

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

Fernanda Pereira Silva

ASPECTOS MORFOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DIMORFISMO SEXUAL EM
FILHOTES DE *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (CROCODYLIA: ALLIGATORIDAE) NA
RESERVA DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL MAMIRAUÁ, AMAZONAS

Juiz de Fora

2018

Fernanda Pereira Silva

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DIMORFISMO SEXUAL EM
FILHOTES DE *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (CROCODYLIA: ALLIGATORIDAE)
NA RESERVA DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL MAMIRAUÁ,
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Bernadete Maria de Sousa

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pereira Silva, Fernanda .

Aspectos morfológicos associados ao dimorfismo sexual em filhotes de *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (Crocodylia: Alligatoridae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas / Fernanda Pereira Silva. -- 2018.
38 f. : il.

Orientadora: Bernadete Maria de Sousa
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2018.

1. Biologia Reprodutiva em Répteis. 2. Crocodilianos. 3. Dimorfismo sexual. 4. Morfometria geométrica. I. Sousa, Bernadete Maria de, orient. II. Título.

Fernanda Pereira Silva

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DIMORFISMO SEXUAL
EM FILHOTES DE *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (CROCODYLIA:
ALLIGATORIDAE) NA RESERVA DE DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL MAMIRAUÁ, AMAZONAS**

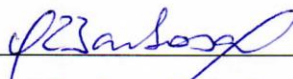
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Bernadete Maria de Sousa
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Oscar Rocha Barbosa
Universidade Estadual do Rio de Janeiro



Prof.^a Dra. Iara Alves Novelli
Universidade Federal de Juiz de Fora

*À minha mãe, Diosélia Munhois e a minha
avó, Neuza dos Santos, por serem
exemplos da força feminina e por sempre
estarem ao meu lado. Sem vocês nenhuma
conquista valeria a pena!*

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento para pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, pela oportunidade de realização desse estudo.

Ao CNPq pelas concessões de bolsas, que nos permitiram realizar esse trabalho.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e à Phoenix Herpetological Society pelo financiamento.

Ao Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSMA), pelo apoio de campo e infraestrutura oferecida.

Agradeço aos jacarés, animais incríveis que aprendi a admirar e que me proporcionaram grandes aprendizados.

Àos meus queridos pais, Diosélia Munhois e Aluino Almeida, que sempre incentivaram meus estudos e juntos batalharam muito por isso. Obrigada pelo meu maior presente, minha “mana”, Emanuely Victória. Agradeço aos meus “manos”, Gabriel Pereira e Flávia Gabriela, pelo apoio e paciência. À minha avó, Neuza dos Santos e minha tia Ofélia Munhois por todo apoio e incentivo.

Agradeço ao Robinson-Botero-Arias por sempre acreditar no meu potencial e sempre me incentivar. Obrigada por me levar para o campo e me mostrar o mundo fascinante dos crocodilianos amazônicos. Obrigada pela oportunidade!

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Bernadete Maria de Sousa, por acreditar e confiar em mim como pessoa e profissional. Foi um prazer ter trabalhado com você!

À equipe do Programa de Manejo e Conservação de Jacarés do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Kelly Torralvo, Vanessa Schmitt, Paulo Filho, João Carvalho e Helson Pinto que ajudaram na coleta das amostras e no desenvolvimento desta pesquisa. À Fabiana Ferreira e Vivian Chimendes, sempre dispostas, ajudaram inúmeras vezes no processamento

das amostras em laboratório. À Barthira Oliveira, pela amizade e apoio de sempre. Meninas, obrigada pelos finais de semana e feriados!

À Sarah Silva e Leandro Hohl por me apresentarem na prática a morfometria geométrica. Obrigada pela paciência e pela grande ajuda. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Iara Novelli por todo apoio, incentivo e amizade. Foi um prazer conhecê-la. Aos amigos, Jomara Oliveira e Luzivaldo Castro pelas conversas, incentivo, conselhos e apoio de sempre. As queridas amigas Natália Medeiros, Vanielle Medeiros, Tamara Felipim, Kellen Cristina pelas mensagens e conversas divertidas durante esse tempo longe de casa. Nos divertimos juntas à distância.

À toda família Mamirauá por todos os conhecimentos compartilhados. Afinal, é desde a iniciação científica, quando PIBIC. Todo aprendizado adquirido foi essencial para minha formação pessoal e profissional.

Agradeço imensamente aos amigos de Juiz de Fora, que se tornaram família, Wesley Monteiro, Mathusalam Panteves, Diana Marcela Pietro, Érika Latorre, Victor Charris, Rosielle Concolato, Antônio Toledo e Rafael Julião e Rosielle Concolato. Vocês fizeram os meus dias longe de casa mais divertidos. Ao casal, Waleska Queiros e João Cabral, que mesmo não me conhecendo, confiaram e me receberam em sua casa no início dessa etapa. Obrigada, queridos!

Aos colegas do laboratório de Répteis da Universidade Federal de Juiz de Fora, por me receber, pela troca de conhecimentos e pelo apoio ao longo desses anos. Muito obrigada a todos.

RESUMO

ASPECTOS MORFOLÓGICOS ASSOCIADOS AO DIMORFISMO SEXUAL EM FILHOTES DE *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (CROCODYLIA: ALLIGATORIDAE) NA RESERVA DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL MAMIRAUÁ, AMAZONAS

A forma e tamanho do corpo são características que diferem entre machos e fêmeas adultos de crocodilianos, entretanto, não existe relato do dimorfismo sexual para filhotes de *Melanosuchus niger*. O presente estudo teve como objetivo analisar a existência de dimorfismo sexual em filhotes de *M. niger* com base em dados morfológicos. Os espécimes analisados foram oriundos de um experimento de incubação artificial. Os ovos foram coletados no Lago Tracajá da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. As gônadas foram analisadas quanto aos parâmetros macroscópicos (forma, textura, coloração e presença/ausência de ducto de Müller) para verificar se havia dimorfismo sexual. A identificação sexual dos filhotes foi confirmada a partir da análise histológica do complexo-Gônada-Adrenal-Mesonefro (GAM) conforme procedimentos de rotina. Para a análise da variação da forma utilizou-se a morfologia quantificada das placas epidérmicas da cabeça dos filhotes a partir de 13 landmarks submetidos a uma análise de morfometria geométrica. Para isto, foram fotografadas em vista dorsal, a cabeça dos exemplares e utilizados os softwares TPSUtil, TPSDig2 e MorphoJ para análises. A análise histológica serviu para confirmar o sexo dos indivíduos analisados. Foram identificados 38 fêmeas e 12 machos. Nos testículos foi possível observar a presença da túnica albugínea associada a medula pouco diferenciada, onde não foi observada a presença de túbulos seminíferos, apenas a presença de células vacuolizadas. Associado ao mesonefro observou-se a presença de ducto de Müller remanescente. Nos ovários observou-se a presença de um epitélio germinativo evidente, formado por tecido epitelial cuboide simples. Na região medular observou-se a presença de folículos ovarianos e lacunas medulares. O Ducto de Müller

apresentou-se ligado ao mesonefro pelo mesossalpinge. Foi observado que as características macroscópicas das gônadas diferem entre os sexos. Os testículos apresentaram um formato elíptico com textura lisa e coloração amarela. Os ovários apresentaram textura granulosa, coloração bege clara e associada a ele observou-se a presença de Ducto de Müller. A análise de componentes principais (PCA) mostrou variação na forma das placas epidérmicas da cabeça de filhotes de *M. niger*, indicando a presença de dimorfismo sexual. O Componente Principal 1 (PC1) explicou 52,6 % da variação da forma, enquanto o Componente Principal 2 (PC2) explicou 14,4%, e a variação geral explicada por esses dois eixos principais foi de 67,0%. A análise de função discriminante confirmou a presença de dimorfismo sexual ($p = 0,01$). Foi observado que as fêmeas possuem a região posterior da cabeça mais longa e larga, e a mandíbula mais curta e estreita. Enquanto a região posterior da cabeça dos machos é ligeiramente mais curta e estreita, e a mandíbula mais longa e larga. As características macroscópicas e histológicas das gônadas foram semelhantes às encontradas em outras espécies de crocodilianos. A análise macroscópica demonstrou-se suficiente para identificar o sexo de filhotes de *M. niger*. Em crocodilianos adultos, o dimorfismo sexual pode estar presente na região do crânio relacionado evolutivamente ao reconhecimento visual do gênero. Entretanto, a seleção sexual não seria tão relevante para os jovens quanto para os indivíduos sexualmente maduros. A variação da forma tanto no crânio quanto na mandíbula encontrada em filhotes de *M. niger*, sugere que machos e fêmeas possivelmente passaram por diferentes processos ontogênicos. A falta de trabalhos envolvendo o estudo de dimorfismo sexual por meio da técnica de morfometria geométrica em filhotes de outras populações de *M. niger* e/ou de outras espécies de crocodilianos, dificulta a comparação direta. No entanto, fica claro a importância do estudo de dimorfismo sexual em crias de crocodilianos para estimativa da proporção sexual, principalmente se aplicada em populações naturais. Os modelos morfométricos geométricos podem ajudar a desenvolver representações gráficas do dimorfismo sexual da cabeça nos crocodilianos, o que torna estes resultados importantes para programas de conservação em condições naturais, pois representa uma alternativa não-letal às técnicas utilizadas para identificação sexual em *M. niger*.

Palavras-Chave: Amazônia, morfometria geométrica, jacaré-açu, morfohistologia, gônadas

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL ASPECTS ASSOCIATED WITH SEXUAL DIMORPHISM IN HATCHLING OF *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (CROCODYLIA: ALLIGATORIDAE) IN THE RESERVE OF SUSTAINABLE DEVELOPMENT MAMIRAUÁ, AMAZONAS

The shape and size of the body are characteristics that differ between adult males and females of crocodylians; however, there is no report about sexual dimorphism for *Melanosuchus niger* hatchling. The present study had as objective to analyze the existence of sexual dimorphism in of *M. niger* hatchling based on morphological data. The specimens analyzed in this study came from an artificial incubation experimente. The eggs were collected at Lake Tracajá on Mamirauá Sustainable Development Reserve. The gonads were analyzed with macroscopic parameters (shape, texture, color and presence / absence of Müller duct) to verify if there was sexual dimorphism. The sexual identification of the hatchling was confirmed by the histological analysis of Gonad-Adrenal-Mesonefro (GAM) complex according to routine procedures. For the analysis of the variation of the form the quantified morphology of the epidermal plates of the hatchling' head was used from 13 landmarks submitted to a geometric morphometry analysis. For this, the heads of the specimens were photographed in dorsal view and the TPSUtil, TPSDig2 and MorphoJ software were used for analysis. Histological analysis served to confirm the animal's sex of this study. There were identified, 38 females and 12 males. In the testes it was possible to observe the presence of the tunica albuginea associated with a little differentiated marrow, where the presence of seminiferous tubules was not observed, only the presence of vacuolated cells. Associated with the mesonephro we observed the presence of the remaining Müller duct. In the ovaries, the presence of an evident germinative epithelium, formed by simple cuboid epithelial tissue was observed. In the medullary region the presence of ovarian follicles and marrow gaps were observed. The Müller Duct was connected to the

mesonephro by the mesosalpinx. It was observed that the macroscopic characteristics of the gonads differ between the sexes. They showed elliptical, smoothly, yellow testes. The ovary presents granular structure with light beige coloration and associated with the presence of Müller's Duct. Principal component analysis (PCA) showed variation in the shape of epidermal scales of *M. niger* hatchling, indicating the presence of sexual dimorphism. The Principal Component 1 (PC1) explained 52.6% of the shape variation, as the Principal Component 2 (PC2) explained for 14.4%, and the overall variation explained by these two main axes was 67.0%. The analysis of discriminant function confirmed the presence of sexual dimorphism ($p = 0.01$). It was observed that the females have the posterior region of the head longer and wider, and the jaw shorter and narrower. While the posterior region of the males head is slightly shorter and narrower, and the jaw longer and wider. The macroscopic and histological characteristics of the gonads were similar to those found in other species of crocodylians. Macroscopic analysis was sufficient to identify the sex of *M. niger* hatchling. In adult crocodylians, sexual dimorphism may be present in the region of the skull related evolutionarily to visual recognition of the genus. However, sexual selection would not be as relevant to young people as to sexually mature individuals. The variation of the shape in both the skull and mandible found in *M. niger* hatchling suggests that males and females may have undergone different ontogenic processes. The lack of work involving the study of sexual dimorphism using a geometric morphometry technique in hatchling of other populations of *M. niger* and/or other species of crocodylians makes difficult direct comparison. However, it is clear the importance of the study of sexual dimorphism in gilts of crocodylians to estimate the sexual proportion, especially if applied in natural populations. Geometric morphometric models can help to develop graphic representations of sexual dimorphism of the head in crocodylians, which makes these results important for conservation programs under natural conditions, since it represents a non-lethal alternative to the techniques used for sexual identification in *M. niger*.

Key-Word: Amazonia, geometric morphometry, alligator, morphohistology, gonads

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Área de coleta. Lago Tracajá, Setor Jarauá, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. Fonte: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2017.19
- Figura 2.** Fotografia da cabeça de filhote de *Melanosuchus niger* com a localização das 13 landmarks usadas neste estudo.....21
- Figura 3.** Macrofotografia do complexo Gônada-Adrenal-Mesonefro (GAM) de filhotes da espécie *Melanosuchus niger*. Figura A, representa o GAM de um macho, destacando-se: adrenal (AD), testículo (TE) e Rim (RI). Figura B, representa a gônada de uma fêmea, destacando-se: adrenal (AD), ovário (OV), Ducto de Müller (DM) e rim (RI)24
- Figura 4.** Fotomicrografia do conjunto GAM de filhotes de *Melanosuchus niger*. Figura A (4x), B (10x) e C (40X) representam o GAM de um macho, distinguindo o testículo (TE), túnica albugínea (TA), adrenal (AD), mesonefro (ME) e o ducto de Müller remanescente (DMR). Setas pretas indicam os cordões de células vacuolizadas (futuros túbulos seminíferos). Figuras D (4x), E (10x) e F (40X) representam o GAM de uma fêmea, distinguindo-se o ovário (OV), epitélio germinativo (EG), folículos ovarianos (FO), lacunas medulares (LA), mesonefro (ME), adrenal (AD), ducto de Müller (DM) e mesossalpinge (MS). Cortes transversais corados com HE26
- Figura 5.** Análise de Componente Principal (PCA) da variação morfológica das placas epidérmicas da cabeça de filhotes de *Melanosuchus niger*. Após a sobreposição das coordenadas de procrustes, observa-se a distribuição de fêmeas (pontos azuis) e machos (pontos vermelhos) e as grades de deformação em relação à forma da cabeça ao longo do eixo PC1.....27

Figura 6. Distribuição de machos e fêmeas após a análise de função discriminante. Diferença na forma das placas epidérmicas da cabeça de filhotes machos e fêmeas da espécie *Melanosuchus niger* Grupo 1, as fêmeas (azul), Grupo 2, machos (vermelho)29

Figura 7. Grades de deformação (wireframes) da cabeça de filhotes fêmeas (azul claro) e machos (azul escuro) de *Melanosuchus niger*, mostrando o contexto anatômico das configurações com linhas retas entre as landmarks.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição das landmarks aplicadas na região dorsal das placas epidérmicas da cabeça de filhotes de <i>Melanosuchus niger</i>	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DST = Determinação Sexual Dependente da Temperatura
- MG = Morfometria Geométrica
- RDSM = Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
- SISBIO = Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade
- IBAMA = Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
- IDSM = Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
- GAM = Gônada-Adrenal-Mesonefro
- HE = Hematoxilina-Eosina
- PCA = Principal Componentes Analysis
- AD = adrenal
- TE = testículo
- RI = rim
- OV = ovário
- DM = ducto de Müller
- ME = mesonefro
- MS = mesosalpinge
- TA = túnica albugínea
- FO = folículos ovarianos
- LA = lacunas
- EG = epitélio germinativo
- PC1 = Componente Principal 1
- PC2 = Componente Principal 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Área de estudo.....	19
2.2 Coleta e análise dos dados.....	20
3 RESULTADOS	24
3.1 Análise Macroscópica.....	24
3.2 Análise histológica.....	25
3.3 Morfometria Geométrica.....	27
4 DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Entre as seis espécies de crocodilianos pertencentes a família Alligatoridae, na Amazônia brasileira ocorrem quatro espécies, *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807) (jacaré-paguá), *Paleosuchus trigonatus* Schneider, 1801 (jacaré-coroa), *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758) (jacaretinga) e *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (jacaré-açu) (Thorbjarnarson, 1992; Ross, 1998). Se considerar como um só sistema, a Amazônia possui a maior biodiversidade de jacarés do mundo (Da Silveira, 2003).

A espécie *M. niger* é a maior representante da família Alligatoridae, sendo que os machos medem mais de 5 m de comprimento e o tamanho médio de uma fêmea adulta é de 2,8 m (Thorbjarnarson, 2010). Encontra-se distribuída ao longo da Bacia Amazônica e nas bacias dos rios Rupununi e Essequibo na Guiana, e na Região Kaw da Guiana Francesa (Vasquez, 1991). Ocorre em altas densidades, principalmente em ambientes de várzea amazônica (Villamarín-Jurado, 2009).

As fêmeas alcançam maturidade sexual em torno de dois metros de comprimento, e produzem em média uma ninhada com 39,3 ovos (Thorbjarnarson, 2010). Assim como os demais membros da família Alligatoridae, *M. niger* é uma espécie que constrói montículos para nidificar (Greer, 1970). Os ninhos são construídos próximos a margem d'água, a uma distância média $2,0 \text{ m} \pm 3,3 \text{ m}$ (Villamarín-Jurado, 2009). O período de incubação dos ovos dura de dois a três meses (Medem, 1963).

Em crocodilianos a determinação sexual não é um fator genético, mas sim fenotípico, pois é dependente da temperatura (DST) (Bull, 1980). Fêmeas são produzidas em ambas as temperaturas, altas e baixas, com machos predominando em temperaturas intermediárias, um padrão Fêmea-Macho-Fêmea (FMF) (Lang e Andrews, 1994). A determinação sexual em crocodilianos ocorre durante os estágios embrionários 21 e 24, o que para *M. niger* equivale a cerca de 51 a 66 dias de incubação natural (Coriat e Sharpe, 1996; Vieira, 2011).

A identificação sexual de crocodilianos adultos é realizada por inspeção direta da cloaca (Chabreck, 1963; Brazaitis, 1969; Verdade, 2003). Para avaliar o tamanho e a estrutura do órgão copulatório, o pênis ou o clitóris de um crocodiliano previamente imobilizado, é projetado por inserção de um dedo na cloaca (Chabreck 1963, Brazaitis, 1969, Honegger, 1978).

No entanto, como as estruturas genitais externas são muito similares entre machos e fêmeas, principalmente em espécimes juvenis, a sexagem por estruturas genitais pode ser

bastante difícil. A palpação com o dedo indicador esticado só funciona com espécimes de tamanho total mínimo de 75 cm. Para identificar o sexo em crocodilianos juvenis, indica-se um espéculo vaginal veterinário, que serve para obter uma melhor percepção detalhada da cloaca e das estruturas (Honegger, 1978). Outra possibilidade proposta por Whitacker et al. (1980) é a protrusão do órgão copulatório por compressão lateral da região cloacal, juntamente com uma flexão cautelosa da cauda em direção ao ventre do crocodiliano.

Contudo, Ziegler e Olbort (2007) relatam que para uma identificação bem-sucedida de sexo em crocodilianos juvenis, os métodos mencionados anteriormente necessitam de habilidade no reconhecimento das diferenças, relativo a tamanho e as diferentes particularidades das estruturas genitais masculinos e femininas. Portanto, a identificação sexual de filhotes pode ser bastante difícil devido a similaridades das estruturas genitais entre machos e fêmeas, podendo levar a uma alta taxa de erro de classificação (Joanen e Mcnease, 1978).

Apesar dos indivíduos adultos da espécie *M. niger* apresentarem dimorfismo sexual quanto ao seu tamanho corporal, nada se sabe sobre esse aspecto para os filhotes desta espécie. Segundo Ziegler e Olbort (2007), o dimorfismo sexual, na maioria das espécies de crocodilianos, somente é visível após alguns anos de vida, sendo que em embriões e filhotes recém-eclodidos o meio mais seguro para se aferir o sexo são estudos histológicos das gônadas. Desta forma, é importante encontrar meios menos invasivos para identificar o sexo em filhotes de crocodilianos.

A evolução do dimorfismo sexual pode resultar, principalmente, de seleção sexual e/ou divergência de nicho intraespecífica (Hedrick e Temeles, 1989; Shine, 1989). Alguns répteis são sexualmente dimórficos em tamanho total (Fitch, 1981; Smith et al., 1997; Andrews et al., 2000) ou em relação ao tamanho de certas estruturas corporais (Doughty e Shine, 1995; Verdade, 2001).

Crocodilianos jovens e adultos, de 40 a 120 cm de comprimento rostro-cloacal, apresentam a cabeça sexualmente dimórficas (Webb e Messel, 1978; Hall e Potier, 1994; Verdade, 2003). Apesar disso, são poucos os estudos sobre dimorfismo sexual com filhotes de crocodiliano e os que existem estão relacionados à análise de morfometria linear. Piña et al. (2007) verificaram a presença de dimorfismo sexual na forma e tamanho do crânio de neonatos de *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) a partir de medidas de distâncias lineares entre pontos de referência.

Em quelônios, uma ferramenta que tem se mostrado bastante eficiente para estimar o sexo de neonatos é a morfometria geométrica (MG) (Valenzuela et al. 2004; Lubiana e Ferreira-

Júnior, 2009). Este fato sugere que a MG é uma ferramenta interessante para ser testada em filhotes de outras espécies de répteis, como em crocodilianos.

Uma das principais vantagens da MG sobre os métodos tradicionais é o processo através do qual se quantifica a variação entre formas, a distância de procrustes (Rohlf, 1999). A informação da forma é extraída por um procedimento chamado sobreposição de Procrustes, que remove a variação de tamanho, posição e orientação dos dados em coordenadas de referência e que está no cerne da morfometria geométrica (Goodall, 1991; Bookstein, 1996; Dryden e Mardia, 1998; Zelditch et al., 2004). Os dados de forma gerados pela MG possuem maior potência, menor viés e menor erro quadrático médio quando comparados a variáveis geradas a partir de conjuntos de distâncias lineares (Rohlf, 1999, 2000a, b, 2003). Segundo Rohlf e Marcus (1993), em relação à morfometria tradicional a morfometria geométrica é mais eficiente em capturar a informação relacionada à forma dos organismos e apresenta uma maior robustez estatística.

Em crocodilianos, a MG tem sido utilizada em estudos sobre as alterações ontogenéticas em espécies de *Caimans* (Monteiro et al., 1997), em investigações de padrões de variação morfológica dos crânios e sua correlação com a morfologia funcional (Pierce et al., 2008), no estudo da influência de fatores filogenéticos e ecológicos na forma do crânio de Alligatoidea e Crocodyloidea (Piras et al. (2009), em estudos de trajetórias alométricas em diferentes táxons de Crocodylia para testar hipóteses filogenéticas (Piras et al., 2010), e em estudos de variações intraespecífica (ontogenética e de dimorfismo sexual) em indivíduos juvenis e adultos da espécie *M. niger* (Foth et al., 2013).

Se a análise de morfometria geométrica na determinação sexual de filhotes de crocodilianos se tornar tão efetiva quanto para neonatos de quelônios, ela pode substituir as técnicas atualmente disponíveis, como a do exame cirúrgico das gônadas (Magnusson et al., 1990) e a eutanásia dos animais para necropsia o que não é recomendado, principalmente para espécies ameaçadas de extinção (Piña et al., 2007). Além de permitir estimar o sexo, este método, aplicado em populações naturais, poderá fornecer estimativas mais precisas sobre as relações sexuais de populações desta espécie. Esta informação é importante para subsidiar planos de manejo e conservação, pois trata-se de uma espécie de grande interesse comercial na Amazônia.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a presença de dimorfismo sexual em filhotes da espécie *M. niger* com base em dados morfológicos a partir da análise de morfometria geométrica e histomorfologia para confirmação do sexo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

A coleta das amostras foi realizada ao longo do Lago Tracajá, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM), localizada entre a confluência dos rios Solimões e Japurá, próxima à cidade de Tefé, e o canal do Auati-Paraná, estado do Amazonas (Figura 1). A RDSM possui uma área total de 1.124.000 ha, coberta por florestas e outras formações vegetais sazonalmente alagadas. Mamirauá é a maior unidade de conservação em áreas alagadas do Brasil e a única do país completamente inserida em área de várzea amazônica (MCTI/IDSM, 2010).

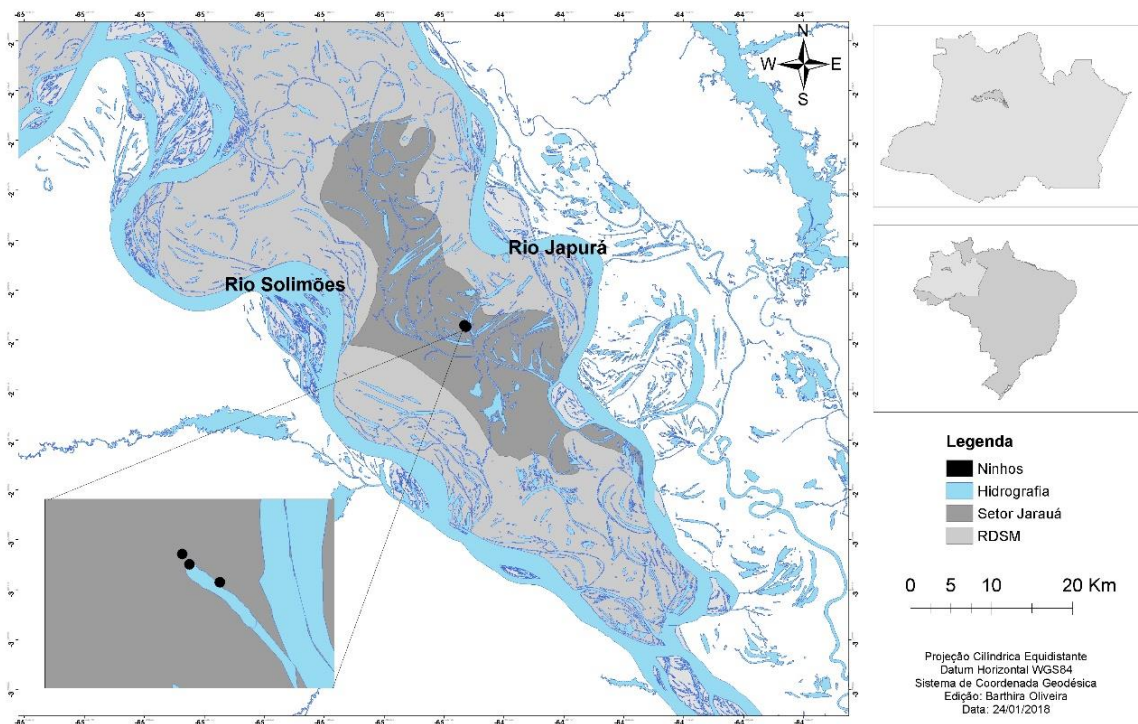


Figura 1. Área de coleta. Lago Tracajá, Setor Jarauá, Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil. Os pontos pretos representam o local de coleta dos ninhos. Fonte: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (2018).

2.2 Coleta e análise dos dados

Todas as amostras de *M. niger* utilizadas neste estudo (N=48) foram oriundas de um experimento de incubação artificial para estudo de determinação sexual, da temporada reprodutiva de 2013-2014. Para realização desta pesquisa, foi concedida a licença do Sistema de Autorização e Informação de Biodiversidade – SISBIO/IBAMA sob o número 41792-1.

Os ovos foram coletados de três ninhos de *M. niger* em outubro de 2013, transferidos para o laboratório do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá –IDSME e distribuídos uniformemente em 10 incubadoras com temperaturas diferentes. Cada incubadora foi preenchida com vermiculita umedecida e a temperatura foi monitorada por um termógrafo digital. A incubação dos ovos durou em média 93 dias.

Os filhotes de *M. niger* utilizados para este estudo tinham idade entre 61 e 88 dias. A identificação sexual foi confirmada pelo exame histológico do complexo Gônada-Adrenal-Mesonefro (GAM) que se encontra unido ao ducto sexual. Os complexos GAM dos filhotes também foram analisados quanto aos parâmetros macroscópicos: forma, textura, coloração e presença/ausência de ducto de Müller para verificar a presença de dimorfismo sexual conforme Rey (2007) e Otaño et al. (2010).

Para a análise histológica, o GAM foi clivado transversalmente e fixado por 24 h em formalina a 10%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em séries crescente de etanol, diafanizados em xilol, e incluídos em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos em séries de 5 µm de espessura, montados em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A preparação histológica foi realizada no Laboratório de Histologia do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, conforme protocolo padronizado. A análise das lâminas e a fotodocumentação do material histológico foram realizadas em microscópio de luz, modelo BA410, marca Motic, localizado no laboratório de Herpetologia do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. A análise morfohistológica das gônadas foram realizadas segundo Stoker et al. (2003), Rey (2007) e Moore et al. (2010).

Após a correta identificação sexual dos espécimes de *M. niger*, em busca de uma ferramenta alternativa para estimar o sexo e evitar a eutanásia de filhotes em estudos posteriores, utilizamos a morfologia quantificada das placas epidérmicas da cabeça dos filhotes a partir de pontos anatômicos ou *landmarks* repetíveis submetidos a análise de morfometria geométrica.

As *landmarks* são os pontos homólogos nos quais as estruturas biológicas são amostradas e que permitem identificar as variações de forma entre as mesmas estruturas morfológicas nos diferentes exemplares em estudo (Rohlf, 1999). Esses marcos anatômicos podem ser classificados como do Tipo I, que são justaposições de tecidos, Tipo II, pontos de máxima curvatura ou processos morfogenéticos locais e Tipo III que são pontos extremos definidos por distâncias através de uma determinada fórmula (Bookstein, 1991).

Para verificar a variação da forma, foi fotografada em vista dorsal, a cabeça dos exemplares, com destaque para as placas epidérmicas, utilizando-se uma câmera digital Nikon D70s Coolpix P100, padronizando distância, ângulo e zoom para todas as fotografias. As fotos foram realizadas em uma mesa estativa com a câmera fixada a 25,4 cm de distância dos espécimes. Para todas as imagens uma fita métrica foi utilizada para escala.

A posição da cabeça de alguns indivíduos ficou fora do padrão em relação a posição das demais e para a análise de morfometria geométrica foram analisados apenas 46 cabeças de filhotes de *M. niger*.

A criação do arquivo de imagem para análise de morfometria foi realizada através do software TpsUtil (Rohlf, 2006a) e as 13 *landmarks* (Figura 2) foram registrados no programa TpsDig2 (Rohlf, 2006b). Neste estudo utilizou-se as *landmarks* do Tipo I e II (Tabela 1). Os pontos de referência incluíram as interseções das linhas delineando as placas epidérmicas da região dorsal da cabeça dos filhotes. Para garantir a homologia espacial das estruturas, a inserção dos marcos seguiu uma mesma ordem.

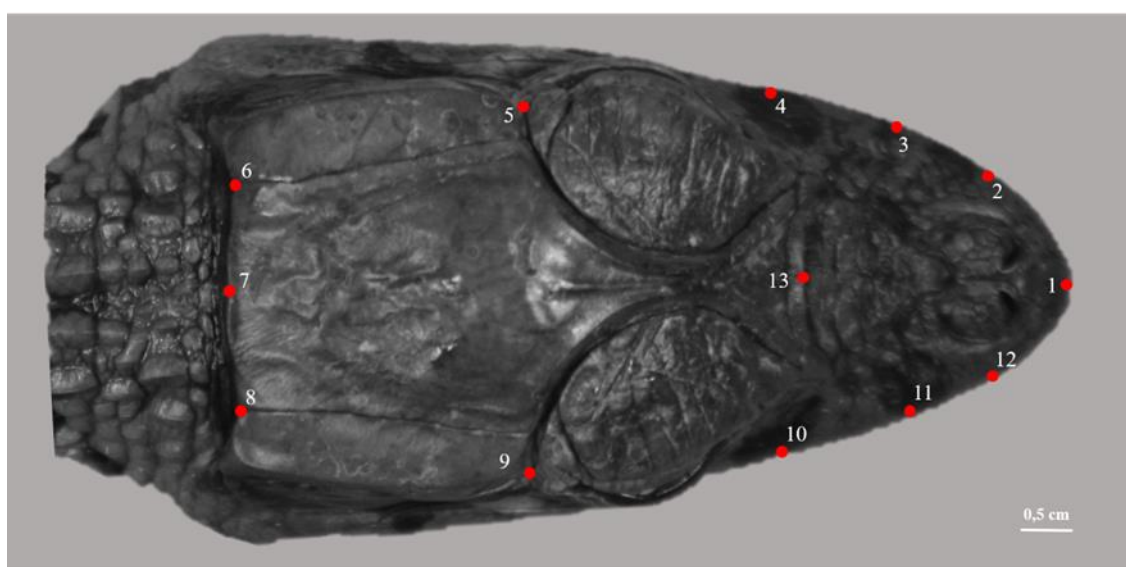


Figura 2. Fotografia da cabeça de filhote de *Melanosuchus niger* ilustrando a localização das 13 *landmarks* usadas neste estudo.

Tabela 1. Definição das landmarks aplicadas na região dorsal das placas epidérmicas da cabeça de filhotes de *Melanosuchus niger*.

Landmark	Definição
1	Ponto anterior do focinho
2	Ponto na lateral esquerda da abertura temporal superior, na altura do 5º dente
3	Ponto na lateral esquerda da abertura temporal superior, na altura do 9º dente.
4	Ponto na protuberância da placa epidérmica, na lateral esquerda em frente a abertura ocular esquerda.
5	Ponto na extremidade esquerda da placa craniana, localizada imediatamente posterior a abertura ocular.
6	Ponto no final da linha esquerda que corta no sentido vertical a placa craniana.
7	Ponto de curvatura máxima na região central posterior da placa craniana.
8	Ponto no final da linha direita que corta no sentido vertical a placa craniana.
9	Ponto na extremidade direita da placa craniana, localizada imediatamente posterior a abertura ocular
10	Ponto na protuberância da placa epidérmica, na lateral direita em frente a abertura ocular direita
11	Ponto na lateral direita na altura do 9º dente.
12	Ponto na lateral direita, na altura do 5º dente.
13	Ponto na região central da protuberância da placa epidérmica localizada entre as extremidades anteriores das aberturas oculares.

Os dados das *landmarks* foram importados para o programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) onde foi realizado a sobreposição de Procrustes para extrair informação de forma, eliminado os efeitos de translação, rotação e escala. Assim, a informação sobre o tamanho da configuração do marco é retida no conjunto de dados e fica disponível para análises subsequentes (tamanho de centro de imagem e tamanho de centroide transformado em log) (Dryden e Mardia, 1998).

Ainda no MorphoJ, para examinar as principais variações da forma e ordenar o arranjo dos espécimes (Machos X Fêmeas), foi realizada a análise de componentes principais (Principal Components Analysis – PCA). O objetivo da PCA é verificar se alguns componentes são capazes de esclarecer as variações nos dados originais (Monteiro e Reis, 1999). Contudo, a PCA não é um teste estatístico, e para verificar a existência de diferença de forma entre os grupos, no mesmo programa foi realizada a Análise de Função Discriminante. A visualização das variações de forma evidenciando o dimorfismo sexual foi representada por grades de deformação, baseada em deslocamento de vetores.

3 RESULTADOS

3.1 Análise macroscópica

Analisando macroscopicamente o complexo GAM, observou-se que se localiza anterior ao rim e posterior ao pulmão, fixado a parede dorsal do corpo do indivíduo, sendo o conjunto GAM direito mais alongado que o esquerdo.

O dimorfismo sexual macroscópico das gônadas foi observado quanto à forma, textura, coloração e presença/ausência do Ducto de Müller. O testículo apresenta um formato elíptico com textura lisa e coloração amarela (Figura 3A). O ovário apresenta um formato semelhante ao testículo, porém mais alargado, pois recobre horizontalmente a parte ventral da glândula adrenal o qual está aderido, formando como se fosse uma única estrutura. Apresenta uma textura granulosa com coloração bege clara e presença de Ducto de Müller (Figura 3B).

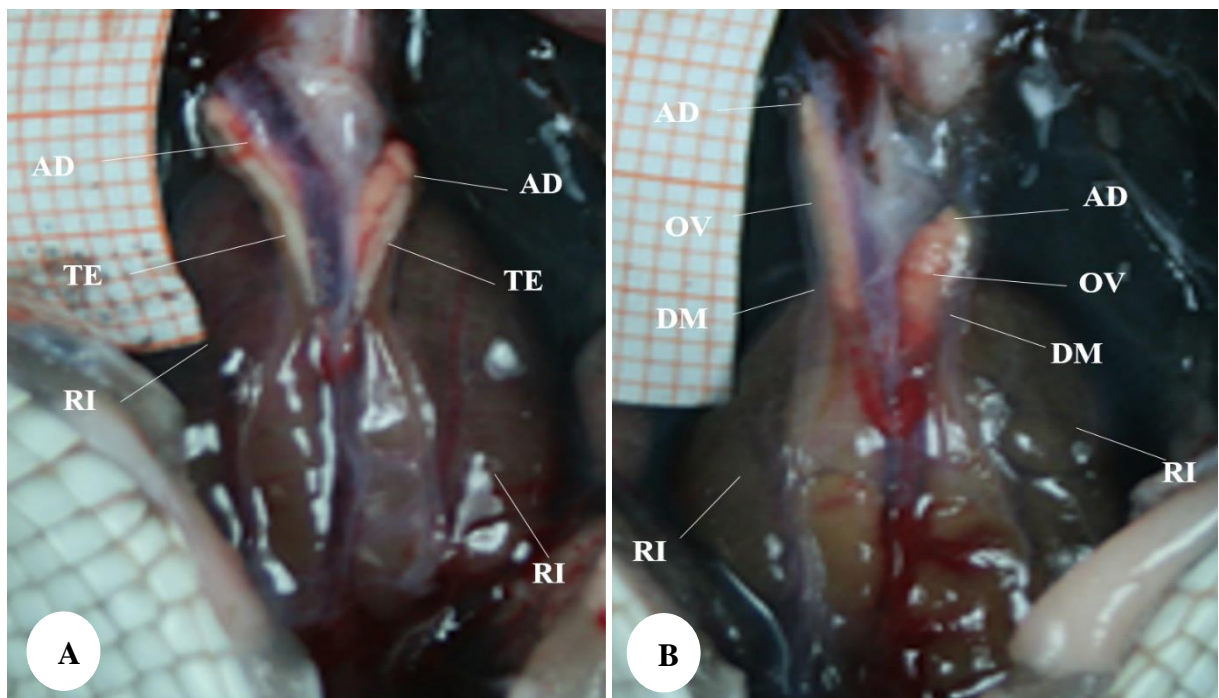


Figura 3. Macrofotografia do complexo Gônada-Adrenal-Mesonefro (GAM) de filhotes da espécie *Melanosuchus niger*. (A) GAM de um macho, destacando-se: adrenal (AD), testículo (TE) e Rim (RI). (B) GAM de uma fêmea, destacando-se: adrenal (AD), ovário (OV), Ducto de Müller (DM) e rim (RI).

3.2 Análise histológica

A análise histológica serviu para confirmar o sexo dos indivíduos analisados. Foram identificados 38 fêmeas e 12 machos.

Histologicamente as gônadas encontravam-se justaposta a glândula adrenal e ao mesonefro. No córtex dos testículos foi observado a presença da túnica albugínea associada a medula pouco diferenciada quanto ao desenvolvimento das células. Não foi observado a presença de túbulos seminíferos, apenas cordões de células vacuolizadas (futuros túbulos seminíferos). Associado ao mesonefro observou-se a presença do Ducto de Müller remanescente (Figura 4A, B e C).

No córtex ovariano foi possível observar a presença de um epitélio germinativo bastante evidente que recobria o ovário, formado por tecido epitelial cuboides simples. Na região medular observou-se a presença de folículos ovarianos e lacunas medulares. O Ducto de Müller apresentou-se ligado ao mesonefro pelo mesossalpinge (Figura 4D, E e F).

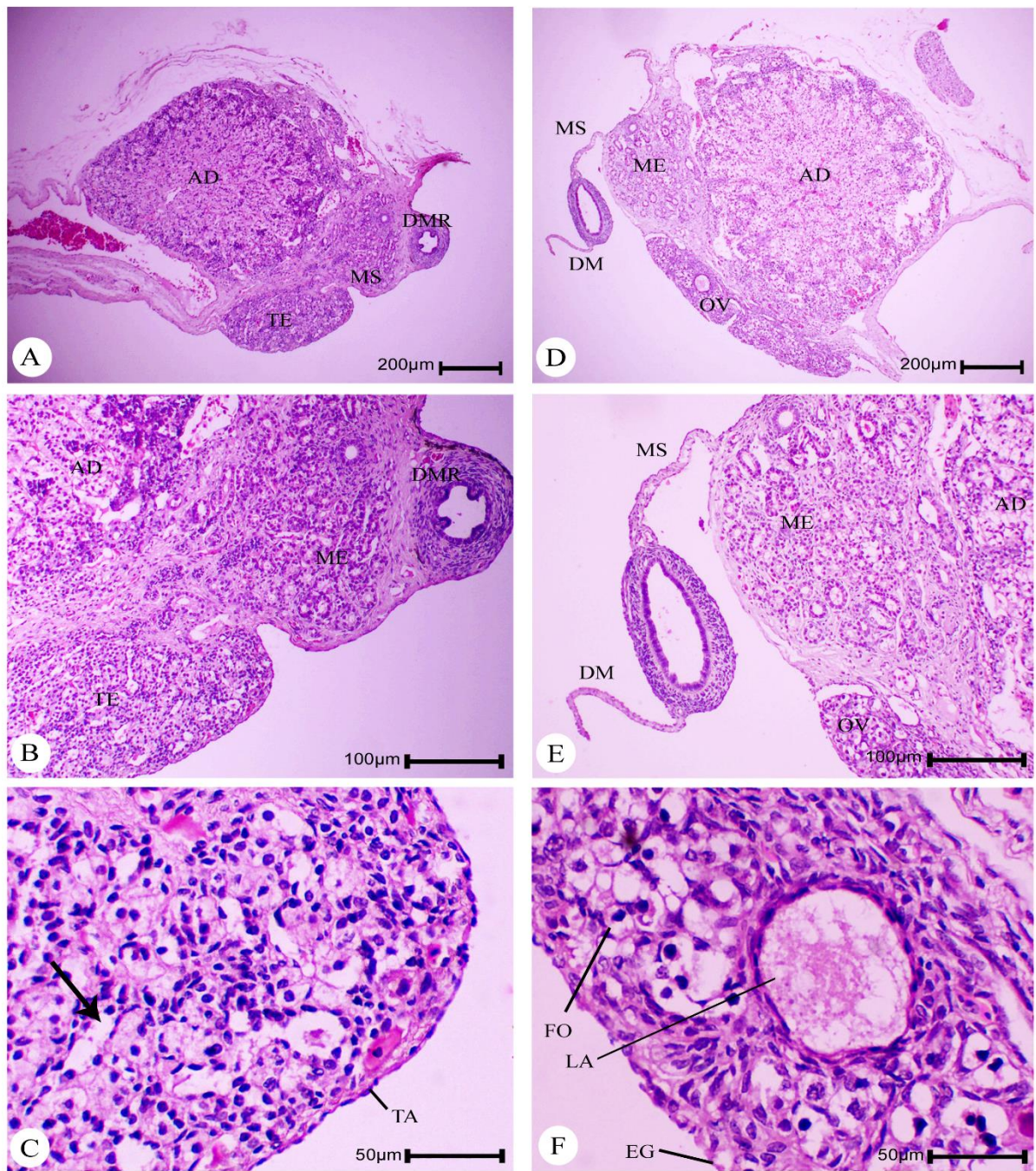


Figura 4. Fotomicrografia do conjunto GAM de filhotes de *Melanosuchus niger*. A (4x), B (10x) e C (40X) representam o GAM de um macho, distinguindo o testículo (TE), túnica albugínea (TA), adrenal (AD), mesonefro (ME) e o ducto de Müller remanescente (DMR). Setas pretas indicam os cordões de células vacuolizadas (futuros túbulos seminíferos). D (4x), E (10x) e F (40X) representam o GAM de uma fêmea, distinguindo-se o ovário (OV), epitélio germinativo (EG), folículos ovarianos (FO), lacunas medulares (LA), mesonefro (ME), adrenal (AD), ducto de Müller (DM) e mesossalpinge (MS). Cortes transversais corados com HE.

3.3 Morfometria Geométrica

Foi observado dimorfismo sexual na forma das placas epidérmicas da cabeça de filhotes de jacaré-açu. A partir da análise de deformação da representação gráfica da forma das placas epidérmicas da cabeça foi possível avaliar as diferenças anatômicas entre fêmeas e machos.

O Componente Principal 1 (PC1) explicou 52,6 % da variação da forma, enquanto o Componente Principal 2 (PC2) explicou 14,4%, e a variação geral explicada por esses dois eixos principais foi de 67,0%. Os machos apresentaram-se distribuídos entre os valores negativos do PC1 e do PC2, enquanto as fêmeas encontraram-se distribuídas homogeneamente entre os valores positivos e negativos (Figura 5). Apesar da sobreposição de machos e fêmeas observada no gráfico de dispersão de PCA, a análise de função discriminante demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos ($p = 0,01$) (Figura 6).

Ao longo do PC1, para indivíduos no lado negativo (algumas fêmeas e praticamente todos os machos) as variações são, região posterior da cabeça mais curta e estreita com mandíbula mais longa e larga, e região posterior da cabeça mais longa e larga com mandíbula mais curta e estreita. Já para os indivíduos que estão no lado positivo (maioria das fêmeas), as deformações são, região posterior da cabeças mais longas e largas com mandíbulas mais curta e estreita, e região posterior da cabeça mais curta e estreita com mandíbulas mais longa e larga (Figura 5).

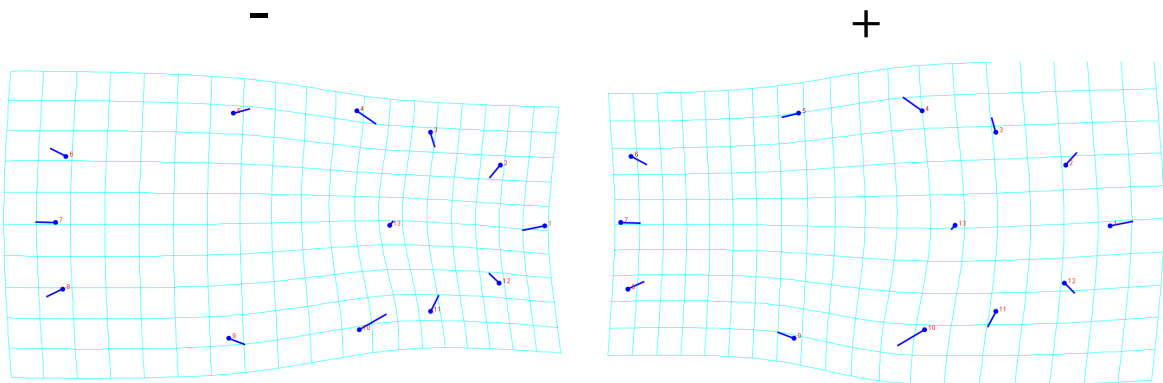
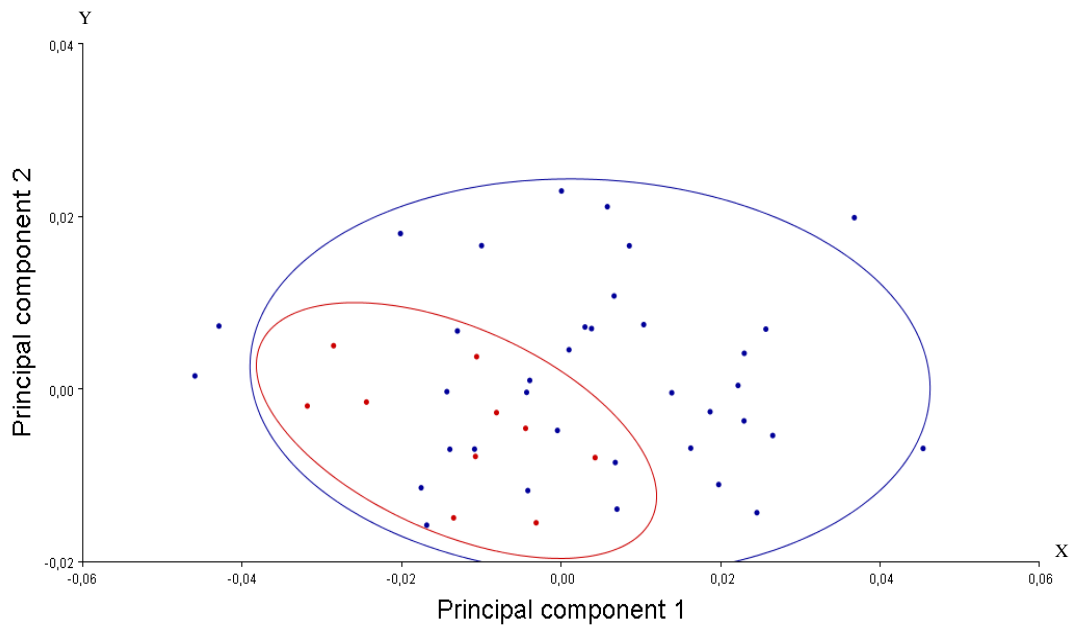


Figura 5. Análise de Componente Principal (PCA) da variação morfológica das placas epidérmicas da cabeça de filhotes de *Melanosuchus niger*. Após a sobreposição das coordenadas de procrustes, observa-se a distribuição de fêmeas (pontos azuis) e machos (pontos vermelhos) e as grades de deformação em relação à forma da cabeça ao longo do eixo PC1.

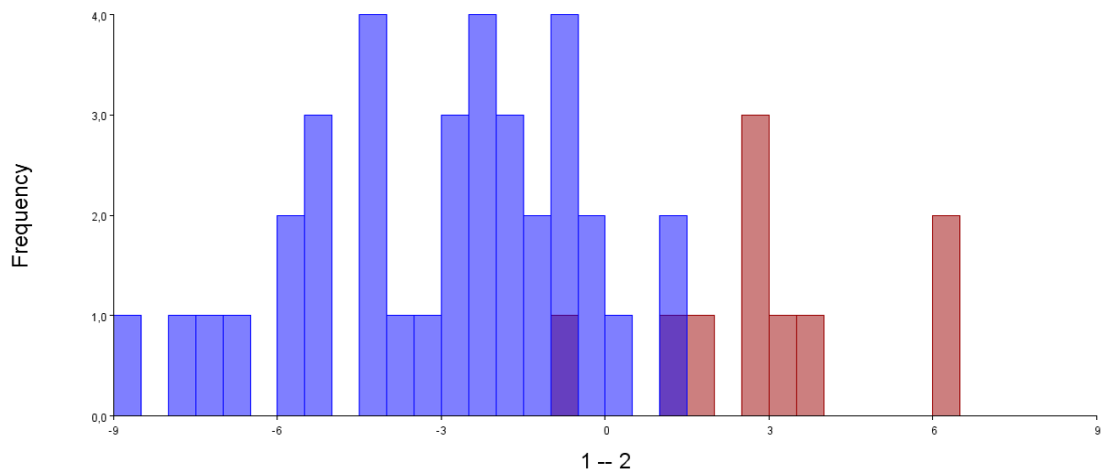


Figura 6. Distribuição de machos e fêmeas após a análise de função discriminante. Diferença na forma das placas epidérmicas da cabeça de filhotes machos e fêmeas da espécie *Melanosuchus niger*. Grupo 1, as fêmeas (azul) e Grupo 2, machos (vermelho).

A partir da análise das grades de deformação gerada pela função discriminante foi observado que as fêmeas possuem a região posterior da cabeça mais longa e larga, e a mandíbula mais curta e estreita. Enquanto a região posterior da cabeça dos machos é ligeiramente mais curta e estreita e a mandíbula mais longa e larga (Figura 7).

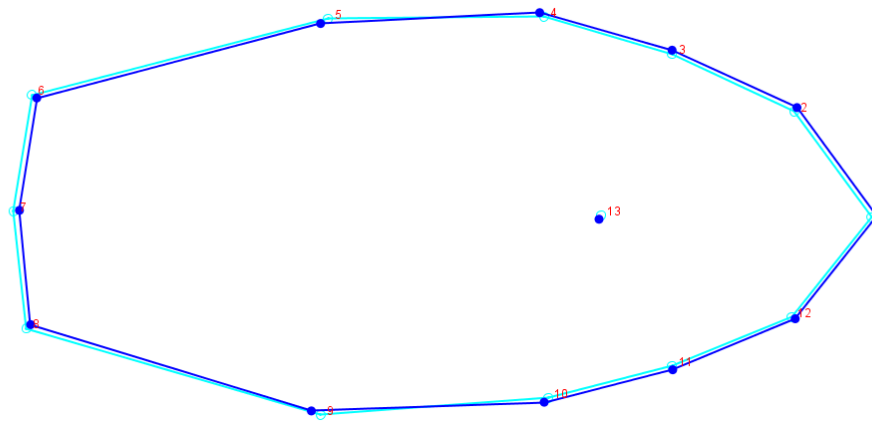


Figura 7. Grades de deformação (wireframes) da cabeça de filhotes fêmeas (azul claro) e machos (azul escuro) de *Melanosuchus niger*, mostrando o contexto anatômico das configurações com linhas retas entre as *landmarks*.

4 DISCUSSÃO

As características morfo-histológicas dos ovários dos filhotes de *M. niger* foram semelhantes às observadas em *C. latirostris* e *A. Mississippiensis* (Rey, 2007; Moore et al., 2010). Por outro lado, os testículos apresentaram-se pouco diferenciados, não apresentando túbulos seminíferos, quando comparado a outras espécies de jacarés. Em *C. latirostris* (Rey, 2007) e *A. Mississippiensis* (Moore et al. 2010), os túbulos seminíferos apresentam-se bastante desenvolvidos para neonatos com idade inferior aos utilizados neste estudo.

A análise macroscópica das gônadas pode ser usada para identificar o sexo de filhotes de *M. niger* com idade a partir de 60 dias de vida. As características morfológicas das gônadas observadas neste estudo são dimórficas sexualmente e semelhantes às descritas para filhotes da espécie *C. latirostris* (Rey, 2007; Otaño et al., 2010). Somente a presença de ducto deferente na região caudal dos testículos não foi observada para esta espécie como citada por Otaño et al. (2010) em *C. latirostris*. Apesar disso, as características macroscópicas das gônadas observadas neste estudo foram suficientes para estimar o sexo em filhotes de *M. niger*.

As variações morfológicas encontradas entre filhotes machos e fêmeas de *M. niger*, a partir da análise morfométrica das placas epidérmicas da região dorsal da cabeça, evidenciou a presença de dimorfismo sexual. Desta forma, a morfometria geométrica demonstrou ser uma ferramenta aplicável e uma alternativa para estimar o sexo de filhotes de *M. niger*, uma vez que pode substituir métodos invasivos como, a análise histológica das gônadas (Ziegler e Olbort, 2007) e a incisão na cavidade abdominal (Magnusson e Hero, 1988). Além disso, pode substituir os métodos de baixa precisão, como o uso do espéculo vaginal veterinário (Honegger, 1978) e a protrusão do órgão copulatório por compressão lateral da região cloacal (Whitacker et. al., 1980), que segundo Ziegler e Olbort (2007) são métodos que, para uma identificação bem-sucedida do sexo, necessitam de habilidades e reconhecimentos das diferentes particularidades das estruturas genitais masculinas e femininas.

A presença de dimorfismo sexual tem sido observada em várias espécies de répteis, com machos adultos apresentando a cabeça maior e mais larga que as fêmeas, como é o caso dos lagartos, *Xenosaurus grandis* (Gray, 1856) e *Xenosaurus newmanorum* Taylor, 1940 (Smith et al., 1997), o que pode estar relacionado à seleção sexual (Anderson e Vitt, 1990; Cooper e Vitt, 199; Hall e Portier, 1994, Verdade, 2000).

Em crocodilianos adultos, *Crocodylus novaeguineae* Schmidt, 1928 (Hall e Portier, 1994) e *Caiman latirostris* (Verdade, 2003) o dimorfismo sexual pode estar presente na região do crânio, relacionado evolutivamente ao reconhecimento visual do gênero, quando os indivíduos exibem apenas o topo de suas cabeças acima da superfície da água, uma vez que são animais predominantemente visuais (Bellairs, 1971). Parece haver alguns componentes comportamentais sociais neste padrão evolutivo (Lang, 1987). Entretanto, a seleção sexual não seria tão relevante para os jovens quanto para os indivíduos sexualmente maduros (Gould e Gould, 1989; Anderson, 1994). Portanto, a variação na forma tanto no crânio quanto na mandíbula encontrada em filhotes de *M. niger*, sugere que machos e fêmeas possivelmente passaram por diferentes processos ontogênicos (Piña et al., 2007).

Estudos que envolvem o uso de técnicas de morfometria geométrica na análise de crânios de crocodilianos ainda são pouco realizados. Monteiro et al. (1997) compararam as alterações ontogenéticas entre três espécies de *Caimans*. Pierce et al. (2008) investigaram os padrões de variação morfológica dos crânios de crocodilianos existentes e sua correlação com a morfologia funcional baseada na modelagem de elementos finitos (MEF). Piras et al. (2009) estudaram a influência de fatores filogenéticos e ecológicas (mudanças climáticas) na forma do crânio de Alligatorioidea e Crocodyloidea. Piras et al. (2010) compararam trajetórias alométricas em diferentes taxas de Crocodylia para testar hipóteses filogenéticas sobre as relações entre *Gavialis gangeticus* e *Tomistoma schlegelii*.

Em *M. niger*, Foth et al., (2017) realizaram o primeiro estudo de variação morfológica intraespecífica em crânios de indivíduos juvenis e adultos, usando uma abordagem morfométrica geométrica bidimensional. Os autores observaram diferentes tipos de variações intraespecíficas (ontogenética e dimorfismo sexual). E em relação ao dimorfismo sexual, observaram que o comprimento do crânio dos machos maiores é cerca de 30% mais longo que o das fêmeas maiores. No entanto, a falta de trabalhos envolvendo o estudo de dimorfismo sexual utilizando técnica de morfometria geométrica em filhotes de outras populações de *M. niger* e/ou de outras espécies de crocodilianos, dificulta a comparação direta com outras populações ou espécies.

Contudo, fica claro a importância do estudo de dimorfismo sexual em crias de crocodilianos para estimativa da proporção sexual, principalmente se aplicada em populações naturais. Os modelos morfométricos geométricos podem ajudar a desenvolver representações gráficas do dimorfismo sexual craniano nos crocodilianos (Verdade 2003). O que torna estes resultados importantes para programas de conservação em condições naturais, pois representa

uma alternativa não-letal às técnicas utilizadas para identificação sexual (Domingues, 2015) também em filhotes de *M. niger*.

Os crocodilianos apresentam o sexo dependente da temperatura, e assim como as tartarugas, a razão sexual está intimamente ligada aos programas de conservação, pois a variação na proporção entre os sexos pode explicar as mudanças na estrutura populacional. A diferença na proporção de machos e fêmeas na natureza pode representar a diminuição no tamanho efetivo da população, perda de variabilidade genética e de potencial reprodutivo (Morfin et al., 2001). Além disso, por apresentarem a diferenciação sexual dependente de temperatura, estimar a proporção sexual dos filhotes de crocodilianos, pode auxiliar na indicação de possíveis alterações nos sistemas biológicos causadas pelas mudanças de temperatura global (Janzen, 1994).

5 CONCLUSÕES

O dimorfismo sexual em filhotes de *M. niger* poder ser observado em diferentes aspectos morfológicos: morfologia macroscópica das gônadas, que demonstrou ser eficiente para correta identificação sexual de filhotes; morfohistologia do complexo Gônada-Adrenal-Mesonefro; e morfologia das placas epidérmicas da cabeça através da análise de morfometria geométrica.

A técnica de morfometria geométrica foi uma ferramenta eficiente para a estimativa de sexo dos filhotes de jacaré-açu, importante para estudos de proporção sexual de populações naturais. Esta informação é importante para subsidiar planos de manejo e conservação, pois trata-se de uma espécie de grande interesse comercial na Amazônia.

REFERÊNCIAS

- Anderson M, Vitt LJ. 1990. Sexual selection versus alternative causes of sexual dimorphisms in teiid lizards. *Oecologia*, v. 84, n. 2, p. 145-157.
- Andersson M. 1994. *Sexual Selection: Monographs in Behavior and Ecology*. Princeton: Princeton University Press.
- Andrews R, Mathies T, Warner D (2000) Effect of incubation temperature on morphology, growth, and survival of juvenile *Sceloporus undulatus*. *Herpetological Monographs*, v. 14, n. 1, p. 420-431.
- Bellairs A.d.A. 1971. The Senses of Crocodylians. IUCN Publications New Series, Supplementary Paper, n. 32, p. 181-189.
- Bookstein FL. 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, New York.
- Bookstein FL. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, v. 58, n. 2, p. 313-65.
- Brazaitis P. 1969 The determination of sex in living crocodylians. *British Journal of Herpetology*, v. 4, n. 3, p. 54-58.
- Bull JJ. 1980. Sex Determination in Reptiles. *The quarterly Review of Biology*. Chicago Journals, v. 55, n. 1, p. 3-21.
- Chabreck R (1963) Methods of capturing, marking and sexing alligators. *Proceedings of the Annual Conference Southeastern Association of Game and Fish Commission*, v. 17, p. 47-50.
- Cooper WE, Vitt LJ. 1993. Female mate choice of large male broad-headed skinks. *Animal Behaviour*, v. 45, n. 4, p. 683-693.
- Coriat A. M, Sharpe P. T. 1996. Temperature Dependent Sex Determination: Evaluation and Hypotheses In: *Advances in Genome Biology*, vol. 4, p. 229-248.
- Da Silveira R. Avaliação Preliminar da Distribuição, Abundância e da Caça de Jacarés no Baixo Rio Purus. In: Deus, C. P.; Da Silveira, R.; Py-Daniel, L. H. Piagaçu-Purus: bases científicas para criação de uma reserva de desenvolvimento sustentável. Manaus: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2003. p.61-64.
- Domingues MK. Testando a existência de dimorfismo sexual na fase juvenil da tartaruga-verde (*Chelonia mydas* linnaeus, 1758) através da morfometria geométrica. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- Doughty P, Shine R. 1995. Life in two dimensions: Natural history of the southern leaf-tailed gecko, *Phyllurus platurus*. *Herpetologica*, v. 51, n. 2, p. 193-201.

- Dryden I, Mardia K. 1998. Statistical Shape Analysis. John Wiley & Sons, New York.
- Fitch HS. 1981. Sexual size differences in reptiles. Miscellaneous Publications, Universidade do Kansas. Museum of Natural History, n. 70, p. 1-72.
- Foth C, Bona P, Desojo JB. 2013. Intraspecific variation in the skull morphology of the black caiman *Melanosuchus niger* (Alligatoridae, Caimaninae). Acta Zoologica (Stockholm), v. 0, p. 1-13.
- Goodall CR. 1991. Procrustes methods in the statistical Analysis of shape. Journal of the Royal Statistical Society: Series B, v. 53, p. 285-339.
- Gould JL, Gould CG. 1989. Sexual selection: mate choice and courtship in nature. Scientific American Library, New York, n. 29.
- Greer AE. 1970. Evolutionary and systematic significance of crocodylians nesting habits. Nature, v. 227, p. 523-524.
- Hall PM, Portier KM. 1994. Cranial morphometry of New Guinea crocodiles (*Crocodylus novaeguineae*): ontogenetic variation in relative growth of the skull and an assessment of its utility as a predictor of the sex and size of individuals. Herpetological Monographs, v. 8, p. 203-225.
- Hedrick AV, Temeles EJ (1989) The evolution of sexual dimorphism in animals: hypotheses and tests. Trends in Ecology & Evolution, v. 4, n. 5, p. 136-138.
- Honegger RE. 1978. Sex identification in reptiles. Salamandra, v. 14, n. 2, p. 69-79.
- Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. Plano de Gestão Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá - IDSM: diagnóstico, Tefé, 2010. 1 v. 115 p.
- Janzen FJ. 1994. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, Population Biology, v. 91, p. 7487-7490.
- Joanen T, Mcnease L. 1978. The cloacal sexing method for immature alligators. Proceedings of the Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies, v. 32, p. 179-181.
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric. Molecular Ecology Resources, v. 11, n. 2. p. 353-357.
- Lang JW, Andrews HV. 1994. Temperature sex determination in crocodylians. Journal of Experimental Zoology, v. 270, p. 28-44.
- Lang JW. 1987. Crocodylian thermal selection. In: Wildlife management: Crocodiles and Alligators ed by, Webb GJW, Manolis CS, Whitehead JP, Surrey Beatty, Sydney, p. 301-317.
- Lubiana NA, Ferreira-Júnior PJ (2009) Pivotal temperature and sexual dimorphism of *Podocnemis expansa* hatchlings (Testudines: Podocnemididae) from Bananal Island, Brazil. Zoologia, v. 26, n. 3, p. 527-533.

- Magnusson WE, Lima AP, Hero JM, Sanaiotii TM, Yamakoshi M. 1990. *Paleosuchus trigonatus* nests: sources of heat and embryo sex ratios. *Journal of Herpetology*, v. 24, n. 4, p. 397-400.
- Magnusson WE, Hero JM. Diagnosis of sex of live hatchling *Paleosuchus trigonatus* by direct observation of the gonads. *In: Proceeding 9th Working Meeting of the IUCN Crocodile Specialist Group*. IUCN, Gland, 1988. P. 33-37.
- Medem F. 1963. Osteologica craneal, distribucion geografica y ecologia de *Melanosuchus niger* (Spix) (Crocodylia, Alligatoridae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas, y Naturales*, v. 12, n. 45, p. 5-19
- Monteiro LR, Cavalcante MJ, Sommer III HJS. 1997. Comparative ontogenetic shape changes in the skull of caiman species (Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Morphology*, v. 231, p. 53-62
- Monteiro LR, REIS SF. 1999. *Princípios de Morfometria Geométrica*. Holos. São Paulo
- Moore BC, Hamlin HJ, Botteri NL, Lawler NA, Mathavan KK, Guillette JRLJ. 2010. Posthatching Development of *Alligator mississippiensis* Ovary and Testis. *Journal of Morphology*, v. 271, p. 580–595.
- Morfin JEM, Muñoz, VMG, RODRÍGUEZ CN. 2001. Morphometric Model for Sex Assessment in Hatchling Olive Ridley Sea Turtles. *Chelonian Conservation and Biology*, v. 4, n. 1, p. 53-58.
- Otaño NBN, Imhof A, Bolcatto PG, Larriera A. 2010. Sex differences in the genitalia of Hatchling *Caiman latirostris* *Herpetological Review*, v. 41, n. 1, p. 32-35.
- Pierce SE, Angielczyk KD, Rayfield EJ. 2008. Patterns of morphospace occupation and mechanical performance in extant crocodylian skulls: A combined geometric morphometric and finite element modelling approach. *Journal of Morphology*, v. 269, p. 840–864.
- Piña CI, Siroski P, Larriera A, Lance V, Verdade L (2007) The temperature-sensitive period (TSP) during incubation of broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) eggs. *Amphibia-reptilia*, v. 28, p. 123-128.
- Piras P, Teresi L, Buscalioni AD, Cubo J. 2009. The shadow of forgotten ancestors differently constrains the fate of Alligatoroidea and Crocodyloidea. *Global Ecology and Biogeography*, v. 18, p. 30–40.
- Piras, P, Colangelo P, Adams DC, Buscalioni AD, Cubo J, Kotsakis T, Meloro C, Raia P. 2010. The Gavialis-Tomistoma debate: The contribution of skull ontogenetic allometry and growth trajectories to the study of crocodylian relationships. *Evolution & Development*, v.12, p. 568–579.
- Rey, F. Caracterización de biomarcadores de contaminación por xenoestrógenos y sua aplicaciónal monitoreo de contaminación ambiental. 2007. 213 f. Tese (Doutorado). Facultad de Bioquímica y Ciências Biológicas, Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fe de la Vera Cruz, Argentina, 2007.

- Rohlf FJ, Marcus LF. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 8, p. 129–132.
- Rohlf FJ. 1999. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, v. 16, p. 197–223
- Rohlf FJ. 2000a. On the use of shape spaces to compare morphometric methods. *Hystrix*, v. 11, p. 9–25.
- Rohlf FJ. 2000b. Statistical power comparisons among alternative morphometric methods. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 111, n. 4, p. 463–478.
- Rohlf FJ. 2003. Bias and error in estimates of mean shape in geometric morphometrics. *Journal of Human Evolution*, v. 44, n. 6, p. 665–683.
- Rohlf FJ. 2006a. TPSUtil Program, version 1.74. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Rohlf FJ. 2006b. TPSDig Program, version 2.30. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ross PJ. 1998. Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. 2nd Ed IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. IUNC, Gland, Switzerland and Cambridge, Reino Unido.
- Shine R. 1989. Ecological cause for the evolution of sexual dimorphism: A review of the evidence. *The Quarterly Review of Biology*, v. 64, n. 40, p. 420-46.
- Smith G, Lemos-Espinal J, Ballinger R. 1997. Sexual dimorphism in two species of Knob-scaled lizards (*Genus xenosaurus*) from Mexico. *Herpetologica*, v. 53, n. 2, p. 200-205.
- Stoker C, Rey F, Rodriguez H, Ramos JG, Sirosky P, Larriera A. 2003. Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology*, v. 133, p. 287–296.
- Thorbjarnarson JB. 1992. Crocodiles. An Action Plan for Their Conservation. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group. Switzerland. p.136.
- Thorbjarnarson JB. 2010. Black Caiman *Melanosuchus niger*. In: “Crocodiles. Status Survey and Conservation Action Plan. Crocodile Specialist Group” Ed by SC Manolis, C Stevenson, Switzerland, p. 29-39
- Valenzuela N, Adams DC, Bowden RM, Gauger AC. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia*, n. 4, p. 735-742.
- Vasquez PG. 1991. *Melanosuchus niger* (Spix) black caiman. *Catalogue of American Amphibians and Reptiles*, p. 530.1-530.4
- Verdade LM. 2000. Regression equations between body and head measurements in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 60, n. 3, p. 469-482

- Verdade L. 2001. Allometry of reproduction in broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*). Brazilian Journal of Biology, v. 61, n. 3, p. 171-175.
- Verdade L. 2003. Cranial sexual dimorphism in captive adult broadsnouted caiman (*Caiman latirostris*). Amphibia-reptilia, v. 24, n. 1, p. 92-99.
- Vieira LG, Lima FC, Santos ALQ, Mendonça SHST, Moura LR, Iasbeck JR, Sebben A. 2011. Description of embryonic stages in *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (Crocodylia: Alligatoridae). Journal of Morphological Science, v. 28, n. 1, p. 11-22.
- Villamarín-Jurado F. Ecologia e modelagem da distribuição dos sítios de nidificação do jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) em uma área de várzea da Amazônia Central, Brasil. 2009. 71 f. Dissertação (Dissertação em Ecologia). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, 2009.
- Webb G, Messel H. 1978. Morphometrics analysis of *Crocodylus porosus* from the north coast of Arnhem Land, northern Australia. Australian Journal of Zoology, v. 26, n. 1, p. 1-27.
- Whitacker R, Whitacker Z, Vaughan A. 1980. Notes on sexing crocodilians. Journal of the Bombay Natural History Society, v. 77, n. 2, p. 341-343.
- Zelditch ML, Swiderski D, Sheets D, Fink WL. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. 2. ed. London: Elsevier, 2004.
- Ziegler T, Olbort S. 2007. Genital structures and sex identification in crocodiles. CSG Newsletter, v. 26, n. 3, p. 16-17