianae* de vida livre e de cativeiro, o papel da composição química da secreção de machos de três espécies de *Ameivula* na compreensão de um potencial complexo críptico de espécies e diferenças em machos de duas espécies de *Kentropyx* que podem estar associadas com o uso de substrato. Apresentamos a hipótese de que o *status* reprodutivo pode ter influência direta na composição química de machos e fêmeas, revelando um problema no estudo da composição química de espécies de Teiidae para as quais faltam dados acerca do ciclo reprodutivo e/ou apresentam reprodução prolongada/contínua. Em relação ao que era conhecido para *S. merianae*, validamos a grande quantidade de ácidos graxos como uma característica das espécies de Teiidae e identificamos, pela primeira vez, colesterol em todas as amostras analisadas. Este trabalho validou as espécies de Teiidae como um excelente modelo para os estudos das interações químicas em lagartos neotropicais e o potencial informativo da composição química das secreções femorais para melhor compreensão da ecologia e dos eventos evolutivos das linhagens de Teiidae.

Palavras-chave. Comunicação química, lagartos neotropicais, semioquímicos.

Abstract

Chemical interactions play an essential role in different social interactions of lizards and are mediated by chemical compounds present, mainly, in their femoral and preanal glands. The number of studies characterizing the chemical composition of femoral and preanal gland secretions, as well as trying to identify their functional role in social contexts, has increased in recent decades. Although the literature on the chemical communication in lizards is extensive, data for neotropical species are rare and for Brazilian species, there is only information for males of *Salvator merianae*. The main goal of this work is to expand the knowledge on the chemical composition of femoral secretion of neotropical lizards. We chemically characterized the femoral and preanal secretion of 11 species of Teiidae and six of Gymnophthalmidae. We identified a total of 205 compounds, 28 exclusively in Gymnophthalmidae and 106 exclusively in Teiidae. We demonstrated the influence of the environmental condition on the femoral gland secretion of males of *Ameiva ameiva* from Amazonia and Caatinga, differences between chemical composition of femoral gland secretion of free-living and captive *S. merianae*, the role of the chemical composition in understanding a potential cryptic complex of *Ameivula* and differences in males of two species of *Kentropyx* that may be associated with substrate use. We hypothesized that reproductive status may have a direct influence on the chemical composition of femoral gland secretions of males and females, revealing a problem in the study of the chemical composition of Teiidae species that lack information about their reproductive cycle and/or show prolonged/continuous reproduction. Regarding what was known for *S. merianae*, we validated the large amount of fatty acids as a characteristic of the species of Teiidae and, for the first time, identified cholesterol for a Teiidae species. This work validated the Teiidae species as an excellent model for the study of the chemical interactions in neotropical lizards and the potential informative of the chemical composition of femoral gland secretions to better understand the ecology and evolutionary events of Teiidae lineages.

Keywords. Chemical communication, neotropical lizards, semiochemicals.

Referências Bibliográficas

- Aebischer, N.J., P.A. Robertson & R.E. Kenward. 1993. *Compositional analysis of habitat use from animal radio-tracking data*. Ecology, 74: 1313–1325.
- Alberts, A.C. 1989. *Ultraviolet visual sensitivity in desert iguanas: implications for pheromone detection*. Animal Behaviour, 38: 129–137.
- Alberts, A.C. 1990. *Chemical properties of femoral gland secretions in the desert iguana, Dipsosaurus dorsalis*. Journal of Chemical Ecology, 16(1): 13–25.
- Alberts, A.C. 1991. *Phylogenetic and adaptive variation in lizard femoral gland secretions*. Copeia, 1: 69–79.
- Alberts, A.C. 1992. *Constraints on the design of chemical communication systems in terrestrial vertebrates*. The American Naturalist, 139: S62–S89.
- Alberts, A.C. 1993. *Chemical and behavioral studies of femoral gland secretions in iguanid lizards*. Brain, Behavior and Evolution, 41: 255–260.
- Alberts, A.C., N.C. Pratt & J.A. Phillips. 1992a. *Seasonal productivity of lizard femoral glands: relationship to social dominance and androgen levels*. Physiology and Behavior, 51: 729–733.
- Alberts, A.C., T.R. Sharp, D.I. Werner P.J. Weldon. 1992b. *Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green iguanas (Iguana iguana)*. Journal of Chemical Ecology, 18(5): 703–712.
- Alberts, A.C., J.A. Phillipis & D.I. Werner. 1993. *Sources of Intraspecific Variability in the Protein Composition of Lizard Femoral Gland Secretions*. Copeia, 3: 775–781.
- Amo, L., P. López & J. Martín. 2004. *Chemosensory recognition and behavioral responses of wall lizards, Podarcis muralis, to scents of snakes that pose different risks of predation*. Copeia, 2004(3): 691–696.
- Anderson, M.J. 2001. *A new method for non-parametric multivariate analysis of variance*. Austral Ecology, 26: 32–46.
- Anderson, M.J. & T.J. Willis. 2003. *Canonical analysis of principal coordinates: a useful method of constrained ordination ecology*. Ecology, 84: 511–525.
- Andrade, D.V., C. Sanders, W.K. Milsom & A.S. Abe. 2004. *Overwintering in tegu lizards*. Twelfth International Hibernation Symposium, 27: 339–348.

- Aragón, P., P. López & J. Martín. 2001. *Discrimination of femoral gland secretions from familiar and unfamiliar conspecifics by male Iberian rock-lizards, Lacerta monticola*. Journal of Herpetology, 35(2): 346–350.
- Aragón, P., P. López & J. Martín. 2008. *Increased predation risk modifies lizard scent-marks chemicals*. Journal of Experimental Zoology, 309A: 427–433.
- Arias, F., C.M. de Carvalho, M.T. Rodrigues & H. Zaher. 2011. *Two new species of Cnemidophorus (Squamata: Teiidae) of the C. ocellifer group, from Bahia, Brazil*. Zootaxa, 3022: 1–21.
- Arias, F.J., M. Teixeira Junior, R. Recoder, C.M. de Carvalho, H. Zaher & M.T. Rodrigues. 2014a. *Whiptail lizards in South America: a new Ameivula (Squamata, Teiidae) from Planalto dos Gerais, Eastern Brazilian Cerrado*. Amphibia-Reptilia, 35: 227–242.
- Arias, F.J., C.M. Carvalho, H. Zaher & M.T. Rodrigues. 2014b. *A new species of Ameivula (Squamata, Teiidae) from Southern Espinhaço Mountain Range, Brazil*. Copeia, 2014(1): 95–105.
- Arias, F.J., R. Recoder, B.B. Álvarez, E. Ethcepare, M. Quipildor, F. Lobo & M.T. Rodrigues. 2017. *Diversity of teiid lizards from Gran Chaco and Western Cerrado (Squamata: Teiidae)*. Zoolożczvca Scripta, 2018: 1–15.
- Ávila-Pires, T.C.S. 1995. *Lizards of Brazilian Amazonia (Reptilia: Squamata)*. Zoologische Verhandelingen Leiden 299: 1–706.
- Baeckens, S., S. Edwards, K. Huyghe & R. Van Damme. 2015. *Chemical signaling in lizards: an interspecific comparison of femoral pore number in Lacertidae*. Biological Journal of the Linnean Society, 114: 44–57.
- Baeckens, S., J. Martín, R. García-Roa, P. Pafilis, K. Huyghe & R. Van Damme. 2017. *How environmental conditions shape the chemical signal design of lizards*. Functional Ecology, 2017: 1–15.
- Barbosa, D., E. Font, E. Desfilis & M.A. Carretero. 2006. *Chemically mediated recognition in closely related Podarcies wall lizards*. Journal of Chemical Ecology, 32: 1587–1598.
- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G. & P.M. Gresshoff. 1991. *Fast and sensitive staining of DNA in polyacrylamide gels*. Analytical Biochemistry, 196: 80–83.
- Basto da Silva, M. & T.C.S. Ávila-Pires. 2013. *The genus Cnemidophorus (Squamata: Teiidae) in State of Piauı́, northeastern Brazil, with description of a new species*. Zootaxa, 3681(4): 455–477.

- Baxi, K.N., K.M. Dorries & H.L. Eisthen. 2006. *Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones?* Trends in Neurosciences, 29(1): 1–6.
- Becker, E.A., S. Petruno & C.A. Marler. 2012. *A comparison of scent marking between a monogamous and promiscuous species of Peromyscus: pair bonded males do not advertise to novel females.* PLoS ONE, 7: e32002.
- Bissinger, B.E. & C.A. Simon. 1979. *Comparison of tongue extrusion in representatives of six families of lizards.* Journal of Herpetology, 13(2): 133–139.
- Bofill, M.E. & Lewis, A.R. 1999. *Detection of socially relevant chemical cues by the Teiid lizard Ameiva exsul.* Journal of Herpetology, 33 (4): 713–715.
- Bossert, W.H. & D.O. Wilson. 1963. *The analysis of olfactory communication among animals.* Journal of Theoretical Biology, 5: 443–469.
- Bull, C.M., C.L. Griffin & G.R. Johnston. 1999a. *Olfactory discrimination in scarpiling lizards.* Behavioral Ecology, 10: 136–140.
- Bull, C.M., C.L. Griffin & M.V. Perkins. 1999b. *Some properties of a pheromone allowing individual recognition, from the scats of an Australian lizard, Egernia striolata.* Acta Ethologica, 2: 35–42.
- Burr G.O., M.M. Burr & E. Miller. 1930. *On the nature of the fatty acids essential in nutrition.* The Journal of Biological Chemistry, 86: 587–621.
- Butenandt, A., R. Beckmann & E. Hecker. 1961. *Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners, I. Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexuallockstoffes Bombykol.* Biological Chemistry, 324(1): 71–83.
- Caldironi H.A. & M.E. Manes. 2006. *Proximate composition, fatty acids and cholesterol content of meat cuts from tegu lizard Tupinambis merianae.* Journal of Food Composition and Analysis, 19: 711–714.
- Carazo, P., E. Font & E. Desfilis. 2007. *Chemosensory assessment of rival competitive ability and scent-mark function in a lizard, Podarcis hispanica.* Animal Behaviour, 74: 895–902.
- Caro, S.P. & J. Balthazart. 2010. *Pheromones in birds: myth or reality?* Journal of Comparative Physiology A, 196: 751–766.
- Censky, E.J. 1997. *Female mate choice in the non-territorial lizard Ameiva plei (Teiidae).* Behavioral Ecology and Sociobiology, 40, 221–225.
- Chamut, S., V.G. Valdez & M.E. Manes. 2009. *Functional morphology of femoral glands in the tegu lizard, Tupinambis merianae.* Zoological Science, 26(4): 289–293.

- Clark, R.W. 2007. *Public information for solitary foragers: timber rattlesnakes use conspecific chemical cues to select ambush sites*. Behavioral Ecology, 18(2): 487–490.
- Cole, C.J. 1966. *Femoral glands in lizards: a review*. Herpetologica, 22(3): 199–206.
- Colli, G.R. 1991. *Reproductive ecology of Ameiva ameiva (Sauria, Teiidae) in the Cerrado of Central Brazil*. Copeia, 1991(4): 1002–1012.
- Colli, G.R., J.P. Caldwell, G.C. Costa, A.M. Gainsbury, A.A. Garda, D.O. Mesquita, C.M.M.R. Filho, A.H.B. Soares, V.N. Silva, P.H. Valdujo, G.H.C. Vieira, L.J. Vitt, F.P. Werneck, H.C. Wiederhecker & M.G. Zatz. 2003. *A new species of Cnemidophorus (Squamata, Teiidae) from the Cerrado Biome in Central Brazil*. Occasional Papers, 14: 1–14.
- Colli, G.R., L.G. Giugliano, D.O. Mesquita & F.G.R. França. 2009. *A new species of Cnemidophorus from the Jalapão region, in the Central Brazilian Cerrado*. Herpetologica, 65(3): 311–327.
- Conrad, J.L. 2008. *Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology*. Bulletin of the American Museum of Natural History, 310: 1–182.
- Cooper, W.E. 1994. *Chemical discrimination by tongue-flicking in lizards: a review with hypothesis on its origin and its ecological and phylogenetic relationships*. Journal of Chemical Ecology, 20(2): 439–485.
- Cooper Jr., W.E. 1990. *Prey odor detection by teiid and lacertid lizards and the relationship of prey odor detection to foraging mode in lizard families*. Copeia, 1: 237–242.
- Cooper Jr., W.E. 1996. *Preliminary reconstructions of nasal chemosensory evolution in Squamata*. Amphibia-Reptilia, 17: 395–415.
- Cooper Jr. *Lizard chemical senses, chemosensory behavior, and foraging mode*. Em: Reilly, S.M., McBrayer, L.B. & Miles, D.B. Lizard Ecology, Cambridge University Press, 2007, 1^a Ed.
- Cooper Jr., W.E. & A.C. Alberts. 1990. *Tongue-flicking and biting in response to chemical food stimuli by an iguanid lizard (Dipsosaurus dorsalis) having sealed vomeronasal ducts: vomerolfaction may mediate these behavioral responses*. Journal of Chemical Ecology, 17(1): 135–146.
- Cooper Jr., W.E. & G. Burghardt. 1990. *A comparative analysis of scoring methods for chemical discrimination of prey by squamate reptiles*. Journal of Chemical Ecology, 16(1): 45–65.

- Cooper Jr., W.E., J.P. Cadwell, L.J. Vitt, V. Pérez-Mellado & T.A. Baird. 2002. *Food-chemical discrimination and correlated evolution between plant diet and plant-chemical discrimination in lacertiform lizards*. Canadian Journal of Zoology, 80(4): 655–663.
- Costa, H.C., E.T. Silva, P.S. Campos, M.P.C. Oliveira, A.V. Nunes & P.S. Santos. 2010. *The corpse bride: a case of Davian behaviour in the Green Ameiva (Ameiva ameiva) in southeastern Brazil*. Herpetology Notes, 3: 79–83.
- Costa, H.C., L.O. Drummond, J.F.R. Tonini & J. Zaldívar-Rae. 2013. *Kentropyx calcarata (Squamata: Teiidae): Mating behavior in the wild*. North-Western Journal of Zoology, 9 1): 198–200.
- Cowles, R.B. & R.L. Phelan. 1958. *Olfaction in rattlesnakes*. Copeia, 1958:77–83.
- Duvall, D. 1981. *Western fence lizard (Sceloporus occidentalis) chemical signals. A replication with naturally breeding adults and a test of the Cowles and Phelan hypothesis of rattlesnake olfaction*. Journal of Experimental Zoology, 218: 351–362.
- Duvall, D., B.M. Graves & G.C. Carpenter. 1987. *Visual and chemical composite signaling effects of Sceloporus lizards fecal boli*. Copeia, 1987: 1028–1031.
- Escobar, C.A., A. Labra & H.M. Niemeyer. 2001. *Chemical composition of precloacal secretions of Liolaemus lizards*. Journal of Chemical Ecology, 27(8): 1677–1690.
- Field, A. *Discovering statistics using SPSS*. 3^a edição. London, Sage Publication. 2009.
- Escobar, C.M., C.A. Escobar, A. Labra & H.M. Niemeyer. 2003. *Chemical composition of precloacal secretions of two Liolaemus fabiani populations: are they diferente?* Journal of Chemical Ecology, 29(3): 629–638.
- Estes, R., D.M. de Queiroz & J. Gauthier. *Phylogenetic relationships within Squamata*. Em: R. Estes & G. Pregil (Eds). Phylogenetic relationships of the lizard families. Stanford, Stanford University Press, 1988. pp. 119–281.
- Fergusson, B., S.D. Bradshaw & J.R. Cannon. 1985. *Hormonal control of femoral gland secretion in the lizard, Amphibolurus ornatus*. General and Comparative Endocrinology, 57: 371–376.
- Ferreira, S., S.V. Brito, J.G.M. Costa, R.R.N. Alves, H.D.M. Coutinho & W.O. Almeida. 2009. *Is the body fat of the lizard Tupinambis merianae effective against bacterial infections?* Journal of Ethnopharmacology, 126: 233–237.
- Font, E. & E. Desfilis. 2002. *Chemosensory recognition of familiar and unfamiliar conspecifics by juveniles of the Iberian wall lizard Podarcis hispanica*. Ethology, 108: 319–330.

- Font, E., D. Barbosa, C. Sampedro & P. Carazo. 2012. *Social behavior, chemical communication, and adult neurogenesis: studies of scent mark function in Podarcis wall lizards*. *General and Comparative Endocrinology*, 177: 9–17.
- Gabirot, M., P. López, J. Martín, M. de Fraipont, B. Heulin, B. Sinervo & J. Clobert. 2008. *Chemical composition of femoral secretions of oviparous and viviparous types of male common lizards Lacerta vivipara*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 539–544.
- Gabirot, M., A.M. Castilla, P. López & J. Martín. 2010. *Differences in chemicals signals may explain species recognition between an island lizard, Podarcis atrata, and related mainland lizards, P. hispanica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(2010): 521–528.
- Gabirot, M., P. López & L. Martín. 2012. *Differences in chemical sexual signals may promote reproductive isolation and cryptic speciation between Iberian Wall lizards populations*. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012: 1–13.
- Gabirot, M., P. López & J. Martín. 2013. *Female mate choice based on pheromone content may inhibit reproductive isolation between distinct populations of Iberian wall lizards*. *Current Zoology*, 59(2): 210–220.
- García-Roa, R., C. Cabido, P. López & J. Martín. 2016a. *Interspecific differences in chemical composition of femoral gland secretions between two closely related wall lizard species, Podarcis bocagei and Podarcis carbonelli*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64: 105–110.
- García-Roa, R., S. Carreira, P. López & J. Martín. 2016b. *Genders matters: sexual differences in chemical signals of Liolaemus wiegmanni lizards (Iguania, Liolaemidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 69: 108–114.
- García-Roa, R., J. Sáiz, B. Gómara, P. López & J. Martín. 2017. *Dietary constraints can preclude the expression of an honest chemical sexual signal*. *Scientific Reports*, 7: 6073.
- Gillam, E. 2011. *An introduction to animal communication*. *Nature Education Knowledge*, 3(10): 70–75.
- Gilbert, R. & G.W. Uetz. 2019. *Male chemical cues as reliable indicators of infection in the wolf spider Schizocosa ocreata*. *Ethology*. doi:10.1111/eth.12841
- Giugliano, L.G., R.G. Collevatti & G.R. Colli. 2007. *Molecular dating and phylogenetic relationships among Teiidae (Squamata) inferred by molecular and morphological data*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 168–179.

- Giugliano, L.G., C.C. Nogueira, P.H. Valdujo, R.G. Collevatti & G.R. Colli. 2013. *Cryptic diversity in South American Teiinae (Squamata, Teiidae) lizards*. *Zoologica Scripta*, 42(5): 473–487.
- Goicoechea, N., D.R. Frost, I. de la Riva, K.C.M. Pellegrino, J. Sites Jr., M.T. Rodrigues & J.M. Padial. 2016. *Molecular systematics of teioid lizards (Teioidea/Gymnophthalmoidea: Squamata) based on the analysis of 48 loci under tree-alignment and similarity-alignment*. *Cladistics* (2016): 1–48.
- Graves, B.M. & M. Halpern. 1990. *Roles of vomeronasal organ chemoreception in tongue-flicking, exploratory and feeding behaviour of the lizard, Chalcides ocellatus*. *Animal Behaviour*, 39: 692–698.
- Halpern, M. & J.L. Kubie. 1983. *Snake tongue flicking behavior: clues to vomeronasal system functions*. Em: Silverstein, R.M. & D. Miller-Schwarze (eds.). *Chemical signals in vertebrates III*. Plenum Press, Nova Iorque.
- Harvey, M.B, G.N. Ugueto & R.L. Gutberlet Jr. 2012. *Review of Teiid morphology with a revised taxonomy and phylogeny of the Teiidae (Lepidosauria: Squamata)*. *ZOOTAXA*, 3459: 1–156.
- Heathcote, R.J.P., E. Bell, P. d'Etorre, G.M. While & T. Uller. 2014. *The scent of sun worship: basking experience alters scent mark composition in male lizards*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 68(5): 861–870.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones & A. Jarvis. 2005. *Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas*. *International Journal of Climatology*, 25: 1965–1978.
- Houck, L.D. 2009. *Pheromone communication in amphibians and reptiles*. *Annual Review of Physiology*, 71: 161–176.
- Imparato, B.A., M.M. Antoniazzi, M.T. Rodrigues & C. Jared. 2007. *Morphology of the femoral glands in the lizard Ameiva ameiva (Teiidae) and their possible role in semiochemicals dispersion*. *Journal of Morphology*, 268(7): 636–648.
- Iraeta, P., C. Monasterio, A. Salvador & J.A. Díaz. 2011. *Sexual dimorphism and interpopulation differences in lizard hind limb length: locomotor performance or chemical signaling?* *Biological Journal of the Linnean Society*, 104: 318–329.
- Johansson, B.G., & T.M. Jones. 2007. *The role of chemical communication in mate choice*. *Biological Reviews*, 82, 265–289.
- Kandutsch, A.A. 1963. *Metabolism of cholesta-4,7-dien-3-one and cholesta-4,6-dien-3-one by mouse liver microsomes*. *Journal of Lipid Research*, 4(2): 179–187.

- Kardong, K.V. *Vertebrates: Comparative anatomy, function, evolution*. 5^a edição. Nova Iorque, McGraw-Hill Primis. 2008.
- Karlson, P. & M. Luscher. 1959. 'Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 4653(3): 55–56.
- Khannoon, E.R. 2012. *Secretion of pre-anal glands of house-dwelling geckos (Family: Gekkonidae) contain monoglycerides and 1,3-alkanediol. A comparative chemical ecology study*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44(2012): 341–346.
- Khannoon, E.R., Flachsbarth, B., El-Gendy, A., Mazik, K., Hardege, J.D. & S. Schulz. 2011a. *New compounds, sexual differences, and age-related variations in the femoral gland secretions of the lacertid lizard Acanthodactylus boskianus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 95–101.
- Khannoon, E.R., A. El-Gendy & J.D. Hardege. 2011b. *Scent marking pheromones in lizards: cholesterol and long chain alcohols elicit avoidance and aggression in male Acanthodactylus boskianus*. *Chemoecology*, 21: 143–149.
- Khannoon, E.R., D.H. Lunt, S. Schulz & J.D. Hardege. 2013. *Divergence of scent pheromones in allopatric populations of Acanthodactylus boskianus (Squamata, Lacertidae)*. *Zoological Science*, 30(5): 380–385.
- Kok, P. 2015. *A new species of Pantepui endemic genus Riolama (Squamata: Gymnophthalmidae) from the summit of Murisipán-tepui, with the erection of a new gymnophthalmid subfamily*. *Zoological Journal of Linnean Society*, 174: 500–518.
- Kopena, R., P. López & J. Martín. 2014. *What are carotenoids signalling? Immunostimulatory effects of dietary vitamin E, but not of carotenoids, in Iberian green lizards*. *Naturwissenschaften*, 101(2): 1107–1114.
- Labra, A. 2011. *Chemical stimuli and species recognition in Liolaemus lizards*. *Journal of Zoology*, 285: 215–221.
- Labra, A., C.A. Escobar & H.M. Niemeyer. 2001. *Chemical discrimination in Liolaemus lizards: comparison of behavioral and chemical data*. *Chemical Signals in Vertebrates*, 9: 439–444.
- Labra, A., C.A. Escobar, P.M. Aguilar & H.M. Niemeyer. 2002. *Sources of pheromones in the lizard Liolaemus tenuis*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75:141–147.
- Laemmli, U.K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 227 (5259): 680–685.

- Le Galliard, J., P.S. Fitzer, R. Ferrière & J. Clobert. 2005. *Sex ratio bias, male aggression, and population collapse in lizards*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 102, 18231–18236.
- Lide, D.R. & G.W.A. Milne. 1993. *Handbook of data on organic compounds*. 3^a Edição. CRC Press, Boca Raton, Flórida, Estados Unidos.
- Linklater, W.L., K. Mayer & R.R. Swaisgood. 2013. *Chemical signals of age, sex and identity in black rhinoceros*. Animal Behavior, 85: 671–677.
- Lopes, H.R. & A.S. Abe. 1999. *Biologia reprodutiva e comportamento do teiu, Tupinambis teguixin, em cativoiro (Reptilia, Teiidae)*. Em: Manejo y conservación de fauna silvestre en América Latina, p. 259-274. Fang, T.G., O.L. Montenegro & R.E. Bodmer. Eds. La Paz: Instituto de Ecología.
- López, P. & J. Martín. 2002. *Chemical rival recognition decreases aggression levels in male Iberian wall lizards, Podarcis hispanica*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 51, 461–465.
- López, P. & J. Martín. 2005a. *Age-related differences in lipophilic compounds found in femoral gland secretions of male spiny-footed lizards, Acanthodactylus erythrurus*. Zeitschrift fur Naturforsch C, 60: 915–920.
- López, P. & J. Martín. 2005b. *Intersexual differences in chemical composition of precloacal gland secretions of the amphisbaenian Blanus cinereus*. Journal of Chemical Ecology, 31(12): 2913–2931.
- López, P. & J. Martín, 2009. *Potential chemosignals associated with male identity in the Amphisbaenian Blanus cinereus*. Chemical senses, 34: 479–486.
- López, P., P. Aragón & J. Martín. 1998. *Iberian rock lizards (Lacerta monticola cyreni) assess conspecific information using composite signals from faecal pellets*. Ethology, 104: 809–820.
- López, P. P. Aragón & J. Martín. 2003. *Responses of female lizards, Lacerta monticola, to males chemical cues reflect their mating preference for older males*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 55: 73–79.
- López, P., L. Amo & J. Martín. 2005. *Reliable signaling by chemical cues of male traits and health state in male lizards, Lacerta monticola*. Journal of Chemical Ecology, 32(2): 473–488.
- Losos, J.B., D.M. Hillis & H.W. Greene. 2012. *Who speaks with forked tongue?* Science, 338: 1428–1429.

- Louw, S., B.V. Burger, M. Le Roux & J.H. Van Wyk. 2007. *Lizard epidermal gland secretions I: chemical characterization of the femoral gland secretion of the sungazer, Cordylus giganteus*. Journal of Chemical Ecology, 33: 1806–1818.
- Louw, S., B.V. Burger, M. Le Roux & J.H. Van Wyk. 2011. *Lizard epidermal gland secretions II: chemical characterization of the generation gland secretion of the Sungazer, Cordylus giganteus*. Journal of Natural Products, 74: 1364–1369.
- Maderson, P.F.A. & K.W. Chiu. 1970. *Epidermal glands in Gekkonid lizards: evolution and phylogeny*. Herpetologica, 26(2): 233–238.
- Mangiacotti, M., Fumagalli, M., Scali, S., Zuffi, M.A.L., Cagnone, M., Salvini, R. & R. Zacchi. 2017. *Inter- and intra-population variability of the protein content of femoral gland secretions from a lacertid lizard*. Current Zoology, 63(6): 657–665.
- Mangiacotti, M., M. Fumagalli, M. Cagnone, S. Viglio, A.M. Bardoni, S. Scali & R. Zacchi. 2019. *Morph-specific protein patterns in the femoral gland secretions of a colour polymorphic lizard*. Scientific Reports, 9: 8412.
- Marques-Souza, S., I. Prates, A. Fouquet, A. Camacho, P.J.R. Kok, P.M.S. Nunes, F. Dal Vechio, R.S. Recoder, N. Mejia, M. Teixeira Jr., C. Barrio-Amorós, J. Cassimiro, J.D. Lima, M.A. de Sena & M.T. Rodrigues. 2018. *Reconquering the water: Evolution and systematics of South and Central American aquatic lizards (Gymnophthalmidae)*. Zoologica Scripta, 47:255–265.
- Martin, J. & P. López. 2000. *Chemoreception, symmetry and mate choice in lizards*. The Royal Society, 267: 1265–1269.
- Martín, J. & P. López. 2006a. *Vitamin D supplementation increases the attractiveness of males' scent for female Iberian rock lizards*. Proceedings of Royal Society, 273: 2619–2624.
- Martín, J. & P. López. 2006b. *Age-related variation in lipophilic chemical compounds from femoral gland secretions of male lizards Psammodromus algirus*. Biochemical Systematics and Ecology, 34: 691–697.
- Martín, J. & P. López. 2006c. *Links between male quality, male chemical signals, and female mate choice in Iberian Rock Lizards*. Functional Ecology, 20: 1087–1096.
- Martín, J. & P. López. 2007. *Scent may signal fighting ability in male Iberian rock lizards*. Biology Letters, 3: 125–127.
- Martín, J. & P. López. 2010a. *Multimodal sexual signals in male ocellated lizards Lacerta lepida: vitamin E in scent and green coloration may signal male quality in different sensory channels*. Naturwissenschaften, 97: 545–553.

- Martín, J. & P. López. 2010b. *Condition-dependent pheromone signaling by male rock lizards: more oily scents are more attractive*. *Chemical Senses*, 35: 253–262.
- Martín, J. & P. López. 2011. *Pheromones and reproduction in Reptiles*. Em: Norris, D.O., Lopez, K.H. (Eds.), *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Reptiles, 3. São Diego, Califórnia, Academic Press, pp. 141–167.
- Martín, J. & P. López. 2012. *Supplementation of male pheromone on rock substrates attracts female rock lizards to the territories of males: a field experiment*. *Plos One*, 7(1): 141–167.
- Martín, J. & P. López. 2013. *Effects of global warming on sensory ecology of rock lizards: increased temperatures alter the efficacy of sexual chemical signals*. *Functional Ecology*, 27: 1332–1340.
- Martín, J. & P. López. 2015. *Condition-dependent chemosignals in reproductive behavior of lizards*. *Hormones and Behavior*, 68: 14–24.
- Martín, J., E. Civantos, L. Amo & P. López. 2007. *Chemical ornaments of male lizards Psammmodromus algirus may reveal their parasite load and health state to females*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 173–179.
- Martín, J., L. Amo & P. López. 2008. *Parasites and health affect multiple sexual signals in male common wall lizards, Podarcis muralis*. *Naturwissenschaften*, 95: 293–300.
- Martín, J., I. Barja & P. López. 2010. *Chemical scent constituents in feces of wild Iberian wolves (Canis lupus signatus)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 1096–1102.
- Martín, J., S. Chamut, M.E. Manes & P. López. 2011. *Chemical constituents of femoral gland secretions of male Tegu lizards (Tupinambis merianae) (Family Teiidae)*. *Zeitschrift für Naturforsch*, 66c: 434–440.
- Martín, J., J. Ortega & P. López. 2013. *Lipophilic compounds in femoral secretions of male collared lizards, Crotaphytus bicinctores (Iguania, Crotaphytidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 47: 5–10.
- Martín, J., J. Ortega & P. López. 2015a. *Interpopulational variations in sexual chemical signals of Iberian wall lizards may allow maximizing signal efficiency under different climatic conditions*. *PlosOne*, 10(6): e0131492.
- Martín, J., A. Martínez-Silvestre, P. López, A. Ibáñez, M.A. Rodríguez-Domínguez & I. Verdaguer. 2015b. *Lipophilic compounds in femoral secretions of males and females of the El Hierro giant lizard Gallotia simonyi (Lacertidae)*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61: 286–292.

- Martín, J., P. López, P. Iraeta, J.A. Díaz & A. Salvador. 2016a. *Differences in males' chemical signals between genetic lineages of the lizard Psammmodromus algirus promote male intrasexual recognition and aggression but not female mate preferences*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 70(10): 1657–1668.
- Martín, J., A.M. Castilla, P. López, M. Al-Jaidah, S.F. Al-Mohannadi & A.A.M. Al-Hemaidi. 2016b. *Chemical signals in desert lizards: Are femoral gland secretions of male and female spiny-tailed lizards, Uromastix aegyptia microlepis adapted to arid conditions?* Journal of Arid Environments, 127: 192–198.
- Martins, M. 2006. *Life in the water: ecology of the jacararana lizard, Crocodilurus amazonicus*. Herpetological Journal, 16: 171–177.
- Mason, R.T. 1993. *Chemical ecology of the red-sided garter-snake, Thamnophis sirtalis parietalis*. Brain, Behavior and Evolution, 41: 261–268.
- Mason, R.T. & W.H.N. Gutzke. 1990. *Sex recognition in the leopard Gecko, Eublepharis macularis (Sauria: Gekkonidae). Possible mediation by skin-derived semiochemicals*. Journal of Chemical Ecology, 16(1): 27–36.
- Mason, R.T. & M.R. Parker. 2010. *Social behavior and pheromonal communication in reptiles*. Journal of Comparative Physiology A, 196: 729–749.
- Mason, R.T., H.M. Fales, T.H. Jones, L.K. Pannell, J.W. Chinn & D. Crews. 1989. *Sex pheromones in snakes*. Science. 241:290–293.
- Moreira, P.L., P. López & J. Martín. 2008. *Discrimination of conspecific faecal chemicals and spatial decisions in juvenile Iberian rock lizard (Lacerta monticola)*. Acta Ethologica, 11: 26–33.
- Morgans, L.F. & G.A. Heidt. 1978. *Comparative tongue histology and scanning electron microscopy of the diamondback water snake (Natrix rhombifera) and black rate snake (Elaphe obsoleta) (Reptilia, Serpentes, Colubridae)*. Journal of Herpetology, 12: 275–280.
- Murphy, J.C., M.J. Jowers, R.M. Lehtinen, S.P. Charles, G.R. Colli, A.K. Peres Jr., C.R. Hendry & R.A. Pyron. 2016. *Cryptic, Sympatric Diversity in Tegu Lizards of the Tupinambis teguixin Group (Squamata, Sauria, Teiidae) and the Description of Three New Species*. PLoS ONE, 11(8): e0158542.
- Nimer, E. 1989. *Climatologia do Brasil*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro.

- Nisa, C.R., M. Teixeira Jr. & M. T. Rodrigues. 2017. *Reproductive biology of three sympatric species of Gymnophthalmid lizards from the sand dunes of the Middle São Francisco River, Habia, Brazil*. South American Journal of Herpetology 12: 76–88.
- Nisa, C.R., G. Rodríguez-Ruiz, P. López, P.I. Silva Jr, M.T. Rodrigues & J. Martín. 2019. *Chemosensory discrimination of male age by female Psammmodromus algirus lizards based on femoral secretions and feces*. Ethology, (2019): 1–8.
- Nordlund, D.A. & W.J. Lewis. 1976. *Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions*. Journal of Chemical Ecology, 2(2): 211–220.
- Nunes, P.M.S., A. Fouquet, F.F. Curcio, P.J.R. Kok & M.T. Rodrigues. 2012. *Cryptic species in Iphisa elegans Gray, 1851 (Squamata: Gymnophthalmidae) revealed by hemipenial morphology and molecular data*. Zoological Journal of the Linnean Society, 166: 361–376.
- Oliveira, E.F., M. Gehara, V.A. São-Pedro, X. Chen, E.A. Myers, F.T. Burbrink, D.O. Mesquita, A.A. Garda, G.R. Colli, M.T. Rodrigues, F.J. Arias, H. Zaher, R.M.L. Santos & G.C. Costa. 2015. *Speciation with gene flow in whiptail lizards from a Neotropical xeric biome*. Molecular Ecology, 24: 5957–5975.
- Pavel, A.B. & C.I. Vasile. 2012. *PyElph – a software tool for gel images analysis and phylogenetics*. BMC Bioinformatics, 13: 1–6.
- Pellegrino, K.C.M., M.T. Rodrigues, Y. Yonenaga-Yassuda & J.W. Sites. 2001. *A molecular perspective on the evolution of microteiid lizards (Squamata, Gymnophthalmidae), and a new classification for the family*. Biological Journal of the Linnean Society, 74: 315–338.
- Pianka, E.R. & Vitt, L.J. *Lizards: windows to the evolution of diversity*. Califórnia: University of California Press, 2003. 335 pp.
- Pincheira-Donoso, D., D.J. Hodgson & T. Tregenza. 2008. *Comparative evidence for Strong phylogenetic inertia in precloacal signaling glands in a species-rich lizard clade*. Evolutionary Ecology Research, 10: 11–28.
- Pough, H., R.M. Andrews, J.E. Cadle, M.L. Crump, A.H. Savitzky & K.D. Wells. *Herpetology* 3ª edição. New Jersey, Prentice Hall. 2003.
- Pyron, R.A., F.T. Burbrink & J.J. Wiens. 2013. *A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes*. BMC Evolutionary Biology, 13(93): 53 pp.

- Reeder, T.W., C.J. Cole & H.C. Dessauer. 2002. *Phylogenetic relationships of whiptail lizards of the genus Cnemidophorus (Squamata: Teiidae): A test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins*. American Museum Novitates, 3365: 1–64.
- Roberts, J.B. & H.B. Lillywhite. 1980. *Lipid barrier to water exchange in reptile epidermis*. Science, 207: 1077–1079.
- Rocha, C.F.D. 2008. *Body size, female reproduction and sexual dimorphism in the lizard Ameiva ameiva (Teiidae) in a restinga of southeastern Brazil*. Revista Brasileira de Zoologia, 25(2): 370–372.
- Rocha, C.F.D., H.G. Bergallo & D. Peccinini-Seale. 1997. *Evidence of an unisexual population of the Brazilian whiptail lizard genus Cnemidophorus (Teiidae), with description of a new species*. Herpetologica, 53(3): 374–382.
- Rodrigues, M.T. 1991. *Herpetofauna das dunas interiores do Rio São Francisco, Bahia, Brasil. I. Introdução à área e descrição de um novo gênero de microteiídeos (Calyptommatius) com notas sobre sua ecologia, distribuição e especiação (Sauria, Teiidae)*. Papéis Avulsos de Zoologia, 37 (19): 285–320.
- Rodrigues, M.T., M. Dixo, D. Pavan & V.K. Verdade. 2002. *A new species of Leposoma (Squamata, Gymnophthalmidae) from the remnant Atlantic Forests of the state of Bahia, Brazil*. Papéis Avulsos de Zoologia, 42(14): 335–350.
- Rodrigues, M.T., M. Teixeira Jr., R.S. Recoder, F. Dal Vechio, R. Damasceno & K.C.M. Pellegrino. 2013. *A new species of Leposoma (Squamata: Gymnophthalmidae) with four fingers from the Atlantic Forest central corridor in Bahia, Brazil*. ZOOTAXA, 3635(4): 459–475.
- Sartorius, S., L.J. Vitt & G.R. Colli. 1999. *Use of naturally and anthropogenically disturbed habitats in Amazonian rainforest by the teiid lizard Ameiva ameiva*. Biological Conservation, 90: 91–101.
- Sazima, I. 2015. *Corpse bride irresistible: a dead female tegu lizard (Salvator merianae) courted by males for two days at an urban park in South-eastern Brazil*. Herpetology Notes, 8: 15–18.
- Schwenk, K. 1985. *Occurrence, distribution and functional significance of taste buds in lizards*. Copeia, 1985(1): 91–101.
- Shine, R., M.M. Olsson & R.T. Mason. 2000. *Chastity belts in gartersnakes: the functional significance of mating plugs*. Biological Journal of the Linnean Society, 70: 377–390.

- Shine, R., B. Phillips, H. Wayne, M. Lemaster & R.T. Mason. 2003. *Chemosensory cues allow courting male garter snakes to assess body length and body condition potential mates*. Behavioral Ecology and Sociobiology, 54: 162–166.
- Silva, M.B. & T.C.S. Ávila-Pires. 2013. *The genus Cnemidophorus (Squamata: Teiidae) in state of Piauí, northeastern Brazil, with description of a new species*. Zootaxa, 3681 (4): 455–477.
- Simnandle, E.T., R.E. Espinoza, K.E. Nussear & C.R. Tracy. 2001. *Lizards, lipids, and dietary links to animal function*. Physiological and Biochemical Zoology, 74 (5): 625–640.
- Simon, J.C., F. Delmotte, C. Rispe & T. Crease. 2003. *Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals*. Biological Journal of the Linnean Society, 79: 151–163.
- Smith, R.E. 1968. *Experimental evidence for a gonadal-fat body relationship in two teiid lizards (Ameiva festiva, Ameiva quadrilineata)*. Biological Bulletin, 134 (2): 325–331.
- Suzuki, K., T. Shimizu & T. Nakata. 1998. *The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8(1998): 2133–2138.
- Symonds, M.R.E. & M.A. Elgar. 2008. *The evolution of pheromone diversity*. Trends in Ecology and Evolution, 23(4): 220–228.
- Tamilmani, E., R. Radhakrishnan & K. Sankaran. 2018. *13-Docosenamides release by bacteria in response to glucose during growth-fluorescein quenching and clinical application*. Applied Microbiology and Biotechnology, 102(15): 6673–6685.
- Touhara, K. 2008. *Sexual communication via peptide and protein pheromones*. Current Opinion in Pharmacology, 8: 759–764.
- Uetz, P., P. Freed & J. Hosek. 2019. *The Reptile Database*, <http://www.reptile-database.org>. Acessado em: 30 de maio de 2019
- Ugueto, G.N. & M.B. Harvey. 2011. *Revision of Ameiva ameiva Linnaeus (Squamata: Teiidae) in Venezuela: recognition of four species and status of introduced populations in Southern Florida, USA*. Herpetological Monographs, 25(1): 113–170.

- Valdecantos, S., V. Martínez & A. Labra. 2015. *Description of a proctodeal gland present in three South American Liolaemus lizards (Iguania: Liolaemidae)*. *Salamandra*, 51(2): 182–186.
- Vega Parry, H., T. Alonso, H. Caldironi & M.E. Manes. 2013. *Composition of neutral lipids and phospholipids in tegu lizard Tupinambis merianae fat bodies*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 33 (2): 129–137.
- Vitt, L.J. 1982. *Reproductive tactics of Ameiva ameiva (Lacertilia: Teiidae) in a seasonally fluctuating tropical habitat*. *Canadian Journal of Zoology*, 60: 3113–3120.
- Vitt, L.J. 1991. *Ecology and life history of the wide-foraging lizard Kentropyx calcarata (Teiidae) in Amazonian Brazil*. *Canadian Journal of Zoology*, 69(11): 2791–2799.
- Vitt, L.J. & G.R. Colli. 1994. *Geographical ecology of a Neotropical lizard: Ameiva ameiva (Teiidae) in Brazil*. *Canadian Journal of Zoology*, 72: 1986–2008.
- Vitt, L.J. & T.C.S. Ávila-Pires. 1995. *Ecology of two sympatric species of Neusticurus (Sauria: Gymnophthalmidae) in the Western Amazon of Brazil*. *Copeia*, 1998(3): 570–582.
- Vitt, L.J., P.A. Zani, J.P. Caldwell & E.O. Carrillo. 1995. *Ecology of the lizard Kentropyx pelviceps (Sauria: Teiidae) in lowland rain forest of Ecuador*. *Canadian Journal of Zoology*, 73(4): 691–703.
- Vitt, L.J., P.A. Zani & A.C.M. Lima. 1997. *Heliotherms in tropical rain forest: the ecology of Kentropyx calcarata (Teiidae) and Mabuya nigropunctata (Scincidae) in the Curuá-Una of Brazil*. *Journal of Tropical Ecology*, 13(2): 199–220.
- Weldon, P.J. & D. Bagnall. 1987. *A survey of polar and nonpolar skin lipids from lizards by thin-layer chromatography*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 87(2): 345–349.
- Weldon, P.J., B.S. Dunn, C.A. McDaniel & D.I. Werner. 1990. *Lipids in the femoral gland secretions of the green iguana (Iguana iguana)*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 95: 541–543.
- Weldon, P.J., B. Flachsbarth & S. Schulz. 2008. *Natural products from the integument of nonavian reptiles*. *Natural Product Reports*, 25: 738–756.
- Werneck, F.D.P., L.G. Giugliano, R.G. Collevatti & G.R. Colli. 2009. *Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus Kentropyx (Squamata: Teiidae)*. *Molecular Ecology*, 18(2): 262–278.

- Wilgers, D.J. & E.A. Horne. 2009. *Discrimination of chemical stimuli in conspecific fecal pellets by visually adept iguanid lizard, Crotaphytus collaris*. Journal of Ethology, 27: 157–163.
- Wilson, K. & J. Walker. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7ª edição. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2010. 761 páginas.
- Wyat, T.D. 2010. *Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates*. Journal of Comparative Physiology A, 196: 685–700.
- Wyatt, T.D. *Pheromones and Animal Behavior: Chemical signals and signature mixtures*. 2ª edição. Cambridge, Cambridge University Press. 2014a.
- Wyatt, T.D. 2014b. *Proteins and peptides as chemicals signals and signature mixtures*. Animal Behaviour, 97: 273–280.
- Yanosky, A.A., D.E. Iriart & C. Mercolli. 1993. *Predatory behavior in Tupinambis teguixin (Sauria: Teiidae). I. Tongue-flicking responses to chemical food stimuli*. Journal of Chemical Ecology, 19(2): 291–299.
- Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. 5ª edição. Nova Jersey: Pearson Prentice Hall, 2010. 944 páginas.
- Zozaya, S.M., M. Higgin, C. Moritz & C.J. Hoskin. 2019. *Are pheromones key to unlock cryptic lizard diversity?* The American Naturalist, 2019: 1–41.