

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

ANA VICTÓRIA SALTON CESCA ROSA

ESTIMATIVA ETÁRIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ESQUELETOCROLOGIA DE
UMA POPULAÇÃO DE *LIOLAEMUS ARAMBARENSIS*, LAGARTO ENDÊMICO DO
RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE
2024

ANA VICTÓRIA SALTON CESCA ROSA

ESTIMATIVA ETÁRIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ESQUELETOCRONOLOGIA DE
UMA POPULAÇÃO DE *LIOLAEMUS ARAMBARENSIS*, LAGARTO ENDÊMICO DO
RIO GRANDE DO SUL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas na
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Verrastro

Co-orientadora: Ana Helena da Rosa Paz

PORTO ALEGRE

2024

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA VICTÓRIA SALTON CESCA ROSA

ESTIMATIVA ETÁRIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ESQUELETOCRONOLOGIA DE
UMA POPULAÇÃO DE *LIOLAEMUS ARAMBARENSIS*, LAGARTO ENDÊMICO DO
RIO GRANDE DO SUL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas na
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: Porto Alegre, agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Laura Verrastro

Professora Doutora do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ana Helena da Rosa Paz

Professora Doutora do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências
Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Maikel Rosa de Oliveira

Mestre em Ciências Médicas pela Universidade do Rio Grande do Sul, atua no Laboratório
de Histofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de
Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Márcio Borges Martins

Professor Doutor do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Salton Cesca Rosa, Ana Victória
ESTIMATIVA ETÁRIA ATRAVÉS DA ANÁLISE DE
ESQUELETOCROLOGIA DE UMA POPULAÇÃO DE LIOLAEMUS
ARAMBARENSIS, LAGARTO ENDÊMICO DO RIO GRANDE DO SUL /
Ana Victória Salton Cesca Rosa. -- 2024.
24 f.
Orientadora: Laura Verrastro.

Coorientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Esqueletocronologia. 2. Liolaemus arambarensis.
3. Úmero. I. Verrastro, Laura, orient. II. da Rosa
Paz, Ana Helena, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

O caminho até aqui não foi fácil, mas ter pessoas ao meu lado me auxiliando a percorrê-lo tornou o processo mais leve. Sou muito grata por todos que tive a oportunidade de conhecer ao longo dos anos em que estive na graduação.

Gostaria de agradecer a minha professora orientadora Laura Verrastro por todo o suporte, auxílio e paciência ao longo da realização deste trabalho. Muito obrigada pela sua disponibilidade, por partilhar seus conhecimentos comigo e por despertar meu interesse pela área da Herpetologia. Ter minha professora orientadora próxima a mim fez toda a diferença.

Gostaria de agradecer a minha professora co-orientadora Ana Helena por ter me acolhido e me auxiliado ao longo deste trabalho. Muito obrigada por sempre estar disponível para sanar minhas dúvidas e pelas suas aulas no começo da minha graduação, as quais me fizeram ter interesse em Histologia.

Gostaria de agradecer ao Maikel pela confecção das lâminas histológicas. Seu auxílio foi fundamental para o progresso deste trabalho. Muito obrigada por ter destinado parte do seu tempo para me atender e por ter partilhado seus conhecimentos e técnicas. Obrigada pela cordialidade e paciência em me explicar os processos realizados e meus questionamentos.

Gostaria de agradecer a minha mãe e ao meu pai que são meu alicerce, minha força e minha motivação em todos os âmbitos da minha vida. Vocês são o meu maior exemplo de força, superação e dedicação. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram e seguem fazendo por mim. Nunca esquecerei do empenho, cuidado e comprometimento que vocês dedicaram a mim ao longo dos anos para a minha formação pessoal e profissional. Vocês têm toda a minha admiração e o meu amor mais genuíno.

Gostaria de agradecer aos meus amigos pelos momentos de descontração e lazer aos finais de semana. Gostaria de agradecer as minhas amigas Alanis e Maria Eduarda. Percorrer todos os momentos da graduação ao lado de vocês foi um presente. Muito obrigada pela parceria, por todo o auxílio durante as aulas e pela amizade de vocês.

Gostaria de agradecer a Raquel pelo auxílio com os gráficos deste trabalho. Muito obrigada pela amizade e companheirismo ao longo dos anos. Gostaria de agradecer também ao Giovanni pelo auxílio com as imagens das lâminas histológicas.

Gostaria de agradecer a Deus, minha fé me auxilia e me fortalece.

EPÍGRAFE

“Mucha gente pequeña, en lugares pequeños, haciendo cosas pequeñas, pueden cambiar el mundo.”

- Eduardo Galeano

RESUMO

A avaliação etária é importante, pois ela pode ajudar no entendimento de parâmetros relacionados a história de vida da espécie, associando-a a sua conservação. Além disso, é possível associar a idade do indivíduo com seus períodos de maturidade sexual, ciclo de vida e ciclo reprodutivo. Existem alguns métodos para determinação etária, dentre os quais está a esqueletocronologia. A sua realização implica no uso de ossos longos ou falanges proximais ou distais de animais. Esse método compreende as Linhas de Crescimento (LAG), as quais são observadas ao longo do crescimento do osso. O nosso objetivo é a descrição da aplicabilidade desse método para uma espécie de lagarto *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO *et al.*, 2003, considerada Em Perigo (EN) (IUCN; ICMBIO 2024) e endêmica do Rio Grande do Sul. Foram utilizados 10 indivíduos machos, sendo 8 jovens e 2 adultos. O úmero, osso longo dos indivíduos, foi removido, dissecado e processado para análise histológica. Devido a restrição de número de indivíduos nossa análise qualitativa nos demonstrou que o indivíduo adulto (CRC= 51,68mm) apresentou uma única LAG. Notamos que conforme o animal cresce de tamanho, comprimento rostro-cloacal (CRC), o comprimento e diâmetro do úmero aumentam. Além disso, com a análise das lâminas histológicas verificou-se que a área da cavidade medular do osso, bem como a espessura do osso tiveram um aumento.

PALAVRAS-CHAVE: Esqueletocronologia, úmero, *Liolaemus arambarensis*

ABSTRACT

Age assessment is important as it can help understand parameters related to the life history of the species, associating it with its conservation. Furthermore, it is possible to associate the individual's age with their periods of sexual maturity, life cycle and reproductive cycle. There are some methods for determining age, including skeletonchronology. It's performance involves the use of long bones or phalanges near or far from animals. This method comprises the Lines of Arrest Growth (LAG), which are observed throughout the growth of the bone. Our objective is to describe the applicability of this method to a species of lizard *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO *et al.*, 2003, considered Endangered (EN) (IUCN; ICMBIO 2024) and endemic to Rio Grande do Sul. 10 male individuals were used, 8 young and 2 adults. The humerus, the individuals' long bone, was removed, dissected and processed for histological analysis. Due to the restriction on the number of individuals, our qualitative analysis showed that an adult (CRC= 51,68mm) presented one single LAG. We noticed that as the animal grows in size, rostrum length, or humerus' diameter and length increase. Furthermore, with the analysis of the histological slides it was provided that the area of the medullary cavity of the bone as well as the thickness of the bone increased.

KEY WORDS: Skeletonchronology, humerus, *Liolaemus arambarensis*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	14
DISCUSSÃO.....	19
REFERÊNCIAS.....	24

INTRODUÇÃO

O estabelecimento da idade de um organismo é uma informação essencial quando ela é atribuída a conservação e a dinâmica populacional, principalmente em espécies ameaçadas. (Gillespie, 2011; Yang *et al.*, 2011). A avaliação etária pode auxiliar no entendimento da história de vida da espécie e suas estratégias (Yang *et al.*, 2011). Pode-se utilizar esse parâmetro em estudos de biologia reprodutiva, associando a idade dos indivíduos com seus períodos de maturidade sexual, ciclo reprodutivo e ciclo de vida (Laver *et al.*, 2012). Além de existir divergência entre machos e fêmeas (Olsson & Shine, 1996; Tsiora & Kyriakopoulou-Sklavounou, 2002; Laver *et al.*, 2012), é possível saber a longevidade e padrão de crescimento de organismos, os quais podem variar de acordo com o ambiente e com suas histórias de vida (Caley & Schwarzopf, 2004; Roitberg & Smirina, 2006; Gillespie, 2011). Os lagartos param de crescer na vida adulta; diferente de outros répteis, mas assim como outros Squamata possuem crescimento determinado (Pough *et al.*, 2013). Sabe-se que animais que, comumente, vivem mais, são aqueles que crescem de forma gradual e lenta (Castanet & Smirina, 1990). Embora, lagartos vivam por um curto período, se comparado a outros répteis. Dessa maneira, a relação entre tamanho e longevidade pode ser estabelecida (Castanet, 1994).

Existem métodos distintos para avaliação etária. É possível fazer a medição de uma grande quantidade de indivíduos e utilizar os dados para realização de um gráfico de tamanho-frequência. Outro método empregado é a marcação e a recaptura de animais (Halliday & Verrell, 1988), que consiste na marcação do animal para reconhecimento posterior, ao longo do seu desenvolvimento, seja através de fotoidentificação (Ribeiro, 2017) ou *toe-clipping*, no qual uma ou mais falanges terminais de membros inferiores ou posteriores são retiradas. Este método também possibilita a coleta de tecido ósseo que pode ser usado para avaliação da idade da espécie (Castanet & Smirina, 1990; Santoyo-Brito *et al.*, 2018) e é o menos estressante para o indivíduo (Perry *et al.*, 2011). Contudo, é um método laborioso, que requer longo período de estudo (Castanet & Smirina, 1990).

A esqueletocronologia é um método alternativo e útil, o qual utiliza ossos, para determinar a taxa de crescimento etário e determinar a idade de um réptil. (Halliday & Verrell, 1988; Castanet & Smirina, 1990). Nele existe a possibilidade de utilização da falange do animal ou de ossos longos (Castanet & Smirina, 1990), os quais requerem a morte dos indivíduos (Comas *et al.*, 2016). A estrutura dos ossos é formada no seu

desenvolvimento, mas os ossos são capazes de serem renovados através de deposição e de reabsorção de matriz óssea. Existem processos de formações ósseas distintas (Romer & Parsons, 1985). No desenvolvimento endocondral o osso se forma a partir de um molde cartilaginoso e pode-se observar a diáfise e as epífises, na periferia. (Kardong, 2016). Tem-se o estágio cartilaginoso, seguido da deposição de osso endocondral e pericondral. O osso endocondral é reabsorvido e surge uma cavidade medular. Essa cavidade segue aumentando, ao longo do crescimento, no qual ocorre a deposição periférica e a reabsorção na região central. (Romer & Parsons, 1985). A esqueletocronologia é utilizada para determinar ciclos sazonais que existem ao longo do crescimento do osso (Castanet, 1994), as chamadas Linhas de Crescimento Interrompido, (LAG do inglês Lines of Arrested Growth). As LAGs podem ser identificadas em seções transversais dos ossos, onde amplas linhas representam o período de crescimento e linhas estreitas representam uma pausa no crescimento. Assim cada linha estreita caracteriza um ano de crescimento, permitindo estimar a idade dos indivíduos. (Castanet & Smirina, 1990; Brum *et al.*, 2019).

O *Liolaemus arambarensis* VERRASTRO *et al.*, 2003, pertencente à família Liolaemidae (Frost *et al.*, 2001), clado Iguania e Ordem Squamata (Estes *et al.* 1988). É uma espécie endêmica das margens da Lagoa dos Patos, no Rio Grande do Sul, associada aos ambientes de restinga. Possui uma distribuição muito restrita entre o município de Viamão (**30° 5' S, 51° 1' W**) até Arambaré (**30° 55' S, 51° 30' W**), no Rio Grande do Sul (Verrastro *et al.* 2003). (Figura 1)

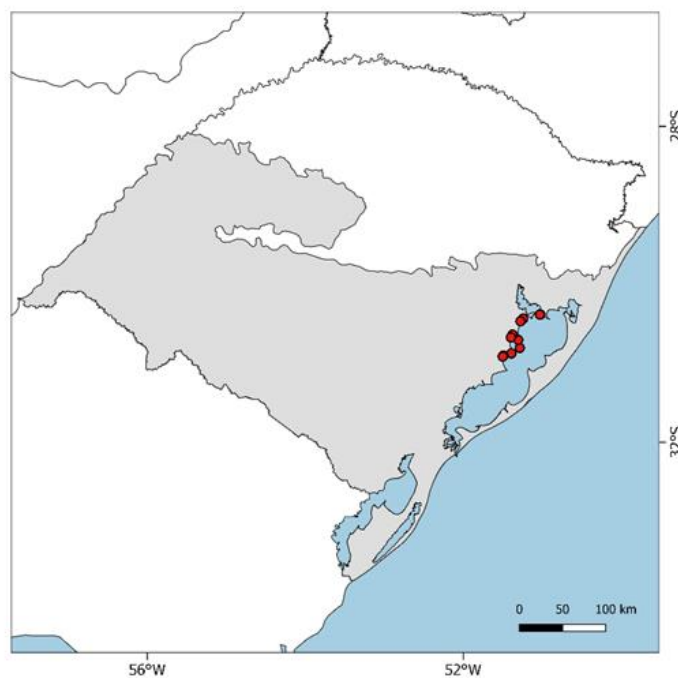


Figura 1. Distribuição geográfica de *Liolaemus arambarensis*, espécie de lagarto endêmico do Rio Grande do Sul.

A região dispõe de solo arenoso, no qual o lagarto, devido à sua coloração dorsal críptica, consegue ser confundido com o substrato. Os indivíduos usam a cabeça e as patas para enterrar-se na areia (Verrastro, 2001); todavia, a espécie não constrói tocas divergindo de *L. occipitalis* (Verrastro & Bujes, 1998). Existe dimorfismo sexual, evidenciado pela diferença na coloração, no tamanho entre machos e fêmeas, bem como pelo número de poros na cloaca (Verrastro, 2003). A espécie é ovípara e apresenta ciclo reprodutivo anual e sazonal, relacionado com os fatores climáticos e a disponibilidade de alimento. Sua dieta apresenta variação, o jovem apresenta dieta carnívora e o adulto dieta onívora. Assim, *L. arambarensis* é identificado como um predador oportunista e generalista (Verrastro, 2001). (Figura 2)



Figura 2. Indivíduo de *Liolaemus arambarensis* no ambiente natural. Autoria da imagem Márcio Borges Martins.

A espécie é considerada Em Perigo (EN) (IUCN; ICMBIO 2024) e requer ações visadas a sua conservação (Martins *et al.* 2017; Verrastro, 2001). A determinação etária é importante para estudos populacionais, especialmente em espécies ameaçadas (Yang *et al.* 2011; Santoyo-Brito *et al.*, 2018). Entender a dinâmica da população contribui para a conservação e manejo (Sutherland, 2006; Comas *et al.*, 2016). Ademais, saber a expectativa de vida natural, a taxa de crescimento, bem como a maturidade sexual é possível através de um método fidedigno que é a esqueletocronologia (Castanet & Smirina, 1990; Castanet, 1994). Entretanto, a técnica ainda não foi validada para esta espécie.

Dessa forma, o nosso objetivo é a descrição da aplicabilidade do método de esqueletocronologia para a avaliação etária em indivíduos machos de *L. arambarensis*. Nossos objetivos específicos envolvem aplicar a técnica de esqueletocronologia, estimar a idade dos indivíduos através da contagem de linhas de crescimento, além de relacionar a estrutura etária com o comprimento rostro-cloacal e diâmetro do úmero de machos adultos e jovens.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e preparação dos exemplares

Os indivíduos utilizados encontram-se depositados na Coleção Zoológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Eles foram coletados em maio de 2021 (lote: 7816, Coleção Científica do Laboratório de Herpetologia- UFRGS) e foram fixados em formol (10%) e preservados em álcool 70%. Os lagartos foram originalmente coletados para análises fisiológicas. Nós utilizamos 10 indivíduos machos, sendo 8 jovens e 2 adultos. Todos já haviam sido sexados, pesados e medidos no momento da coleta. Os indivíduos foram mantidos em álcool. Todos foram medidos para avaliação de comprimento rostro-cloacal com um paquímetro digital Mitutoyo com precisão de 0,02mm. Para a análise das LAGs dissecamos o úmero dos lagartos, que é um osso longo, e pode ser utilizado de forma satisfatória no método da esqueletocronologia (Castanet & Smirina, 1990).

O osso foi mantido em álcool 70% até o momento de início do processamento histológico. Realizamos medidas de comprimento e diâmetro do úmero. Para a descalcificação usamos ácido nítrico 3% e 4%. Verificando-se a cada 30 minutos a consistência do osso. Quanto maior é a concentração de ácido nítrico, mais rápida é a descalcificação. Seu desenvolvimento teve duração variável de 50 minutos a uma hora, dependendo do tamanho da amostra. Finalizado o processo e avaliada a consistência do osso, deu-se início ao processamento histológico. O material foi lavado para retirar resíduo de ácido nítrico. Foram realizados banhos sequenciais de álcool 80% a 100% para desidratação da peça. Finalizada essa sequência, a amostra foi submetida a banhos. Foram feitos três banhos de Xilol, com duração em torno de 45 minutos cada banho, para clarificação do osso, viabilizando a confecção do bloco. O material foi emblocado para posterior corte. Os cortes foram realizados em micrótomo, com espessura de 5 micrômetros. A diáfise foi seccionada transversalmente em sua região central para melhor visualização das linhas de crescimento (Castanet & Smirina, 1990).

Para padronização da técnica foram empregadas duas colorações histológicas: a coloração de Hematoxilina e Eosina ou HE que diferencia componentes basófilos e acidófilos, e a coloração de azul de Toluidina que destaca componentes de matriz extracelular (Junqueira, 2017).

Aquisição das fotomicrografias e análise das imagens.

As lâminas histológicas foram fotografadas em microscópio ótico marca Zeiss acoplado a uma câmera marca AxioCam MRc. Foram realizadas fotomicrografias em lente objetiva de 10x. Para análise das imagens foi utilizado o programa Autocad. Na imagem foram analisadas e quantificadas as LAGs, a espessura do osso e a área da cavidade medular.

Análise dos dados

Foi desenvolvida uma análise quantitativa relacionando o comprimento rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos com o comprimento e diâmetro de seus respectivos úmeros e análise qualitativa na visualização da idade do indivíduo por LAGs. A partir das medições dos indivíduos foi realizada uma regressão linear entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento do osso longo úmero e entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e o diâmetro do úmero. Ademais, foram feitas medidas da área da cavidade medular e da espessura do osso.

RESULTADOS

Preparação histológica

A partir do protocolo utilizado foi possível padronizar o preparo histológico das peças utilizando ácido nítrico 4% para descalcificação. Sendo padronizado o tempo de aproximadamente 45 minutos para a completa descalcificação da matriz. Inicialmente, a coloração hematoxilina-eosina foi aplicada para coloração das lâminas histológicas confeccionadas. Após realização de teste comparativo entre as lâminas coradas com hematoxilina-eosina e com azul de Toluidina, verificamos que a coloração com azul de Toluidina promoveu melhor visualização. A escolha da coloração resultante deu-se a partir da dificuldade de observação das estruturas presentes no tecido. A lâmina corada com hematoxilina-eosina não mostrou aparente contraste, impossibilitando a diferenciação das constituintes do osso (Figura 3). Já a coloração azul de Toluidina proporcionou um contraste visual nítido. (Figura 4)



Figura 3. Lâmina histológica corada com hematoxilina-eosina.

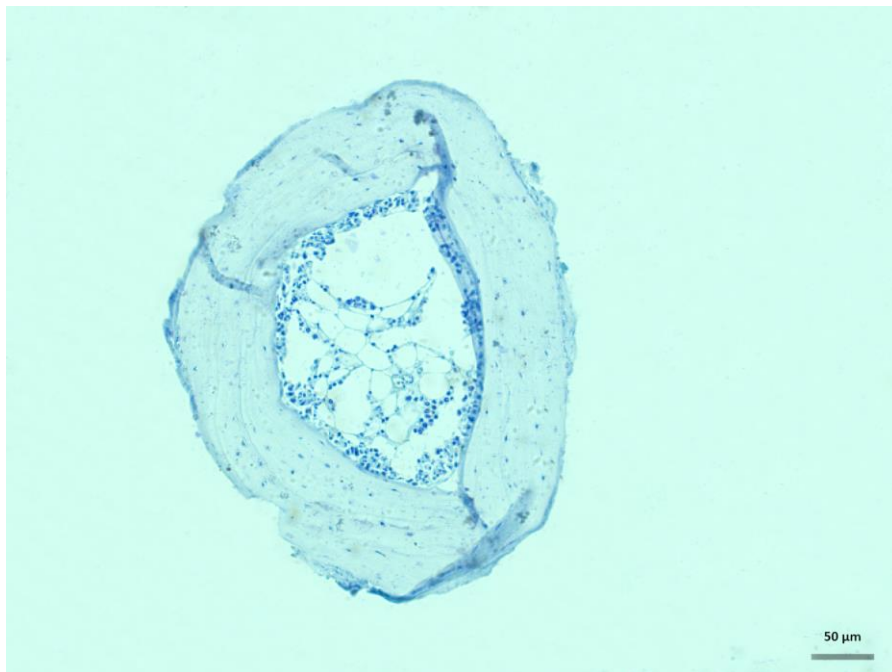


Figura 4. Lâmina histológica corada com azul de Toluidina.

Obtenção de dados

O método da esqueletocronologia pode trazer situações adversas (Castanet, 1994). Na obtenção de ossos longos, satisfatórios no curso da técnica (Castanet & Smirina, 1990), nós tínhamos duas opções: o fêmur ou o úmero de indivíduos *L. arambarensis*. Dispunhamos na coleção zoológica de animais coletados em diferentes anos, mais antigos e mais recentes. No

período de teste do processo de descalcificação foi percebido que o desconhecimento do protocolo originalmente utilizado para a fixação dos animais, bem como os diferentes tempos de coleta são quesitos que podem impactar de forma importante o desenvolvimento da técnica. Em algumas amostras, etapas do processo histológico foram comprometidas, impossibilitando, inclusive, o emblocamento dos tecidos, devido a consistência do osso. Entretanto, foi observado que ao utilizar indivíduos coletados em um mesmo período, tendo mesma fixação, o estabelecimento do preparo foi alcançado, o que confirma a necessidade de padronização no protocolo utilizado para conservação da peça (falange, fêmur, úmero) ou mesmo do corpo do animal. A dificuldade na preparação das amostras levou a redução no número de amostras de animais adultos $CRC \geq 45mm$ (Verrastro, 2001). Dessa forma o estudo analisou lâminas histológicas de 2 animais adultos e 8 jovens coletados no período de maio de 2021.

Visualização das lâminas histológicas

Nas imagens histológicas de úmero foi possível visualizar a presença da cavidade medular ao centro, contendo osteoblastos e a matriz óssea. Conforme o indivíduo cresce, a cavidade medular pode ser erodida. Além disso, pode ocorrer na periferia da cavidade medular a reabsorção endosteal (Castanet & Smirina, 1990), que pode ser avaliada, (Ergül *et al.*, 2014) e isso é capaz de dificultar a contagem dos anos iniciais dos indivíduos (Castanet & Smirina, 1990).

Análise de dados

Obtivemos o tamanho do comprimento rostro-cloacal de cada indivíduo, bem como o comprimento e diâmetro do respectivo úmero. Nossa perspectiva era conseguir fazer uma curva de longevidade relacionada com a estrutura etária dos indivíduos. Devido a complexidade envolvida na técnica de retirada e preparação dos ossos, obtivemos um número de amostras abaixo do esperado, o que inviabilizou a realização de análise de dados quantitativa da estrutura etária da população. Desenvolvemos uma análise quantitativa relacionando o comprimento rostro-cloacal (CRC) dos indivíduos com o comprimento e diâmetro de seus respectivos úmeros e realizamos uma análise qualitativa na visualização da idade do indivíduo.

Comparação entre CRC e métricas do úmero

A partir das medições dos indivíduos estabelecidas foi realizada uma regressão linear entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento do osso úmero e entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e o diâmetro do úmero. A partir da análise morfométrica do úmero dos indivíduos, foi possível através da regressão linear entre comprimento rostro-cloacal (CRC) e comprimento do osso longo úmero, obter uma correlação positiva nas duas situações, isto é, quanto maior o CRC maior o comprimento do úmero e quanto maior o CRC maior o diâmetro do osso analisado (Tinkle *et al.* 1970). (Figura 5; Figura 6)

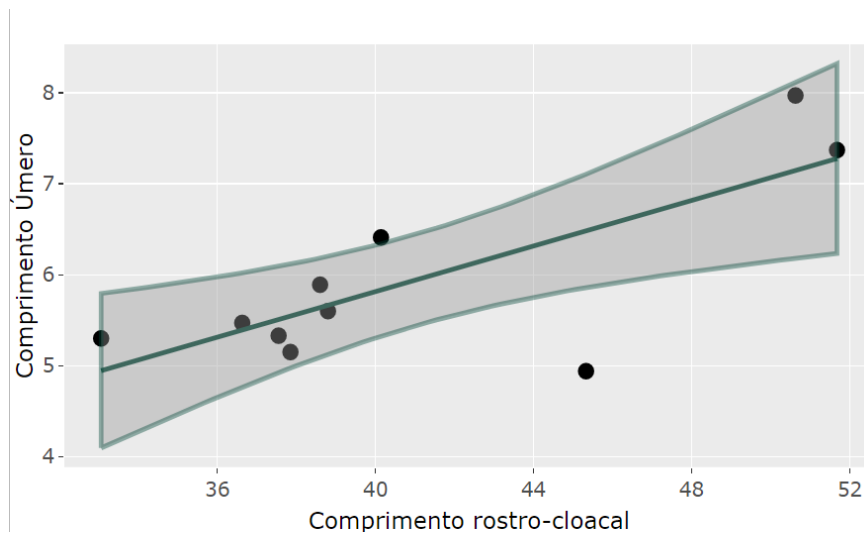


Figura 5. Regressão Linear. Comparação comprimento rostro-cloacal (mm) com comprimento do úmero (mm).

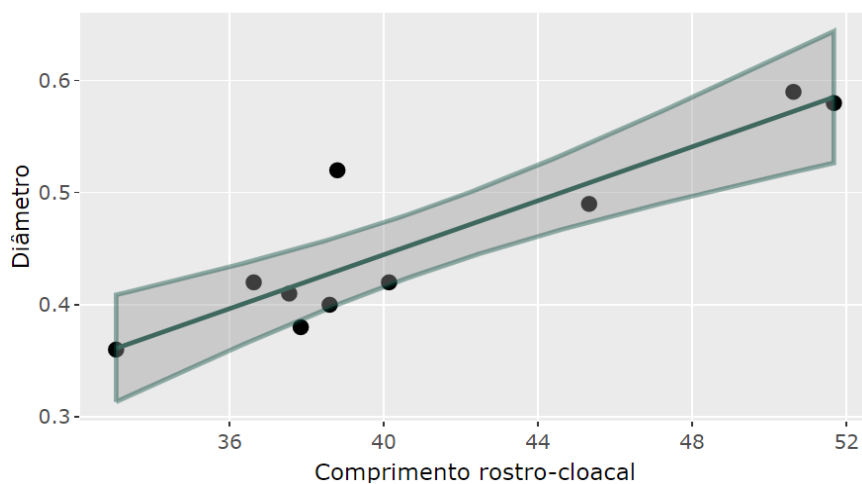


Figura 6. Regressão linear. Comparação comprimento rostro-cloacal (mm) com diâmetro do úmero (mm).

Foi realizada uma matriz das variáveis que mostrou forte correlação entre as métricas relacionadas, as quais foram comprimento do osso longo úmero, comprimento rostro-cloacal em milímetros e diâmetro do úmero. (Figura 7)

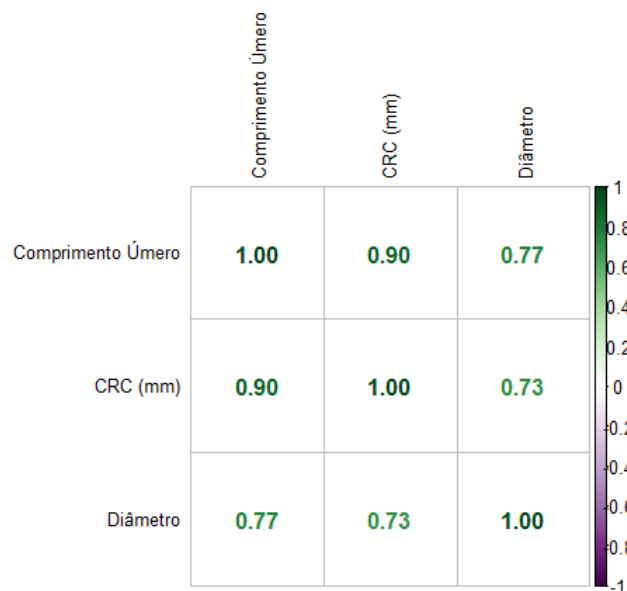


Figura 7. Matriz das variáveis: comprimento do úmero, CRC (mm) e diâmetro.

Análise das linhas de crescimento

Em relação a análise das linhas de crescimento, o úmero de um indivíduo macho adulto, portando CRC 51,68 mm, possuía uma LAG. Ela demonstrou-se compatível com o seu crescimento, pois um indivíduo com esse comprimento, coletado em maio de 2021, deveria ter em torno de um ano e meio de idade (Verrastro, 2001). Dessa forma, ao analisarmos a lâmina histológica desse exemplar, notamos sua cavidade medular, a matriz óssea, bem como uma LAG. (Figura 8)

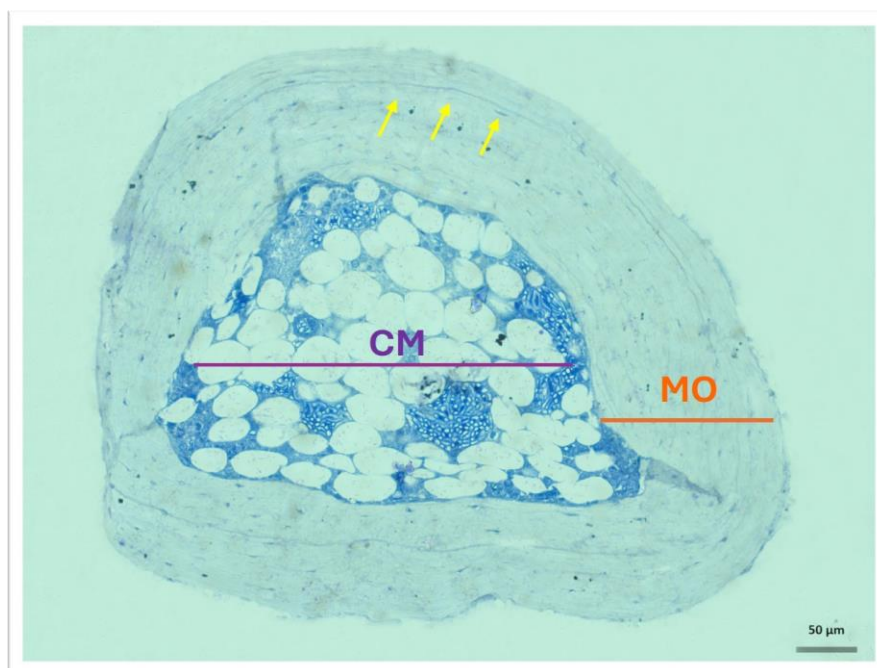


Figura 8. Corte histológico do úmero de indivíduo de porte 51,68mm. CM= cavidade medular, MO= matriz óssea. As setas amarelas indicam uma linha de crescimento (LAG).

Infelizmente o número amostral não proporcionou uma adequada avaliação, uma vez que a maioria dos exemplares eram considerados jovens, comprimento rostro-cloacal (CRC) \leq 45mm (Verrastro, 2001), logo ainda não apresentavam nenhuma LAG. A espécie chega à idade adulta no primeiro ano de vida, sendo adulto na estação reprodutiva seguinte ao nascimento (Verrastro *et al.* 2003). Dessa forma, a maioria dos indivíduos estudados ainda não apresentavam LAGs, uma vez que não tinham completado um ano de vida. Por essa razão, o número limitado de animais que apresentaram LAGs não permitiu a realização de análise estatística para confirmar se as LAGs são uma boa ferramenta para estimar as suas idades.

DISCUSSÃO

A linha de crescimento relaciona-se com periodicidade, acontecendo de modo anual (Castanet, 1994). Animais jovens podem não ter completado um ciclo de crescimento, portanto não apresentam LAGs. No presente estudo, dificuldades na técnica de descalcificação do tecido, associadas ao tempo e ao protocolo de preservação dos espécimes reduziram o número de animais adultos. Com base no CRC a grande maioria dos exemplares eram considerados jovens, CRC \leq 45mm (Verrastro, 2001), logo ainda não apresentavam nenhuma LAG. Dessa forma, justifica-se a não visualização de LAGs nas lâminas histológicas de úmero desses animais.

A preferência pelo uso de machos, devido a estação reprodutiva das fêmeas, estreitou nossa possibilidade de uso de exemplares. Além disso, a utilização do úmero deu-se a ausência de outro osso longo nos indivíduos coletados e depositados na coleção no período de maio de 2021, pois já haviam sido utilizados anteriormente. Torna-se importante ressaltar ainda que foram enfrentados obstáculos durante a preparação e confecção das lâminas histológicas. Dificuldades antecedentes surgiram na preparação do osso e montagem da lâmina histológica. Inicialmente, foram feitos testes utilizando ossos de animais depositados na coleção zoológica a mais de 20 anos. O curso do tempo foi um impeditivo no estabelecimento de um protocolo para confecção das lâminas histológicas. A consistência desses após a descalcificação não foi adequada para utilização no estudo. Dessa forma, urgiu a necessidade de utilização de ossos coletados em anos recentes, visando o desenvolvimento de um protocolo histológico que pudesse ser seguido da mesma forma na totalidade das peças. Por essa razão, a quantidade de indivíduos jovens ficou notória possivelmente impactando na detecção de LAGs. Dessa forma destaca-se a importância da adequada

preservação da amostra biológica para melhor aproveitamento na análise de tecidos visando sua utilização para estimativa de idade.

Além disso, a remodelação do osso pode dificultar a contagem das linhas de crescimento (LAG), uma vez que pode alterar o padrão dessas linhas (Castanet & Smirina, 1990). Visto que, em nossos exemplares, não conseguimos contabilizar mais de uma linha de crescimento, nos dedicamos à visualização de diferenças nas lâminas histológicas de indivíduos jovens e adultos. Podemos notar que em indivíduos mais jovens a cavidade medular é menor e ela vai aumentando conforme ocorre o remodelamento ósseo (Figura 9). A deposição periférica implica em um aumento do osso. (Figura 10)

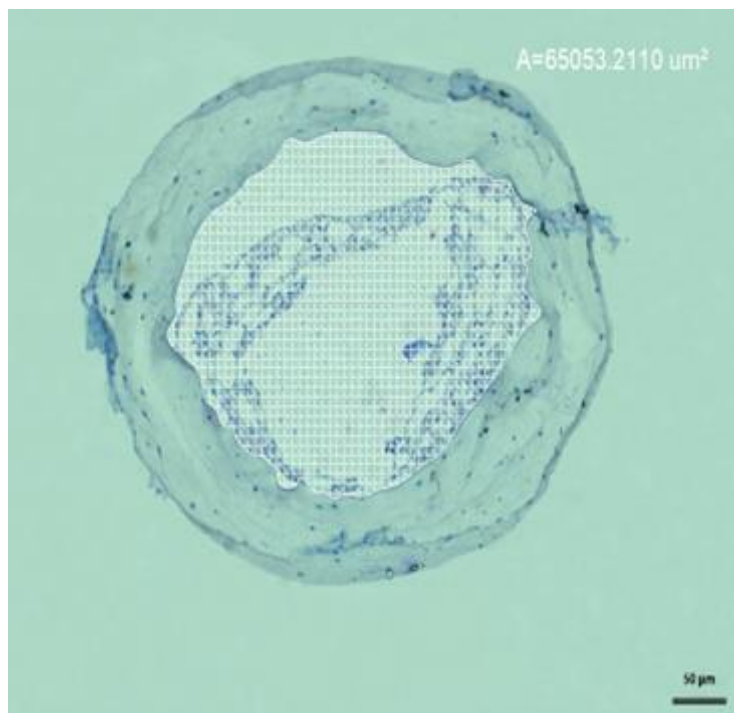


Figura 9. Área da cavidade medular de um indivíduo jovem (CRC= 26,60mm).

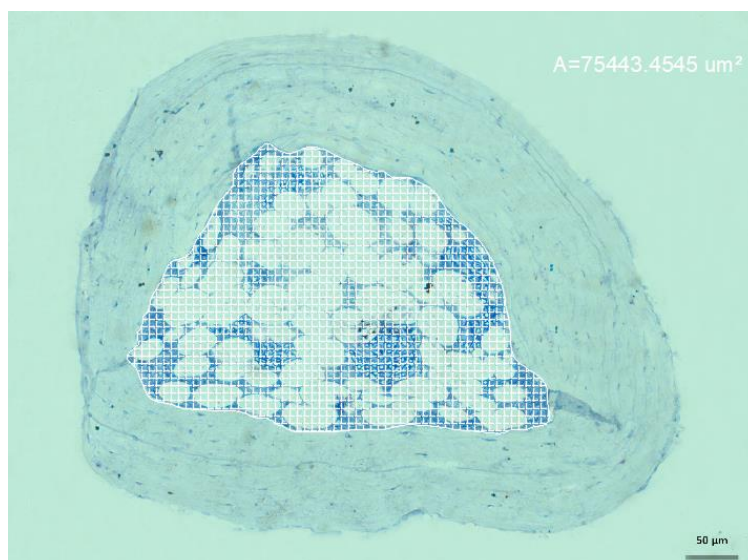


Figura 10. Área da cavidade medular de um indivíduo adulto (CRC= 51,68mm).

Além disso, a espessura do osso aumentou conforme o indivíduo aumentou de tamanho, visto que a espessura do osso do indivíduo jovem (CRC= 26,60mm) é menor do que a espessura do osso do indivíduo adulto (CRC= 51,68mm) (Figura 11; Figura 12). A comparação entre machos e fêmeas é válida para observar se esse aumento se mantém entre os distintos sexos.

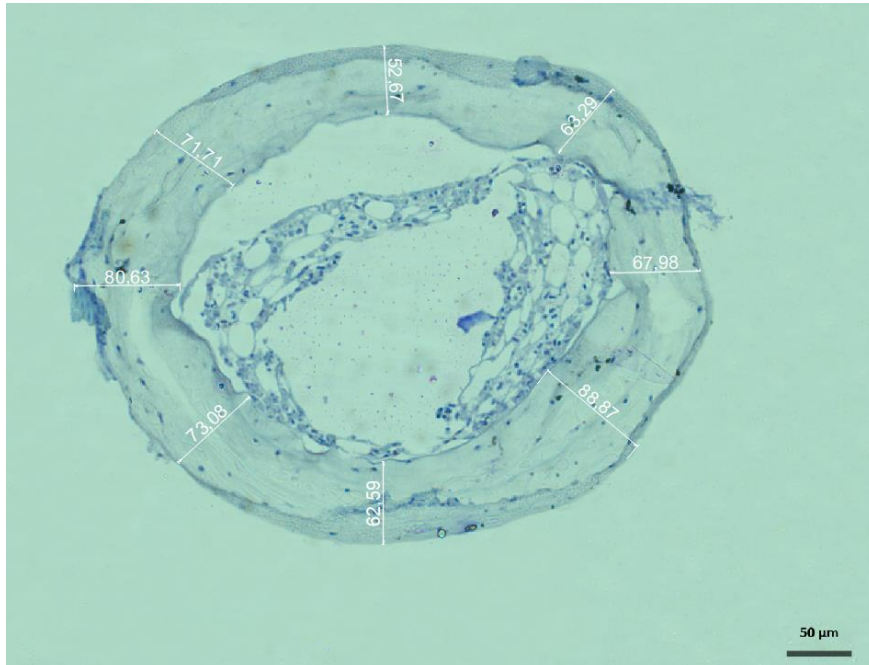


Figura 11. Espessura do úmero de indivíduo jovem (CRC=26,60mm).

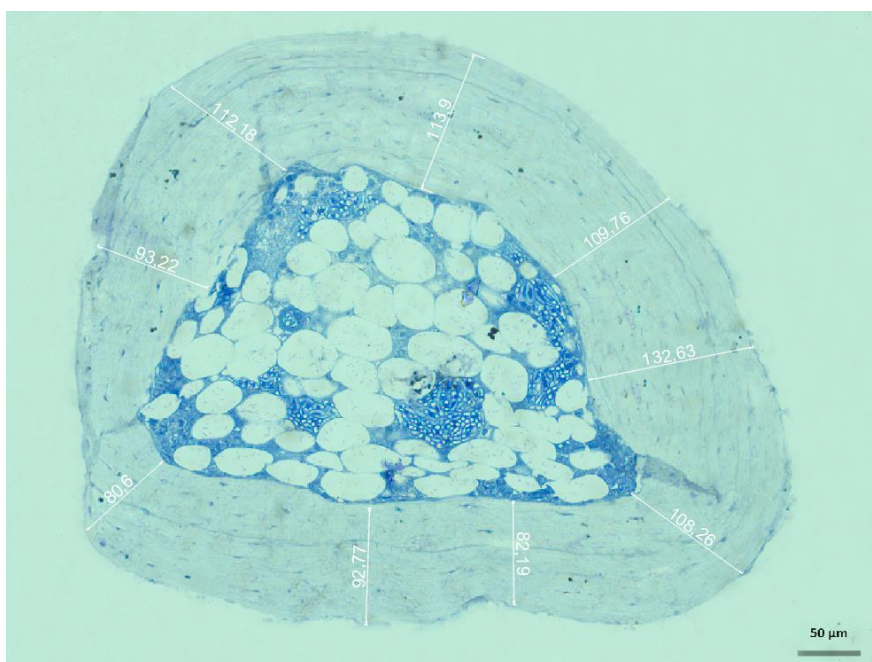


Figura 12. Espessura do úmero de indivíduo adulto (CRC= 51,68mm).

As linhas de crescimento propiciam o entendimento de fatores como idade de maturidade sexual e taxa de crescimento (Castanet, 1994). Dessa forma, tratar informações obtidas através da esqueletocronologia e informações obtidas através de método de marcação e recaptura podem trazer dados úteis (Santoyo-Brito *et al.*, 2018). O método de esqueletocronologia é acurado, mas sua utilização deve-se apresentar cautela ao ser aplicada em animais ameaçados (Santoyo-Brito *et al.*, 2018). O uso de ossos de falanges proximais ou terminais pode ser uma alternativa satisfatória no emprego do método da esqueletocronologia, uma vez que, o animal consegue permanecer vivo durante o estudo (Tuğba *et al.* 2014, Yakin *et al.*, 2015). Embora, uma comparação entre falange e osso longo em relação as suas linhas de crescimento seria interessante, visto que as linhas de crescimento podem ocorrer de maneira disitista em ossos diferentes (Castanet, 1994).

A remodelação óssea pode estar relacionada com condições advindas do ambiente em que os indivíduos estão inseridos (Smirina, 1972). A reprodução de *L. arambarensis* é anual, primavera-verão. Ademais, a localidade em que a espécie se encontra possui variação de fotoperíodo e temperatura ao longo do ano, impactando na sua reprodução. A precipitação também pode influenciar, bem como a oferta de alimento (Verrastro, 2001). Dessa maneira, somente a visualização da lâmina histológica de um corte de osso de um indivíduo não é capaz de fornecer a totalidade da informação em relação a idade do indivíduo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um número maior de indivíduos permitiria a realização de cálculos estatísticos, que nos possibilitariam vislumbrar o ritmo de crescimento da espécie. Além disso, a comparação entre machos e fêmeas, com as suas singularidades, como as ninhadas das fêmeas, poderiam trazer distinções. Embora, machos e fêmeas chegam a maturidade sexual na primeira estação depois de nascer (Verrastro, 2001), observar as diferentes características nas lâminas histológicas seria crucial. O desejo posterior é incorporar maior número de indivíduos adultos no estudo e poder estabelecer métricas importantes, como o ritmo de crescimento, bem como a estimativa de longevidade da espécie, com posterior avaliação junto da marcação e recaptura de indivíduos.

REFERÊNCIAS

- Brum, A.J.C., Loebens, L. Dos Santos, M.B., Cechin, S.Z. First record of growth rings for 11 native subtropical anuran species of South America. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 04, p. e20190154, 2019.
- Caley, M.J., Schwarzkopf, L. 2004. Complex growth rate evolution in a latitudinally widespread species. **Evolution** 58: 862- 869.
- Castanet, J., 1994. Age estimation and longevity in reptiles. **Gerontology** 40, 174–192.
- Castanet, J., Smirina, E.M., 1990. Introduction to the skeletochronological method in amphibians and reptiles. **Annales des Sciences Naturelles, Zoologie**. 13(11): 191-196.
- Comas, M., Reguera, S., Zamora-Camacho, F.J., Salvadó, H., Moreno-Rueda, G. 2016. Comparison of the effectiveness of phalanges vs. humeri and femurs to estimate lizard age with skeletochronology. **Animal Biodiversity and Conservation** 39(2): 237-240.
- Ergül, T., Özdemir, N., Gül, Ç., Tosunoglu, M. 2014. Variation in body size and age structure of *Stellagama stellio* (L., 1758) (Reptilia: Agamidae) from Turkey. **Acta Zoologica Bulgarica** 66(1): 65-72.
- Estes, R., Queiroz, K., Gauthier, J. 1988. **Phylogenetic relationships within Squamata**. In: Estes, R., Pregill, G. Phylogenetic relationships of lizard familie. Essaus commemorating Charles L. Camp. EUA: Stanford University Press. pp 119-258.
- Frost, D.R. Etheridge, R., Janies, D., Titus, T.A. 2001. Total evidence, sequence alignment, evolution of polychrotid lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). **American Museum of Natural History** 3343, pp 38.
- Gillespie, G. R. 2011. Life history variation in the spotted tree frog, *Litoria Spenceri* (Anura: Hylidae), from southeastern Australia. **Herpetologica** 67(1): 10-22.
- Halliday, T.R. e Verrell, P.A. 1988. Body side and age in amphibians and reptiles. **Journal of Herpetology** 22(3): 253-265.
- Junqueira, L.C.U. 2017. **Histologia básica: texto e atlas**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Kardong, K.V. 2016. **Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Laver, R.J., Purwandana, D., Ariefiandy, A., Imansyah, J., Forsyth, D., Ciofi, C., Jessop, T.S. 2012. Life- History and Spatial Determinants of Somatic Growth Dynamics in Komodo Dragon Populations. **PLoS ONE** 7(9): e45398.
- Martins, L.F., Guimarães, M., Verrastro, L. 2017. Population estimates for the sand lizard *Liolaemus arambarensis*: contributions to the conservation of an endemic species of Southern Brazil. **Herpetologica** 73(1): 55-62.
- Olsson, M., Shine, R. 1996. Does reproductive success increase with age or with size in species with indeterminate growth? A case study using sand lizards (*Lacerta agilis*). **Oecologia** 105: 175-178.
- Perry, G., Wallace, M.C., Perry, D., Curzer, H., Muhlberger P. 2011. Toe Clipping of Amphibians and Reptiles: Science, Ethics, and the Law. **Journal of Herpetology** 45(4): 547-555.
- Pough, F.H., Janis, C.M., Heiser, J.B. 2013. **A vida dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu.

- Ribeiro, T.M. 2017. **Fotoidentificação em *Liolaemus arambarensis* (Sauria, Liolaemidae), lagarto endêmico da Lagoa dos Patos, RS.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Brasil. pp 27.
- Roitberg, E.S. e Smirina, E.M. 2006. Age, body size and growth of *Lacerta Agilis Boemica* and *L. strigata*: a comparative study of two closely related lizard species based on skeletochronology. **Herpetological Journal** 16: 133-148.
- Romer, A.S. e Parsons, T.S. 1985. **Anatomia comparada dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu.
- Santoyo-Brito, E., Fox, S.F., Núñez, H. 2018. Age estimation through skeletochronology and mark-recapture of free-living *Liolaemus leopardinus* (Squamata: Liolaemidae) from Chile. **Phyllomedusa** 17(1): 101-112.
- Smirina, E.M. 1972. Annual layers in bones of *Rana temporaria*. **Zoolicheskii Zhurnal** 51: 1529-1534.
- Sutherland, W.J. 2006. **Ecological Census Techniques.** New York: Cambridge University Press.
- Tinkle, D.W., Wilbur, H.M., Tilley, S.G. 1970. Evolutionary Strategies in Lizard Reproduction. **Evolution** 24 (1): 55-74.
- Tsiora, A., Kyriakopoulou- Sklavounou P. 2002. A skeletochronological study of age and growth in relation to adult size in the water frog *Rana epeirotica*. **Zoology** 105: 55-60.
- Tuğba, E., Nurhayat, Ö., Çiğdem, G., Tosunoğlu, M. Variation in Body Size and Age Structure of *Stellagama stellio* (L., 1758) (Reptilia: Agamidae) from Turkey. 2014. **Acta Zoologica**. Bulgarica, 66 (1): 65-72.
- Verrastro, L. 2001. **Descrição, estratégia reprodutiva e alimentar de uma nova espécie do gênero *Liolaemus* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. (Iguania: Tropicuridae).** Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. Brasil. pp 223.
- Verrastro, L. e Bujes, C.S. 1998. Ritmo de atividade de *Liolaemus occipitalis* Boulenger, 1885 (Sauria, Tropicuridae) na Praia de Quintão, RS- Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia** 15(4): 913-920.
- Verrastro, L., Veronese, L., Bujes, C., Dias Filho, M.M. 2003. A new species of *Liolaemus* from Southern Brasil (Iguania: Tropicuridae). **Herpetologica** 59(1): 105-118.
- Yakin, B.Y., Çiçek, K., Koyun, M., Gürken, M., Hayretdağ, S., Tok, C.V. 2015. A skeletochronological analysis of a population of the Anatolia Newt, *Neurergus strauchii* (Steindachner, 1887) (Caudata: Salamandridae), in Eastern Anatolia, Turkey. **Zoology in the Middle East** 61: 332-338.
- Yang, W., Liu, C., Jiang, J., Li, C., Xie, F. 2011. Age structure of females in a breeding population of *Echinotriton chinhaiensis* (Caudata: Salamandridae) and its conservation implication. **Asian Herpetological Research** 2(2): 91-96.