



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Melanosuchus niger*
(CROCODYLIA, ALLIGATORIDAE): DESCRIÇÃO DE ESTÁGIOS
E ONTOGENIA DO ESQUELETO**

DOUTORANDA: LUCÉLIA GONÇALVES VIEIRA

ORIENTADOR: ANTONIO SEBEN

**BRASÍLIA- DF
NOVEMBRO/2011**

**DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Melanosuchus niger*
(CROCODYLIA, ALLIGATORIDAE): DESCRIÇÃO DE ESTÁGIOS
E ONTOGENIA DO ESQUELETO**

LUCÉLIA GONÇALVES VIEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília para obtenção do título de doutora em Biologia Animal.

ORIENTADO: DR. ANTONIO SEBEN

**BRASÍLIA-DF
NOVEMBRO/2011**

Dedico aos meus pais, José Gonçalves Vieira e Maria Geralda de Oliveira, e aos meus irmãos, Luciana, Fábio, Flávio e Mateus, pelo carinho, apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que todos os dias de minha vida me deu forças para nunca desistir.

À minha família, por todo amor, amizade, exemplo de vida, apoio incondicional em todos os momentos e principalmente pelos sacrifícios dispensados para a minha criação e educação.

Ao meu orientador, professor Dr. Antonio Sebben, por seu apoio e amizade, além de sua dedicação, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao prof. Dr. André Luis Quagliatto Santos, sempre parceiro, generoso, solícito. Sou grata por tua força que sempre me revigora. Obrigado pela credibilidade, parceria e convívio.

À Sonia Helena Santesso Teixeira de Mendonca, Analista Ambiental do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Répteis e Anfíbios - RAN, sem sua ajuda incondicional, nas coletas, com certeza essa pesquisa não teria êxito.

Ao Fabiano Campos Lima pelo companheirismo, amizade e compreensão por todos estes anos. Sem sua contribuição e incentivo este doutorado seria mais difícil. Obrigada pela dedicação incondicional.

Ao prof. Dr. Douglas Riff pelas bibliografias sobre crocodilomorfos cedidas.

Ao Prof. Sacha Braun Chaves pela gentil orientação com o uso do microtomógrafo.

As professoras Aline Pic-Taylor e Lilian Giugliano pelas dicas e sugestões no projeto de qualificação.

À Núbia Esther pelo companheirismo e estadias em Brasília no começo dessa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Comparativa de Vertebrados da Universidade de Brasília, que me receberam muito bem. Leandro Ambrósio Campos, Karla Terpentino, Pedro Ivo M. Pellicano, Núbia Esther, Tainã Rapp Py-Daniel e Rafael Félix.

Aos amigos do Laboratório de Toxinologia pelas boas conversas. Prof. Carlos Schwartz, Profa. Elisabeth Schwartz, Jimmy Guerrero, Harry Morales, Cláudia Gimena, Fagner, Natiela Beatriz, Profa. Márcia Mortari, Prof. Osmindo Pires, Thalita Camargos e Rafael Melani.

Aos meus grandes amigos Washington, Válder César e dona Maria pela ajuda, companheirismo e amizade.

À Vivian Paes Leme e Camilla Marques pelo apoio, amizade e paciência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado entre 2009 e 2011.

Ao Instituto Chico Mendes IBAMA/RAN pela confiança e suporte.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram para a minha formação, seja através de conselhos, exemplos, críticas, sugestões e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Crocodylia	1
1.2 <i>Melanosuchus niger</i>	2
1.3 Determinação de estágios embrionário.....	2
1.4 Esqueleto dos Crocodylia	4
1.5 Crânio	5
1.6 Membros e cinturas torácicas e pelvianas	7
1.7 Esqueleto axial pós-cranial	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Local e coleta de embriões	11
3.2 Coleta de filhotes.....	11
3.3 Descrição de estágios embrionários	11
3.4 Microscopia eletrônica de varredura	12
3.5 Diafanização e coloração de ossos e cartilagens	12
3.6 Processamento histológico	13
3.7 Microtomografia.....	13
3.8 Descrição do esqueleto	14
3.9 Terminologia adotada.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Descrição dos estágios embrionários	15
4.1.1 Resultados.....	15
4.1.2 Discussão	24
4.2 Ontogenia do esqueleto	29
4.2.1 Esqueleto apendicular.....	28
4.2.1.1 Resultados.....	28
4.2.1.2 Discussão.....	50

4.2.2 Crânio.....	65
4.2.2.1 Resultados.....	65
4.2.2.2 Discussão.....	92
4.2.3 Esqueleto axil pós-cranial.....	100
4.2.3.1 Resultados	100
4.2.3.2 Discussão.....	126
5 CONCLUSÕES GERAIS	136
6 APÊNDICES.....	137
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	146

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Microscopia eletrônica de varredura de *M. niger* no estágio 4. Vista lateral. (A) visualização panorâmica, (B) detalhes do primórdio do olho e fosseta nasal (C), arcos faríngeos e (D) extremidade da cauda. Abreviaturas: AF, arcos faríngeos; PN, placódio nasal; PM, processo maxilar; PMa, processo mandibular; PA, placódio auditivo; PO, placódio óptico. Escala: 1mm. 16
- Figura 2.** Estágios de desenvolvimento embrionário de *M. niger* em vista lateral. (A) estágio 5, (B) estágio 6, (C) estágio 8, (D) estágio 10, (E), estágio 12, (F) estágio 13, (G) estágio 14, (H) estágio 16 e (I) estágio 18. Abreviaturas: AF, arcos faríngeos; Di, diencéfalo; Me, mesencéfalo; BP, broto membro pelvino; BT, broto membro torácico; PC, proeminência cardíaca; So, somitos. Escala: 10 mm. 18
- Figura 3.** Estágios de desenvolvimento embrionário de *M. niger* em vista lateral. (A) estágio 21, (B) estágio 22, (C) estágio 23, (D) estágio 24, (E) estágio 27 e (F) estágio 28. Escala: 20 mm 19
- Figura 4:** Desenvolvimento do membro torácico de *M. niger*. (A-C) vista lateral do membro torácico nos estágios 6, 7 e 11, respectivamente, (D-I) vista dorsal da mão direita. (D) estágio 12, (E) estágio 14, (F) estágio 16, (G) estágio 18, (H) estágio 24 e (I) estágio 27. Destaque para o desenvolvimento progressivo da placa digital e serração digital do membro e aparecimento de garras. Escala: 4 mm..... 22
- Figura 5:** Desenvolvimento do membro pelvino de *M. niger*. (A-D) vista lateral do membro pelvino direito nos estágios 6, 8, 10 e 11, respectivamente. (E-I) vista dorsal do pé direito. (E) estágio 12, (F) estágio 16, (G) estágio 18, (H) estágio 24 e (I) estágio 27. Destaque para o desenvolvimento progressivo da placa digital e serração digital do membro e aparecimento de garras. Escala: 4 mm..... 23
- Figura 6:** Estágios de desenvolvimento embrionário de *M. niger*. (A-C) vista lateral. (A) estágio 5, (B) estágio 15, (C) estágio 18, (D) estágio 24, vista dorsal; (E) estágio 15, vista ventral e (F) estágio 27. Abreviaturas: Cl, cloaca; DO, dente do ovo; FC, fissura coroide; MN, membrana nictante; PA, placódio auditivo; PI, pálpebra inferior; PO, placódio óptico; PS, pálpebra superior; PU, primórdio da papila urogenital; Um, cicatriz umbilical; Vi, vitelo. Escala: A e B 5 mm; C-F 10 mm 24
- Figura 7:** Cintura peitoral e membro torácico direito de *Melanosuchus niger* em vista lateral (A), medial (B), cranial (C e E), caudal (D e F). Abreviaturas: CD, crista deltopeitoral; CL, côndilo lateral; CM, côndilo medial; Co, coracóide; Es, escápula; EVDC, expansão ventral e dorsal do coracóide; EDVE, expansão dorsal e ventral da escápula; FC, forame do coracóide; PGC, processo glenóide do coracóide; PGE, processo glenóide da escápula; Ra, rádio; Ul, ulna. Escala: 30 mm 32

- Figura 8:** Mão direita de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A) e ventral (B). Abreviaturas: dc5+4+3, distal do carpo 5+4+3; Fa, falanges; I-V, dedos I-V; mc, metacarpos; p, pisiforme; R, rádio; r+i, radial+intermedio; U, ulna; u, ulnar do carpo. Escala 30 mm. 34
- Figura 9:** Cintura pélvica e membro pelvino direito de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C), cranial (D e F), caudal (E e G). Abreviaturas: AI, asa do ílio; CL, côndilo lateral; CM, côndilo medial; FA, fenestra acetabular; Fi, fíbula; IL, ílio; Is, ísquio; PICa, processo isquial caudal; PICr, processo isquial cranial; PM, processo medial; Pu, púbis; Ti, tíbia. Escala: 30 mm..... 36
- Figura 10:** Pé direito de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A) e ventral (B). Abreviaturas: dt3-4, distal do tarso 3 e 4; Fa, falanges; F, fíbula; f, fibular do tarso, i+c, intermédio+central; I-V, dedos I-IV; mt, metatarsos; mtV, metatarso V; T, tíbia. Escala 30 mm. 36
- Figura 11:** Condrogênese dos membros torácicos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) estágio 10, (B) início estágio 11, (C) fim estágio 11, (D) estágio 12, (E) início estágio 13, (F) estágio 14. Abreviaturas: c, central do carpo; dc 2-5, distais do carpo 2-5; I-V, dedos I-V; Fa1-Fa2, falanges 1-2; mc, metacarpos; p, pisiforme; R, rádio; Ra+i, radial mais intermédio do carpo; U, ulna; u, ulnar do carpo; Um, úmero. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 2 mm. 40
- Figura 12:** Condrogênese e ossificação das mãos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) estágio 16, (B) início estágio 18, (C) fim estágio 18, (D) estágio 19, (E) fim estágio 22, (F) início estágio 24. Abreviaturas: c, central do carpo; dc 2, distal do carpo 2; dc5+4+3, fusão dos distais do carpo 5+4+3; I-V, dedos I-V. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 2 mm. 41
- Figura 13:** Cortes histológicos de mãos de *M. niger*. (A) início estágio 14, (B) fim estágio 14, (C) estágio 15, (D) início estágio 18. Abreviaturas: c, central do carpo; dc2-5, distais do carpo 2-5; I-V, dedos I-V; r+i, radial mais intermédio do carpo; u, ulnar do carpo; seta, local de fusão. Coloração: Hematoxilina e eosina. Escala: 200 µm..... 42
- Figura 14:** Condrogênese e ossificação da cintura peitoral (A, B e C) e pelvina (D, E e F) de embriões de *M. niger*. (A) vista ventral, início estágio 13, (B) vista lateral, fim estágio 21, (C) vista ventral, fim estágio 24, (D) vista lateral, início estágio 13, (E) vista lateral, fim estágio 21, (F) vista lateral, fim estágio 24. Abreviaturas: Co, coracóide; Es, escápula; IL, ílio; Is, ísquio; Pu, púbis. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm. 42

Figura 15: Padrão de ossificação das mãos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) início estágio 18, (B) estágio 21, (C) fim estágio 22, (D) estágio 23, (E) início estágio 24, (F) estágio 24 avançado. Abreviaturas: fa, falanges; I-V, dedos I-V; mc, metacarpos; U, ulna; u, ulnar do carpo; Um, úmero; R, rádio; r+i, fusão do radial mais intermédio do carpo. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.43

Figura 16: Padrão de ossificação das mãos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) fim estágio 24, (B) início estágio 25, (C) estágio 25 avançado, (D) fim estágio 25, (E) início estágio 26, (F) estágio 28. Abreviaturas: I-V, dedos I-V; p, pisiforme; r+i, fusão do radial mais intermédio do carpo; u, ulnar do carpo. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.44

Figura 17: Cortes histológicos de membros pés de *M. niger*. (A) fim estágio 11, (B) início estágio 13, (C) fim estágio 13, (D) fim estágio 16. Abreviaturas: c, central; dt2-4, distais do tarso 2-4; F, fibula, f, fibular do tarso; i, intermédio; I-V, dedos I-V; mt5, metatarso 5; T, tibia. Coloração: Hematoxilina e eosina. Escala: 0,5 mm47

Figura 18: Condrogenêse dos membros pelvins de embriões de *M. niger*, vista dorsal. (A) fim estágio 8, (B) fim estágio 9, (C) início estágio 10, (D) fim estágio 11, (E) estágio 12, (F) início estágio 13, (G) fim estágio 14, (H) início estágio 18. Abreviaturas: dt2-4, distais do tarso 2-4; Fe, fêmur; F, fibula; f, fibular do tarso; I-IV, dedos I-IV; i, intermédio; i+c, fusão do intermédio mais central; mt5, metatarso 5; T, tibia;. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 2 mm.46

Figura 19: Padrão de ossificação dos pés de embriões de *M. niger*, vista dorsal. (A) fim estágio 18, (B) fim estágio 19, (C) fim estágio 21, (D) início estágio 22, (E) fim estágio 22, (F) início estágio 24, (G) fim estágio 24, (H) início estágio 25, (I) início estágio 26. Abreviaturas: dt3-4, distais do tarso 3-4; Fe, fêmur; F, fibula; f, fibular do tarso; I-IV, dedos I-IV; i+c, intermédio mais central do tarso; mt5, metatarso 5; T, tibia;. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.49

Figura 20: Desenho esquemático do mecanismo da respiração pélvica em *Alligator* durante a expiração (A) e inspiração (B). Modificado de Carrier e Farmer (2000) 51

Figura 21: Filogenia da transição do osso púbis. Vista lateral da pelve direita. Em *Leptosuchus* e o crocodylomorpha basal *Terrestrisuchus* o púbis ainda articula com ambos os ossos ílio e ísquio. Nos crocodyliformes basal *Orthosuchus*, o púbis articula apenas com a margem anterior proximal do ísquio. Ílio destacado de amarelo, ísquio em azul e púbis em vermelho. Modificado de Claessens (2004)52

- Figura 22:** Vista ventral e dorsal do crânio de *Melanosuchus niger* adulto, com suturas demarcadas. Abreviaturas: Coa, coana; Com, côndilo; Ecp, ectopterigoide; Es, esquamosal; FPr, forame pré-maxilar; FP, forame palatino; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Ma, maxila; Na, nasal; Pa, parietal; Pfr, pré-frontal; Pl, palatino; Po, pós-orbital; Prm, pré-maxila; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; So, supraoccipital; Vo, vômer. Escala:50mm. 71
- Figura 23:** Vista lateroventral do crânio de *Melanosuchus niger* adulto. Abreviaturas: Ecp, ectopterigoide; Ju, jugal; Ma, maxila; Pl, palatino; Pt, pterigóide; PPF, pilar pré-frontal; STO, sulco do trato olfatório. Escala: 50 mm 72
- Figura 24:** Vista caudal do crânio de *Melanosuchus niger* adulto, com suturas demarcadas. Abreviatur as: Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; Es, esquamosal; Ex, exoccipital; FM, forame magno; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; So, supraoccipital. Escala: 50 mm..... 74
- Figura 25:** Vista dorsal (A) e ventral (B) da mandíbula de *Melanosuchus niger* adulto. Abreviaturas: An, angular; Ar, articular; Co, coronóide; De, dentário; Ep, esplênial; Sa, suprangular. Escala: 50 mm 77
- Figura 26:** Vista lateral (A) e medial (B) da mandíbula de *Melanosuchus niger* adulto. Abreviaturas: An, angular; Ar, articular; Co, coronóide; De, dentário; Ep, esplênial; FeM, fenestra mandibular externa; Sa, suprangular. Escala: 50 mm..... 78
- Figura 27:** Condrocrânio de *Melanosuchus niger*. (A) vista ventral, estágio 10; (B) vista lateral, estágio 10; (C) vista ventral, estágio 11; (D) vista dorsal, estágio 12; (E) vista lateral, estágio 12; (F) vista ventral, estágio 12; (G) vista dorsal, estágio 14; (H) vista lateral, estágio 14. Abreviaturas: Ac, cartilagem acrocordal; AO, arco occipital; CE, comissura esfenoetmóide; CN, cápsula nasal; Cl, columela; CO, cápsula ótica; CoN, concha nasal; FE, fenestra epiótica; FH, forame hipoglosso; FM, fenestra metótica; FO, Fenestra óptica; FoH, fossa hipofisária; FON, fenestra orbitonasal; LTA, Lâmina transversa anterior; Me, cartilagem de meckel; No, notocorda; PA, pila antótica; PB, plano basal; PI, processo infrapolar; PM, pila metótica; Pq, cartilagem pterigoquadrada; PrA, proatlas; PS, plano suprasedal; Ptc, cartilagem parietotectal; Qd, cartilagem quadrada; SIn, septo internasal; SIO, septo interorbital; TC, trabécula comum; Tma, ténia marginal; Tme, ténia medial; TN, teto nasal; Tr, trabécula; TS, teto sinótico; ZA, zona anular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina e cartilagem com azul de alcian. Escalas: A, B e C 2 mm; D, E, F, G e H 5 mm..... 78
- Figura 28:** Condrocrânio de *Melanosuchus niger* com detalhe na columela. Fim do estágio 14. Abreviaturas: Cl, columela; Me, cartilagem de meckel; CRe, cartilagem retroarticular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 10mm. 80

Figura 29: Cortes transversais seriados do condrocânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 11; (B) estágio 12; (C) estágio 12; (D) estágio 13; (E) estágio 14; (F) estágio 16. Abreviaturas: ACi, artéria carótica interna; An, osso angular; Ar, osso articular; Bs, osso basisfenpoide; Cb, cérebro; CO, cápsula ótica; CPQ, cartilagem pterigoquadrada; De, osso dentário; Ep, esplenial; GT, gânglio trigêmeo; Hi, hióide; Hp, hipófise; Ju, osso jugal; Li, língua; Ma, maxila; Me, cartilagem de meckel; MN, membrana nictante; NMd, nervo mandibular; NMx, nervo maxilar; NOf, nervo oftálmico; PA, pila antótica; PB, placa basal; Po, osso pós-orbital; PS, plano suprasedal; Pt, osso pterigóide; Sa, osso suprangular; SIO, septo interorbital; TC, trabécula comum; Tr, trabécula; II, nervo óptico; III, nervo oculomotor; IV, nervo troclear. Coloração: Hematoxilina e eosina. Escala: 3mm. 81

Figura 30: Processo de ossificação de crânio de *Melanosuchus niger*. (A) vista lateral, início estágio 16; (B) vista lateral, fim estágio 16; (C) vista dorsal, fim estágio 16; (D) vista lateral, estágio 18; (E) vista ventral, estágio 18; (F) vista dorsolateral, estágio 24; (G) vista lateral, com detalhes em (E), estágio 21. Abreviaturas: An, angular; Bs, basisfenóide; Co, coronóide; De, dentário; Fr, frontal; Es, esquamosal; Hi, hióide; Ju, jugal; La, lacrimal; Le, lateroesfenóide; Ma, maxilar; Na, nasal; Prf, pré-frontal; Prm pré-maxilar; Po, pós-orbital; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Sa, supra-angular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 10mm. 87

Figura 31: Processo de ossificação do crânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 15; (B) estágio 16; (C) estágio 21; (D) estágio 22; (E) início estágio 24; (F) estágio 28. Vista lateral. Abreviaturas: An, angular; Co, coronóide; De, dentário; Es, esquamosal; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Ma, maxilar; Na, nasal; Po, pós-orbital; Prf, pré-frontal; Prm pré-maxilar; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; Sa, suprangular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina. Escala. 10mm. 88

Figura 32: Processo de ossificação de crânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 15; (B) estágio 16; (C) estágio 22; (D) fim estágio 24; (E) estágio 19; (F) estágio 20; (G) estágio 22; (H) estágio 26; (I) 42 dias pós-eclosão. Vista dorsal. Abreviaturas: Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; Ex, exoccipital; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Ma, maxilar; Na, nasal; Prf, pré-frontal; Prm pré-maxilar; Pt, pterigóide; Pp, palpebral; So, supraoccipital. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina. Escala: A, B, E, F,G e H 10mm; C e D 5mm. 89

Figura 33: Crânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 15; (B) estágio 16; (C) início estágio 19; (D) fim estágio 20; (E) início estágio 21; (F) início estágio 25; (G) fim estágio 24 (H) 42 dias pós-eclosão. Vista ventral. Abreviaturas: An, angular; Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; Ecp, ectopterigóide; Ex, exoccipital; De, dentário; Hi, hióide; Ju, jugal; Ma, maxilar; Pl, palatino; Prm pré-maxilar; Pt, pterigóide; Pr,

proótico. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina. Escala. 10mm 90

Figura 34: Cortes frontais semi-seriados, do crânio de *Melanosuchus niger*. Estágio 26. Abreviaturas: An, angular; Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; CM, canal mandibular; Co, coronóide; De, dentário; Dt, dente; Ecp, ectopeterigóide; Ep, esplenial; Es, esquamosal; Ex, exoccipital; FC, fontanela craniana; FM, forame magno; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Le, lateroesfenóide; Ma, maxila; Na, nasal; Op, opostótico; Pa, parietal; Pl, palatino; PN, passagem nasal; Po, pós-orbital; Pp, palpebral; Prf, pré-frontal; Ps, paresfenóide; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; Sa, supra-angular; So, supraoccipital; Vo, vomer. Microtomografia e reconstrução 3D. Escala: 10mm..... 91

Figura 35: Costelas cervicais de *Melanosuchus niger*, desarticulas em vista ventral. Abreviaturas: Cap, capítulo; CC1-8, costelas cervicais 1-8; Cor, corpo da costela; Inc, incisura capítulo-tubercular; PCr, processo cranial; Tub, tubérculo. Escala: 5mm 100

Figura 36: Costelas cervicais de *Melanosuchus niger*. Vista caudal (A) e lateral (B) da sexta costela articulada com sua respectiva vértebra. Vista ventral (C) e lateral (D) da quarta e quinta costelas articuladas com suas respectivas vértebras. Abreviaturas: Cap, capítulo; CC5-4, costelas cervicais 5-4; Cor, corpo da costela; PCr, processo cranial costal; Tub, tubérculo. Escala: 10mm 101

Figura 37: Costelas e vértebras dorsais de *Melanosuchus niger*. Vista dorsal (A) e vista ventral (B). Abreviaturas: Cap, capítulo; CD1, costela dorsal 1; CD4, costela dorsal 4; CoV, corpo vertebral; PoZ, pós-zigapófise; PrC, processo cranial; PTr, processo transversal; PrV, processo ventral; Tub, tubérculo; PUn, processo uncinado. Escala: 50 mm 103

Figura 38: Costelas, processo uncinado e esterno de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A) e vista ventral (B). Abreviaturas: CD1, costela dorsal 1; CD4, costela dorsal 4; CD11, costela dorsal 11; Est, esterno; Itc, interclavícula; PrC, processo cranial; PUn, processo uncinado. Escala: 50mm 104

Figura 39: Gastrália de *Melanosuchus niger* em vista ventral. Escala: 20 mm 104

Figura 40: Atlas articulado com o eixo de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista cranial (B), vista dorsal (C) e vista ventral (D). Abreviaturas: PrA, proatlas; ArN, arco neural; InC, intercentro; PrO, processo odontóide; Ax, eixo. Escala: 20mm..... 106

Figura 41: Eixo de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista caudal (B), vista cranial (C), vista dorsal (D) e vista ventral (E). Abreviaturas: Con, côndilo vertebral;

PrE, processo espinhoso; PrO, processo odontóide; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; SN, sutura neurocentral. Escala: 20mm..... 108

Figura 42: Vértebras cervicais de *Melanosuchus niger*, em vista, da esquerda para direita lateral, caudal, cranial, dorsal e ventral. Vértebra cervical III (A), Vértebra cervical IV (B), Vértebra cervical V (C), Vértebra cervical VI (D), Vértebra cervical VII (E) e Vértebra cervical VIII. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; PrE, processo espinhoso; CoV, corpo vertebral; Par, parapófise, Dia, diapófise; Cav, canal vertebral; PrV, processo ventral. Escala: 20mm..... 109

Figura 43: Vértebras lombares e sacrais de *Melanosuchus niger* em vista lateral (A), vista dorsal (B) e vista ventral (C). Abreviaturas: PrE, processo espinhoso; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; PrT, processo transvers, Cov, corpo vertebral; L1-3, vértebras lombares 1-3; S1-2, vértebra sacrais 1-2; D12-D13, vértebra dorsais 12-13. Escala: 40 mm..... 111

Figura 44: Primeira vértebra caudal de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista cranial (B), vista caudal (C), vista dorsal (D), vista ventral (E). Abreviaturas: CCa1, costela caudal 1; CoBi, côndilo biconvexo; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; PrE, processo espinhoso. Escala: 20mm..... 113

Figura 45: Vértebras caudais de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista dorsal (B) e vista ventral (C). Abreviaturas: CCa, costela caudal; PrE, processo espinhoso; PrH, processo hemal; SN, sutura neurocentral. Escala: 40mm..... 114

Figura 46: Condogenese do esqueleto axial pós-cranial de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A e B) e vista lateral (C-G). (A) estágio 7, (B) estágio 8, (C) estágio 10, (D) início estágio 13, (E) fim estágio 13, (F) início estágio 16, (G) estágio 19. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CC, costela cervical; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; No, notocorda; PUn, processo uncinado. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: A, B, C 3mm; D, E, F, G 5mm..... 116

Figura 47: Condrogênese de vértebras de *Melanosuchus niger* no final estágio 12, vista cranial. (A) vértebra cervical, (B) vértebra dorsal, (C) vértebra lombar, (D) vértebra sacral, (E) vértebra caudal cranial, (F) vértebra caudal média, (G) vértebra caudal distal. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CC, costela cervical; CCa, costela caudal; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; CS, costela sacral; PrE, processo espinhoso; PrT, processo transvers; PUn, processo uncinado. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 1mm. 117

Figura 48: Processo de ossificação do esqueleto axial pós-cranial de *Melanosuchus niger* em vista lateral. (A) início estágio 20, (B) fim estágio 21, (C) estágio 22, (D) início estágio 24, (E) fim estágio 25, (F) estágio 28. Abreviaturas: ArV, arco vertebral;

VCa1, vértebra caudal 1; CC, costela cervical; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; PrH, processo hemal. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5mm. 118

Figura 49: Condrogênese e ossificação de embriões de *Melanosuchus niger* em vista lateral. (A) fim estágio 13, (B) início estágio 16, (C) início estágio 16, (D) início estágio 20, (E) fim estágio 20, (F) início estágio 24, (G) início estágio 24, (H, I e J) fim estágio 25. Abreviaturas: ArN, arco neural; Ax, áxis; CC, costela cervical; CC1, costela cervical; CC8, costela cervical 8; Inc, intercentro; Itc, interclavícula; Pat, proatlas; PrO, processo odontóide. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5mm. 119

Figura 50: Condrogênese e ossificação de embriões *Melanosuchus niger* em vista lateral. (A e B) estágio 19, (C) início estágio 22, (D) fim estágio 22, (E) início estágio 24, (F) fim estágio 25, (G, H e I) estágio 28. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; Est, esterno; Ga, gastrália; IL, ílio; Itc, interclavícula; PrT, processo transverso; PUn, processo uncinado; VCa1, vértebra caudal 1, VL3, vértebra sacral 1. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5mm. 120

Figura 51: Cortes histológicos da gastrália e processo uncinado de *M. niger*. (A) fim estágio 16, (B e C) fim estágio 24, (D e E) início estágio 27, (F) início estágio 25. Abreviaturas: Ga, gastrália; Itc, interclavícula; PUn, processo uncinado. Barra 200µm. 122

Figura 52: Embrião de *Melanosuchus niger* no estágio 28, vista lateral. (A) segmento da coluna dorsal, (B) segmento da coluna lombar, (C) segmento da coluna sacral, (D) segmento da coluna caudal. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CoV, corpo vertebral; IL, ílio; SN, sutura neurocentral; PrT, processo transverso. Microtomografia e reconstrução 3D. Escala: 10mm. 123

Figura 53: Cortes histológicos de segmentos da coluna cervical (A, B,C), dorsal (D, E, F) e lombar (G, H) de *M. niger*. (A e D) estágio 14, (B e G) estágio 19, (C e F) início estágio 25, (E) fim estágio 24, (H) início estágio 27. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; Cap, capítulo; CC, costela cervical; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; Dia, diapófise; SN, sutura neurocentral; Par, parapófise; PrE, processo espinhoso; PrT, processo transverso; PUn, processo uncinado; PrV, processo ventral; SN, sutura neurocentral; Tub, tubérculo. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barra 400µm. 124

Figura 54: Cortes histológicos de segmentos da coluna cervical, dorsal e lombar de *M. niger*. (A e G) estágio 19, (B e E) início estágio 25, (C) estágio 14, (D e F) fim estágio 24, (H) início estágio 27. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CCa, costela caudal; CoV, corpo vertebral; CS, costela sacral; Fe, fêmur; PrE, processo espinhoso; PrT, processo transverso; SN, sutura neurocentral;. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barra 400µm. 125

RESUMO

Neste trabalho caracterizamos os estágios embrionários de *Melanosuchus niger*, baseado nas principais transformações morfológicas sofridas pelo embrião durante o processo de desenvolvimento e descrevemos a formação condrogênica e o padrão de ossificação do esqueleto. Na Reserva Extrativista do Lago do Cuniã, Rondônia, Brasil, seis ninhos foram marcados e protegidos após sua postura. As amostras foram submetidas à técnica de diafanização e coloração dos ossos e cartilagens. Para estágios iniciais foi empregada a técnica histológica de rotina com coloração HE e microscopia eletrônica de varredura para análises mais acuradas. Identificamos 28 estágios embrionários entre a formação do arco faríngeo e eclosão. As variações encontradas no aparecimento das estruturas do *M. niger* comparado com outros Crocodylia, podem ser explicadas, em parte, pela temperatura. Na coluna vertebral a formação cartilaginosa aparece primeiro nos arcos vertebrais e só mais tarde no corpo vertebral, a progressão dessa condensação segue no sentido crânio-caudal. Já o processo de ossificação se inicia nos corpos das vértebras e depois pelos arcos vertebrais também no sentido crânio-caudal. Os processos espinhoso e transversal desenvolvem-se a partir de extensões do arco vertebral e as costelas surgem com centros de ossificação independente. O condrocrânio de *M. niger* corresponde nas regiões da cápsula nasal orbitotemporal e ótico-occipital. Seu desenvolvimento inicia-se no estágio 9, com a condrificação da cartilagem acrocordal, das trabéculas e da cartilagem mandibular. A cápsula nasal inicia sua formação pela condrificação do septo nasal no estágio 10, que contata a região orbitotemporal através da comissura esfenotimóide. A cartilagem quadrada bem como a placa basal estão presentes no estágio 13 e 14, respectivamente. O condrocrânio apresenta-se bem formado no estágio 16. Mas as primeiras ossificações são notadas a partir do estágio 13 nos ossos maxila, jugal, pós-orbital, pterigóide e dentário. O osso parietal inicia sua formação óssea a partir de dois centros de ossificação, no estágio 20. O basisfenóide e o paraesfenóide se ossificam nos estágios 15 e 16 e, durante a ontogenia, se fundem e dão origem ao parabasisfenóide. Os ossos da mandíbula se ossificam entre os estágios 13 a 16. Os ossos quadrado, lateroesfenóide, basisfenóide, basioccipital, exoccipital, proótico, epiótico, opistótico, supraoccipital e articular se ossificam de maneira endocondral. Os elementos dérmicos iniciam sua ossificação antes dos endocondrais. Na cintura peitoral a escápula é ligeiramente maior e apresenta centros de ossificação antes do coracóide. Nos elementos da cintura pelvina, ílio e

Ísquio se desenvolvem como uma peça única, apesar de se ossificarem por dois centros distintos. Já o púbis se desenvolve por um centro cartilágneo independente e se mantém livre. Nos estágios iniciais descrevemos a formação do estilopódio e zeugopódio dos membros torácicos e pelvins, oriunda da condensação cartilágnea com formato de Y, diferenciação do eixo primário e arco digital. As maiores alterações foram observadas nos mesopódios, tanto no padrão condrogênico como na ossificação, como fusões de elementos cartilágneos e ausência de ossificação em algumas falanges. As sequências condrogênica e de ossificação não seguem o mesmo padrão de outros grupos de répteis. Além do mais, as diferenças apontadas entre *M. niger* e outras espécies indicam claramente que há mais de um padrão desses eventos para os Alligatoridae.

Palavras-chave: Anatomia, embrião, jacaré-açu, ontogenia, ossificação

ABSTRACT

In the present work, we characterize the embryonic stages of *Melanosuchus niger*, based on the main morphological transformations which occur during development. We also describe the chondrogenesis and ossification pattern of the skeleton. Six nests were labeled and protected following laying in the Reserva Extrativista do Lago Cuniã, Rondônia, Brasil. Samples were prepared using the clearing and double-staining method. For the early stages, a routine histological technique HE, was applied and for more accurate analysis scanning electron microscopy was used. We established 28 embryonic stages from the formation of pharyngeal arches to hatch. The variations found in embryogenesis of *M. niger*, when compared to other Crocodylia can be partially explained by temperature. Spinal column cartilage formation centers rise in vertebral arches and only later in the vertebral body and the progress of this condensation follows a cranio-caudal direction. The process of ossification begins in the vertebral body and then by the vertebral arches also follows a cranio-caudal direction. The spinous and transverse processes develop from vertebral arch extensions and the ribs develop independently. The chondrocranium of *M. niger* corresponds to the nasal capsule, orbitotemporal and otic-occipital regions. Its development begins at stage 9, with chondrification of the trabeculae, and the acrocordal and mandibular cartilages. The nasal capsule begins its formation with chondrification of the nasal septum at stage 10, which reaches the orbitotemporal region through the sphenothmoidal commissure. The quadrate cartilage and the basal plate are present at stages 13 and 14, respectively. Chondrocranium is already well formed on Stage 16. However, early ossifications are noticed from stage 13 on maxillary, jugal, postorbital, pterygoid, and dentary bones. The parietal bone begins its formation on two ossification centers, at stage 20. Basisphenoid and Parasphenoid bones are formed at stages 15 and 16. These bones fuse during ontogeny, giving rise to the parabasisphenoid bone. The jaw bones ossify between Stage 13 and 16. Quadrate, laterosphenoid, basisphenoid, basioccipital, exoccipital, prootic, epiotic, opisthotic, supraoccipital and articular bones ossify endochondrally. Skin elements begin their ossification before the endochondral elements. On the forelimb, the scapula is larger than the coracoid and its ossification centers are previously formed. On the hindlimb, the ileum and ischium develop as a single piece, despite their ossifications being performed at two different centers. The pubis is developed by an independent

cartilaginous center, and remains unattached. During the early stages, we described the formation of stilopodium and zeugopodim of both the thoracic and pelvic limbs, originated from Y-shaped cartilaginous condensation, and differentiation the primary axis and digital arch. The most important alterations were observed for the mesopodium, on both chondrogenic pattern and ossification, as the fusion of cartilaginous elements and the absence of ossification of some phalanges. The chondrogenic and ossification sequences do not share the same patterns as other groups of reptiles. Moreover, the differences between *M. niger* and other species indicate that there is clearly more than one pattern of these events among Alligatoridae.

Key-words: Anatomy, embryo, Black caiman, ontogeny, ossification.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Crocodylia

A superordem Archosauria surgiu no Triássico e sobrevive até hoje. Sobreviveu as grandes extinções que marcaram a história, com grande disparidade de formas e diversidade de espécies, além de ter um bom registro fóssil (Clark, 1994). Os Crocodylia, juntamente com as aves, são os únicos representantes vivos desse grupo (Benton e Clark, 1988).

Hoje, os Crocodylia representam apenas uma pequena fração das espécies que existiram há 220 milhões de anos. As 23 espécies viventes distribuem-se em oito gêneros e três famílias, Alligatoridae com oito espécies nas regiões Holártica, Oriental e Neotropical, Crocodylidae com 14 espécies nas regiões Neotropical, Oriental, Australiana e Etiopia, e Gavialidae com apenas uma espécie na região oriental (Thorbjarnarson, 1996; Horna et al., 2001; Zug et al., 2001; Pough et al., 2003). Possuem o corpo alongado, crânio robusto com longo focinho e mandíbulas fortes guarnecidas de dentes, pescoço curto, tronco cilíndrico que continua numa cauda comprimida lateralmente, membros pequenos, mas fortemente desenvolvidos. O pescoço, tronco e cauda são protegidos dorsalmente e às vezes ventralmente por placas ósseas, os osteodermos, que são cobertos por uma grossa pele queratinosa (Scheyer e Sander, 2004; Azevedo, 2007).

Apesar de serem carnívoros, sua dieta inclui uma grande diversidade de itens na natureza. São predadores oportunistas, podendo se alimentar qualquer animal vivo capturável, incluindo os da mesma espécie. Tal consumo está relacionado com a disponibilidade e capturabilidade da presa. A dieta varia com a idade, habitat, estação do ano e região geográfica (Santos et al., 1993). Na natureza os filhotes alimentam-se de crustáceos, gastrópodes e principalmente insetos (Diefenbach, 1988).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Herpetologia (2010), no Brasil ocorrem seis espécies, todas pertencentes a família Alligatoridae: jacaré-paguá, *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807); jacaré-coroa, *Paleosuchus trigonatus* (Schneider, 1801); jacaré-açu, *Melanosuchus niger* (Spix, 1825); jacaré-tinga, *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758); jacaré-de-papo-amarelo, *Caiman latirostris* (Daudin, 1802) e jacaré-do-Pantanal, *Caiman yacare* (Daudin, 1802). Segundo Azevedo (2007), os representantes desse grupo de répteis são semi-aquáticos, e estão sempre associados

aos cursos d'água, bem como à vegetação que ocupa as margens de rios, riachos, lagos e lagoas (Herron, 1994). Aquecem-se regularmente nas margens e constroem ninhos terrestres para a incubação dos seus ovos.

1.2 *Melanosuchus niger*

A espécie *M. niger*, conhecida popularmente como jacaré-açu ou jacaré-gigante, distribui-se basicamente por toda a bacia amazônica. É a maior espécie da família Alligatoridae e os machos podem alcançar 4 metros de comprimento, chegando a extremos de até 6 metros (Medem, 1983; Farias et al., 2004).

Segundo Herron (1994) e Rebêlo e Lugli (2001), essa espécie é mais exigente em termos de qualidade de ambiente. É extremamente abundante em várzea e igapó de planície inundável, associado a lagos e pântanos. Constroem ninhos de 1,5 m de diâmetro durante a estação seca e põem de 30 a 60 ovos. Os ninhos podem ser vistos tanto em locais abertos, quanto em locais protegidos. A eclosão ocorre entre dois a três meses e coincide com o início da estação chuvosa (Medem, 1963; Herron, 1990; IBAMA, 2010). Segundo Packard e Packard (1984) e Pinheiro et al., (1997), a temperatura é um importante fator abiótico que influencia o período de desenvolvimento bem como a determinação sexual.

O jacaré-açu está avaliado pela IUCN (International Union for Conservation of Nature) e Apêndice I da CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) como uma espécie em risco de extinção (Ross, 1998). A ameaça de extinção se deu basicamente pela atividade predadora do homem em busca, principalmente, do couro, devido a baixa frequência de osteodermos, e da carne para o consumo. Entretanto, em algumas regiões da Amazônia existem populações extremamente numerosas que podem ser manejadas de maneira legal (Da Silveira et al., 1997; Da Silveira e Thorbjarnarson, 1999). Recentemente *M. niger* foi excluído da lista de espécies da fauna brasileira com ameaça de extinção, o que não ocorreu a nível internacional, devido seu elevado valor comercial (Villela, 2008).

1.3 Determinação de estágios embrionários

A embriologia dos répteis tem sido investigada há muito tempo, por diferentes pesquisadores (Parker, 1869; Kamal e Hammouda, 1965; Kamal et al., 1970). Hamburger e Hamilton (1951) foram os primeiros a fornecer um padrão de estágios

embrionários normal para Archosauria. Posteriormente várias espécies de répteis tiveram seus estágios determinados (Yntema, 1968; Noro et al., 2009; Tokita e Kuratani, 2001). Já para a ordem Crocodylia há ainda escassez de estudos dessa natureza, sendo Magnusson e Taylor (1980) os pioneiros na caracterização dos estágios embrionários baseado nas características morfológicas externas para *Crocodylus porosus* (Crocodylidae), seguido por Ferguson (1987) para *Alligator mississippiensis* (Alligatoridae) e Iungman et al. (2008) para *Caiman latirostris* (Alligatoridae). Embora outras obras mais antigas, como a de Voeltzkow (1899) *apud* Iungman et al. (2008) com *Crocodylus madagascariensis* e Reese (1915) com *Alligator mississippiensis*, tenham descrito algumas características embrionárias, nenhum deles estabeleceram uma série completa.

Antes da descrição e padronização desses estágios, muitos pesquisadores usavam padrões de medidas corporais com intuito de estimar idade aproximada do embrião (Risley, 1933), ocorrendo constantes erros. Uma classificação baseada também apenas na idade cronológica tem muitas falhas, especialmente em relação ao tempo de incubação, que é normalmente variável e alterações na taxa de desenvolvimento podem ocorrer entre os embriões da mesma idade e dentro de um mesmo ninho (Donayo et al., 2002).

O tempo de incubação dos ovos de *Melanosuchus niger* compreende o período desde a desova até a eclosão, e pode variar de dois a três meses (Medem, 1963; Herron, 1990). Estudos com Crocodylia demonstraram que a temperatura é um importante fator abiótico que influencia a duração do desenvolvimento embrionário, embora também possa ser afetado por outras variáveis, como umidade (Packard e da Packard, 1984).

O estabelecimento dos estágios embrionários das espécies de Crocodylia *C. porosus* (Magnusson e Taylor, 1980), *A. mississippiensis* (Ferguson, 1987) e *C. latirostris* (Iungman et al., 2008), bem como para *Apalone spinifera* (Greenbaum e Carr, 2002), *Python sebae* (Boughner et al., 2007), *Gallus gallus* (Hamburger e Hamilton, 1951), *Coturnix coturnix japonica* (Ainsworth et al., 2010), *Eleutherodactylus coqui* (Townsend e Stewart, 1985) e *Carofilia perspicillata* (Cretkos et al., 2005), foram definidos de acordo com o aparecimento contínuo de distintas características morfológicas externas em determinado momento do desenvolvimento. Essas características são descritas detalhadamente e são consideradas critérios para o reconhecimento diferencial de cada estágio.

1.4 Esqueleto dos Crocodylia

Segundo Rieppel (1993b), o esqueleto dos Crocodylia se divide anatomicamente em: **crânio**, composto pelo os ossos do crânio; **esqueleto axial pós-cranial**, composto pelos ossos da coluna vertebral e costelas e o **esqueleto apendicular**, formado pelos ossos das cinturas peitoral e pelvina e pelos ossos dos membros torácicos e pelvinos.

O esqueleto dos vertebrados é um dos sistemas mais importantes para estudos morfológicos, uma vez que, a estrutura mineralizada dos ossos é preservada em fósseis, isto permite comparações com grupos vivos e a determinação de homologias, com o intuito de traçar as relações entre os diferentes grupos (Buscalion et al., 1997). As grandes variações dos elementos esqueléticos observados ao longo da história evolutiva dos grandes grupos, refletem a plasticidade de tal sistema para responder aos diferentes habitats dos animais, e fornecem informações importantes a respeito do modo de vida animal, como postura, porte, tipo de locomoção, alimentação, entre outras (Shubin et al., 1997; Kardong, 2010).

Os padrões de desenvolvimento das cartilagens e ossos mostram os mecanismos responsáveis pela origem destas variações evolutivas, e são importantes indícios de relações de parentesco (Maisano, 2002).

O sistema esquelético dos vertebrados é composto de cartilagem e osso e apresentam variação na morfologia e arquitetura tecidual (Hua e Buffrenil, 1996). Entretanto, a despeito desta diversidade, eles apresentam algumas características embrionárias comuns. Todos os tecidos esqueléticos provêm de células com morfologia mesenquimal, mas a origem do mesênquima é o produto de células de três linhagens embrionárias distintas. Células da crista neural formam o esqueleto craniofacial, o mesoderma paraxial deriva o esqueleto axial, e as células do mesoderma lateral formam os membros (DeLise et al., 2000; Olsen et al., 2000; Kawakami et al., 2006).

No início do desenvolvimento do esqueleto, células mesenquimais começam a se condensar em locais que eventualmente serão ocupados por elementos do esqueleto. Estas condensações mesenquimais formam os primeiros moldes do esqueleto. Pouco tempo depois, células dentro destas condensações se diferenciam em condroblasto e formam o primeiro esboço cartilágneo do esqueleto. Em tais modelos, uma seqüência de modificações regulares assinala o aparecimento de centros de ossificação. No local onde irá formar cartilagem, as células mesenquimais isoladas retraem seus prolongamentos, arredondam-se e se agrupam em massas densas chamadas de centro de

condrificação (Olsen et al., 2000; Mackie et al., 2008). À medida que este processo progride, os condroblastos ficam aprisionados na sua própria matriz e diferenciam-se em condrócitos. Estes sintetizam e renovam macromoléculas da matriz cartilágnea (Goldring et al., 2006; Prochel, 2006).

A formação do osso durante o desenvolvimento embrionário pode ocorrer basicamente por duas maneiras: ossificação endocondral e ossificação intramembranosa. O osso formado por qualquer destes dois processos é idêntico histologicamente (Wagner e Karsenty, 2001; Miura et al., 2008). A maioria dos ossos longos e curtos do corpo se desenvolve por ossificação endocondral. Este tipo de ossificação utiliza uma peça de cartilagem hialina como molde. Há a formação inicial de uma placa delgada de matriz óssea na região média da diáfise onde os condrócitos se hipertrofiam, a matriz cartilágnea é reduzida e mineralizada e os condrócitos morrem por apoptose (Wagner e Karsenty, 2001). Este processo se inicia precocemente no embrião, continuando após o nascimento, cada vez com mais cartilagem sendo substituída por osso (Inada et al., 2004).

A ossificação intramembranosa ou dérmica é responsável pelo desenvolvimento dos ossos planos, especialmente aqueles que se encontram no crânio. Ao contrário do que acontece na ossificação endocondral, a cartilagem não está envolvida ou presente nesse processo. Envolvem a mineralização direta da membrana de tecido conjuntivo, ricamente vascularizado. O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimais que se transformam em grupos de osteoblastos. Estes sintetizam o osteóide, que logo se mineraliza. Os vários centros de ossificação crescem radialmente, acabando por substituir a membrana conjuntiva preexistente (Olsen et al., 2000; Scheyer e Sander, 2004).

1.5 Crânio

Estudos em biologia do desenvolvimento têm como foco principal o conhecimento dos padrões evolutivos e os mecanismos de formação dos organismos (Raff e Raff, 2000; Hall, 2002; Arthur, 2002a, b). A condrogênese e a seqüência de ossificação são de grande interesse para compreensão da evolução dos sistemas morfológicos. Mabee e Trendler (1996), Smith (2002), Sanchez-Villagra et al. (2007, 2009) e vários outros, contribuíram com subsídios para compreensão do papel da ontogenia nas mudanças evolutivas com base em análises filogenéticas e heterocrônicas,

sendo a descrição de possíveis transformações ontogênicas essencial para a compreensão do padrão de desenvolvimento (Schoch, 2006).

Os diferentes padrões de crescimento observados no esqueleto dos vertebrados são promovidos pela morfogênese, que são determinados pela interação de fatores intrínsecos, ou gênicos, e extrínsecos, sendo estes, representados por alterações nos fatores ambientais, mecânicos ou funcionais, que podem estimular ou inibir o crescimento, especialmente no crânio (Monteiro e Soares 1997; Monteiro et al., 1997; Vickaryous e Hall, 2008).

As investigações acerca da formação do crânio apresentam este foco, visto que mínimas mudanças neste sistema multidimensional podem representar um grande significado fenotípico. Embora o crânio dos vertebrados apresente uma grande variedade na arquitetura, função e padrões de crescimento, estes também possuem um alto grau de conservação nos mecanismos de desenvolvimento (Francis-West et al., 1998; Hall 1999). Em contrapartida existem demandas funcionais, as quais a anatomia destes organismos necessita se adaptar, refletindo no padrão de desenvolvimento das estruturas (Adriens e Verraes, 1998).

Para répteis, poucos detalhes do desenvolvimento do esqueleto do crânio são conhecidos. Estes exploram principalmente o padrão e sequência de ossificação de *Alligator mississippiensis* (Rieppel, 1993b; Bellairs e Kamal, 1981), alguns deles restritos a formação da dentição (Westergaard e Ferguson, 1986, 1987, 1990), desenvolvimentos de elementos dérmicos (Vickaryous e Hall, 2008), paresfenóide (Klembara, 1993) e posparietal (Klembara, 2001) e outros com foco no desenvolvimento da porção otoccipital (Shiino, 1914; De Beer, 1937; Müller, 1967; Iordansky, 1973), sendo concluído por vários destes autores que certas estruturas cranianas são filogeneticamente próximas com aves em relação aos demais répteis viventes (Baird, 1970).

A elucidação do padrão de desenvolvimento do crânio em Crocodylia viventes pode contribuir não somente para o entendimento da evolução desta estrutura, mas também para esclarecer similaridades e diferenças entre os vários táxons relacionados (Klembara, 2005), oferecendo subsídios que fomentem a interpretação de novas evidências fósseis que documentem a evolução dos Archosauria, bem como dados relevantes para futuras comparações filogenéticas.

1.6 Membros e cinturas torácicas e pelvianas

Os Archosauria são caracterizados por uma grande redução no número de elementos na região do carpo e tarso (Colbert, 1952; Romer, 1956; Parrish, 1987; Müller e Alberch, 1990; Burke e Feduccia, 1997; Riff, 2007). Isto reflete o ambiente e os modos de locomoção das diferentes espécies. Mesmo que o número de elementos ossificados do autopódio de alguns Archosauria seja o mesmo que em outros táxons, as diferenças reveladas durante o seu padrão de desenvolvimento condrogênico são consideráveis. A morfogênese da cartilagem define um padrão primário que pode ser alterada por heterocronia e um padrão secundário que envolve modificações do padrão primário (Müller, 1991). As modificações secundárias são anteriores à ossificação e, assim, a ossificação toma lugar da cartilagem pré-formada (Hinchliffe e Johnson, 1983).

No geral, os padrões esqueléticos dos membros dos tetrápodes derivaram do padrão primitivo por perdas e fusões de elementos, que podem ser constatadas por meio de estudos da embriologia (Hildebrand e Goslow, 2006; Romer, 1956).

O desenvolvimento embrionário é arquitetado a partir de complexos padrões de expressão de genes organizados espaço-temporalmente, que regem a construção do organismo, e que são extremamente conservados entre os grupos (Richardson et al., 1999; Carroll et al., 2000). Variações nestes padrões são, na maioria das vezes, os mecanismos responsáveis pela diversidade fenotípica (Dover, 2000; Wagner, 2001).

A ontogenia dos membros dos tetrápodes é um dos principais e mais bem conhecidos modelos no campo da biologia do desenvolvimento (Johnson e Tabin, 1997; Gilbert, 2006). Os membros são considerados como módulos praticamente autônomos que seguem uma seqüência de desenvolvimento muito bem estruturada por cascatas de expressão de genes, que coordenam a construção de uma estrutura completa e funcional. Estudos experimentais sobre o desenvolvimento dos membros mostraram que as regras básicas de construção são basicamente as mesmas para os tetrápodes (Shubin e Alberch, 1986), com moléculas de sinalização que desempenham papel fundamental na determinação dos três eixos do membro: *fator de crescimento do fibroblasto*, regulando o eixo próximo-distal; *sonic hedgehog*, regulando o eixo ântero-posterior e *Wnt7a*, regulando parte do eixo dorso-ventral (Gilbert, 2006).

Shubin e Alberch (1986) descreveram o desenvolvimento do esqueleto com base em conexões espaciais, onde as primeiras condensações esqueléticas aparecem proximalmente, e ainda outras condensações por meio de segmentação e eventos de

bifurcação ocorrem e formam o eixo primário, no qual o úmero/fêmur alonga-se e sofre ramificação para formar a ulna e rádio/fíbula e tibia, e o eixo primário se estende através da ulna/fíbula, ulnar do carpo/fibular do tarso e elementos do dedo IV. Müller e Alberch (1990) concluíram que esta é a característica invariável mais proeminente no desenvolvimento dos membros. Representantes Archosauria como *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990), *Struthio camelus* (Kundrát, 2009) e *Gallus gallus* (Burke e Feduccia, 1997), além de espécies de anuros (Fabrezi e Alberch, 1996), Lagartos (Blanco e Alberch, 1992) e Testudines (Sanchez-Villagra et al., 2008b, 2009; Sheil e Portik, 2008) seguem esse padrão.

A diferenciação precoce desse eixo primário é uma importante ferramenta morfológica que permite uma interpretação da identidade e homologia dos dedos e elementos específicos do autopódio, bem como identificar e discutir a relação de posições das estruturas e direções de crescimento (Burke e Feduccia, 1997).

Porém, poucos trabalhos abordam o desenvolvimento embrionário do esqueleto apendicular de reptilianos como *Chamaeleo hoehnelli* (Rieppel, 1993a), *Gehyra ocellata* e *Lepidodactylus lugubris* (Rieppel, 1994a), *Apalone spinifera* (Sheil, 2003), *Lacerta agilis exigua* (Rieppel, 1994b), *Podocnemis expansa* (Vieira e Santos, 2007), *Trachemys scripta* (Sheil e Portik, 2008) e *Struthio camelus* (Kundrát, 2009). Na ordem Crocodylia os processos ontogênicos que levam ao desenvolvimento desse segmento do esqueleto, foram restrito para *Alligator mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990; Rieppel, 1993b) e *Caiman yacare* (Lima, 2010); neste último, apenas o processo de sequência de ossificação é abordado.

1.7 Esqueleto axial pós-cranial

No desenvolvimento dos elementos vertebrais, a notocorda que sustenta o eixo do corpo do embrião nos estágios iniciais, é funcionalmente substituída por uma série de vértebras, que se formam ao redor desta e do tubo neural. A série vertebral pode ser dividida nas regiões pré-sacral, sacral e caudal. Cada vértebra é composta por um centro, um arco neural que cresce para formar dorsalmente o espinho neural e, em muitos casos, um intercentro localizado ventralmente entre cada centro vertebral. Na região caudal, arcos hemais em forma de “V” podem estender-se para baixo do intercentro ao longo da cauda (Vickaryous e Hall, 2008).

Articulado em algumas vértebras de Crocodylia, estão às costelas. Estas se conectam ao esterno por meio do processo uncinado. Originalmente, as costelas estendiam-se ao longo de todo o comprimento da coluna vertebral para aumentar o contato direto dos músculos axiais com o esqueleto. À medida que aumentaram em comprimento, elas passaram a proteger vísceras subjacentes, mas a flexibilidade e um peso mínimo foram mantidos. Somente nos amniotas elas estão especializadas para contribuir para o mecanismo respiratório (Hofstetter e Gasc, 1969; Paul, 2002).

Cada grupo de animais apresenta peculiaridades ontogenéticas durante a formação de seu esqueleto axial, resultando na forma adulta, que atende as necessidades específicas dos mesmos (Burke, 1989). Nos Testudines, por exemplo, o casco é uma característica evolutiva sinapomórfica altamente especializada, que faz deste um clado restrito (Gilbert et al., 2001; Lee, 1996; Li et al., 2008). Nos demais répteis, tais particularidades são menos notáveis e, conseqüentemente, menos exploradas. O esqueleto axial dos Crocodylia, dentre outros, apresentam características particulares e pouco conhecidas. Tais modificações podem ser entendidas por meio de estudos ontogênicos relacionados com o padrão evolutivo do táxon (Hildebrand e Goslow, 2006).

A ordem em qual os ossos se ossificam é uma fonte de dados, até então, pouco utilizada. Porém, recentemente, Maisano (2002), Sánchez-Villagra (2002) e Schoch (2006), tem destacado o potencial destas informações para análises filogenéticas. Embora estas sequências sejam, normalmente, conservadas dentro de uma espécie, os fatores que afetam a sua evolução são em grande parte especulativo, como é o efeito da seqüência de ossificação heterocronia e evolução morfológica (Sánchez-Villagra, 2002; Prochel, 2006; Sánchez-Villagra et al, 2008a; Maxwell, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os estágios embrionários e elucidar a ontogenia do esqueleto do *Melanosuchus niger*, nos diferentes estágios de desenvolvimento pré e pós-natal.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar os estágios embrionários;
2. Descrever os elementos esqueléticos de *Melanosuchus niger* adulto.
3. Determinar a ordem de aparecimento das cartilagens formadoras do primeiro esboço do esqueleto do embrião;
4. Determinar a ordem de aparecimento dos centros de ossificação dos elementos esqueléticos;
5. Comparar a ordem de aparecimento da cartilagem com os centros de ossificação nos elementos esqueléticos;
7. Relatar possíveis variações intraespecíficas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e coleta de embriões

Na Reserva Extrativista do Lago Cuniã, no estado de Rondônia, Brasil, seis ninhos foram marcados e protegidos com tela de metal após a postura (apêndice 1), entre os meses de outubro a dezembro de 2008, sob licença n°. 12243-1/2007 RAN/IBAMA. Dos ninhos, mantidos sob condições naturais de incubação (apêndice 2), dois ovos foram retirados em intervalos regulares de 24 horas, a partir do décimo dia de desenvolvimento. Esse procedimento foi repetido até a eclosão, o que permitiu obter uma seqüência ontogenética com 186 amostras.

Os embriões foram removidos cirurgicamente de seus ovos, eutanasiados com anestésico Tiopental 50mg/Kg e preservados em formalaldeído 3,7%.

3.2 Coleta de filhotes

Para análise pós-eclosão, 30 filhotes foram recolhidos e mantidos em tanque com água contendo aquecedores elétricos com temperatura média de 27 °C e alimentados a *ad libidum*. Um espécime foi recolhido a cada três dias do tanque e submetidos a eutanásia por injeção de Tiopental 50mg/Kg e fixados em formaldeído 3,7% (Procedimento indicado pela American Veterinary Medical Association-AVMA). Ao fim de toda a coleta, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Anatomia Comparativa dos Vertebrados (LACV), na Universidade de Brasília - UnB, para processamento e análise.

Os métodos de anestesia e eutanásia foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnBDOC n° 100271/2009).

3.3 Descrição de estágios embrionários

Os estágios embrionários foram determinados de acordo com o aparecimento de diferentes características morfológicas externas. As principais estruturas ou caracteres utilizados como parâmetros foram: arcos faríngeos, somitos, fissura coróide, desenvolvimentos dos membros, aparecimento de garras nas mãos e pés, estruturas nasais, desenvolvimento da papila urogenital, cloaca, membrana nictante, pálpebra, coloração do tegumento, nível de absorção do vitelo, aparecimento dos dentes e dente

do ovo. Para observações detalhadas das tais estruturas, utilizou-se um microscópio estereoscópico (Leica S6D) e para registros das informações uma câmera fotográfica digital (Sony DSC H20 10.1). As imagens que mais bem representaram as características dos estágios foram amostradas nesse manuscrito.

3.4 Microscopia eletrônica de varredura

Os primeiros embriões foram também analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para revelar alguns dos principais elementos presentes durante o início do desenvolvimento. Estas amostras foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 2% diluída em tampão cacodilato de sódio 0,1M, imediatamente após a sua remoção. Após a fixação, o material foi preservado em uma solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M, aguardando o processo de pós-fixação, quando o material foi, então, submerso em uma solução de tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, o material passou por um processo de desidratação gradativa com banhos de soluções aquosas de acetona de 30, 50, 70 e 90% e três banhos de acetona pura, de 15 minutos cada, antes de sofrer a secagem ao ponto crítico com CO₂ e metalização de sua superfície em um *sputter coater*. O material foi fotografado no microscópio JEOL JEM 840A.

3.5 Diafanização e coloração de ossos e cartilagens

As amostras foram submetidas às técnicas de diafanização por hidróxido de potássio (KOH) e coloração dos ossos pela alizarina e da cartilagem pelo azul de alcian, segundo os métodos de Davis e Gore (1936) e Dingerkus e Uhler (1977) modificado. Consiste em fixação das amostras em formaldeído 3,7% neutro por no mínimo 48 horas; lavagem com água destilada por 72 horas com posterior evisceração e ablação da pele, quando necessário. Para coloração das cartilagens, os espécimes foram imersos em uma solução composta por 10mg de azul de alcian, 80ml de álcool etílico 95% e 20ml de ácido acético glacial, durante 24 horas. Após reidratação com série alcoólica decrescente, neutralização com solução saturada de borato de sódio e clareamento da musculatura com solução de KOH 0,5% para os espécimes de até 40 dias e KOH 2% para os espécimes acima de 40 dias; os ossos foram corados com Alizarina 0,1% em solução aquosa de KOH 0,5%. Posteriormente os espécimes foram transferidos para

soluções de glicerina: KOH 0,5% em série crescente de 30%, 50%, 90% e, finalmente em glicerina pura, onde foram mantidos.

Os espécimes foram analisados com auxílio de um estereomicroscópio (Leica, DM 1000), equipado com um sistema de captura de imagens (Leica, Câmera Software DFU Twain 6.7.0). Neste trabalho utilizamos o termo "centro de ossificação" para as menores áreas observadas de ossificação de cada osso, evidenciadas por meio da técnica de tingimento com alizarina, que revela acúmulo de cálcio e não necessariamente o primeiro evento do desenvolvimento do osso.

3.6 Processamento histológico

Foi ainda realizado processamento histológico de segmentos do crânio, esqueleto axial pós-cranial e membros no laboratório de histopatologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), segundo protocolo descrito por Behmer et al. (1976). De cada fragmento foram preparadas várias lâminas com cortes semi-seriados. Posteriormente foram submetidas à técnica de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (Behmer et al., 1976). As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio binocular Olympus BX40 acoplado a câmera Olympus OLY-200. As imagens foram obtidas utilizando-se objetivas de 5 e 10x.

3.7 Microtomografia

Os embriões nos estágios 16, 17, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 foram escaneados em um microtomógrafo SkyScan modelo 1076, do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Foram utilizados os seguintes parâmetros: tensão 55 KV, corrente 181 μ A, resolução 35 μ m e filtro de alumínio 0.5mm para as amostras até o estágio 22 e tensão 85 KV, corrente 118 μ A, resolução 35 μ m e filtro de alumínio 1.0mm, nos demais embriões. As imagens obtidas foram reconstruídas pelos softwares NRecon e a reconstrução volumétrica por CTvox e cortes seriados avaliados no Data Viewer o que permitiu a análise de cortes em três eixos bem como a obtenção de imagens tridimensionais.

3.8 Descrição do esqueleto

O esqueleto foi descrito baseado em três espécimes adultos com comprimento médio de 2,40 metros todos bem conservados, provenientes do acervo do Laboratório de Pesquisa e Ensino em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia-UFU.

3.9 Terminologia adotada

Para a identificação e descrição das estruturas esqueléticas foram utilizadas as terminologias propostas por Mook (1921), Iordansky (1973) e Romer (1956), para identificação das condensações cartilagíneas e padrão de ossificação Burke e Alberch (1985), Shubin e Alberch (1986), Müller e Alberch (1990) e Bellairs e Kamal (1981) e para descrição dos estágios embrionários Magnusson e Taylor (1980) e Iungman et al., (2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS EMBRIONÁRIOS

4.1.1 RESULTADOS

Por não dispor de embriões em estágios anteriores ao décimo dia de oviposição, nossa descrição iniciou-se a partir do estágio 4. Esse estágio foi definido com base no estudo de *Caiman latirostris* descrito por Lungman et al., (2008).

Estágio 4 (embrião com 10 dias e CT 22,25 mm): 26 pares de somitos são visíveis no dorso do embrião. O arco primeiro arco é o maior dos três arcos faríngeos presentes. Duas fissuras estão abertas lateralmente, as fendas faríngeas. Cinco vesículas encefálicas são visíveis no embrião. Os placódios ópticos se apresentam de forma conspícua; enquanto os placódios auditivos se situam dorsalmente aos arcos faríngeos e os placódios nasais ocupam a porção rostral. O primórdio do coração aparece como uma proeminência na face ventral. A notocorda estende-se até a extremidade da cauda. Em relação à curvatura do corpo, esta começa com a flexão do tronco na altura do coração e a flexão da cauda já se apresenta com um formato de J (Fig. 1).

Estágio 5 (embrião com 11 a 12 dias e CT 35,60 mm): Há 28 pares de somitos. O processo maxilar estende-se para diante, sob a região do olho. Os brotos dos membros torácicos e pelvins tornam-se reconhecíveis nas paredes laterais, com seu eixo orientado em sentido caudoventral. A flexão do tronco é maior, dando ao embrião um formato de U, com extremidade da cauda mais enrolada (Figs. 2A)

Estágio 6 (embrião com 13 a 14 dias e CT 44,30 mm): O processo mandibular é mais visível. Os brotos dos membros torácicos e pelvins exibem considerável diferenciação e mostram sinais do primórdio da placa digital. A flexão do embrião aumenta gradativamente e a saliência fronto-nasal faz contato com a cauda. O olho apresenta fraca pigmentação e a proeminência cardíaca é agora mais evidente (Fig. 2B).

Estágio 7 (embrião com 15 a 16 dias e CT 45,55 mm): As modificações na forma da placa digital foram poucas se comparadas com as ocorridas no estágio anterior, porém o crescimento dos brotos dos membros foi mais acentuado nesse estágio. A pigmentação dos olhos agora é forte e a invaginação das vesículas ópticas cria o cálice óptico e a fissura coróide (Figs. 4B, 6A).

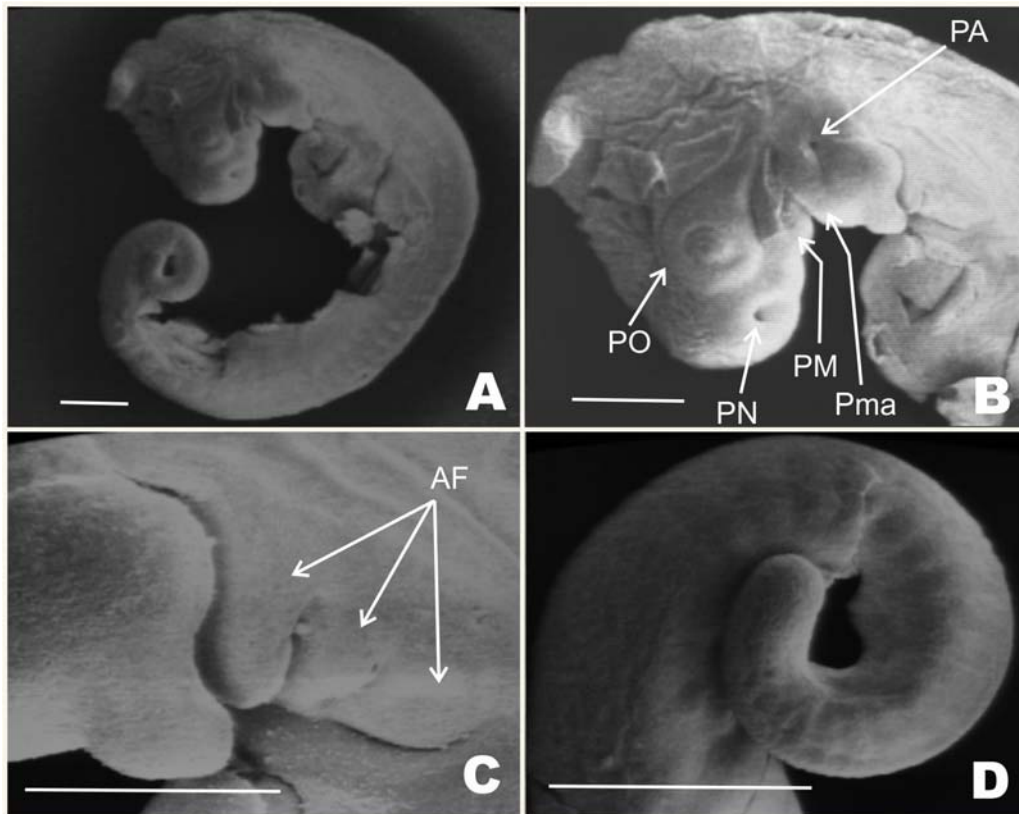


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de *M. niger* no estágio 4. Vista lateral. (A) visualização panorâmica, (B) detalhes do primórdio do olho e fosseta nasal (C), arcos faríngeos e (D) extremidade da cauda. Abreviaturas: AF, arcos faríngeos; PN, placódio nasal; PM, processo maxilar; Pma, processo mandibular; PA, placódio auditivo; PO, placódio óptico. Escala: 1mm.

Estágio 8 (embrião com 17 a 18 dias e CT 46,30 mm): Apesar da placa digital dos membros torácicos e pélvicos apresentarem mais largas, permanecem sem formação dos sulcos digitais. As regiões dos cotovelos são reconhecidas nos brotos dos membros torácicos, enquanto nos membros pélvicos, os joelhos são ainda quase imperceptíveis (Figs. 2C, 5B). A margem rostral do processo mandibular situa-se no nível da margem rostral do cristalino. Uma pequena protuberância indica o início do desenvolvimento da papila urogenital, localizada na superfície ventral, na porção proximal da cauda, entre os membros pélvicos. O primórdio do meato acústico externo é claramente visível na região rostrolateral do embrião.

Estágio 9 (embrião com 19 a 20 dias e CT 47,20 mm): Nas placas digitais dos membros pélvicos e torácicos desenvolvem-se elevações e formam os sulcos digitais. O

globo ocular está proeminente e as pálpebras superiores começam a se formar. O processo mandibular estende rostralmente, abrangendo dois terços do maxilar.

Estágio 10 (embrião com 21 a 22 dias e CT 48,70 mm): As pálpebras superiores estão mais desenvolvidas e a fissura coróide se estreita e fecha. A região bucal está bem desenvolvida e se estende em direção à proeminência cardíaca. Nos membros pelvicos os sulcos digitais mostram-se pronunciados (Figs. 2D, 5C).

Estágio 11 (embrião com 23 a 25 dias e CT 52,60 mm): Na periferia da placa digital dos membros torácicos e pelvicos são distintos sulcos mais pronunciados que formam os raios digitais, indicando os futuros dedos (Figs. 4C, 5D). As pálpebras superiores atingem a margem superior da íris. A parede abdominal tem se desenvolvido, mas o coração, fígado e intestino ainda são visíveis através da musculatura sem pigmentação.

Estágio 12 (embrião com 26 dias e CT 85,50 mm): Nesse estágio, ocorre aumento no comprimento e os esboços dos dedos das mãos e dos pés são visíveis, com presença de membranas interdigitais (Figs. 4D, 5E). A pálpebra inferior, membrana nictante e timpânica estão presentes. O encéfalo ainda é visível através dos tecidos transparentes no topo da cabeça e ainda apresenta um sulco mediano. A musculatura da parede ventral do corpo continua aberta na linha mediana. A cauda é nitidamente dobrada na extremidade distal. Cotovelos e joelhos são reconhecíveis nos membros e são ligeiramente flexionados ao nível da articulação. Pigmentação sutil aparece primeiramente na cabeça, especificamente entre os olhos e focinho (Figs. 2E).

Estágio 13 (embriões com 27 a 29 dias e CT 87,80 mm): No encéfalo, o sulco mediano apresenta-se mais acentuado. Dedos das mãos e pés são nitidamente demarcados e individualizados. As pálpebras são bem formadas e cobrem a maior parte do olho (Fig. 6B). Na pigmentação do corpo, houve poucas mudanças em relação ao estágio anterior. (Fig. 2F).

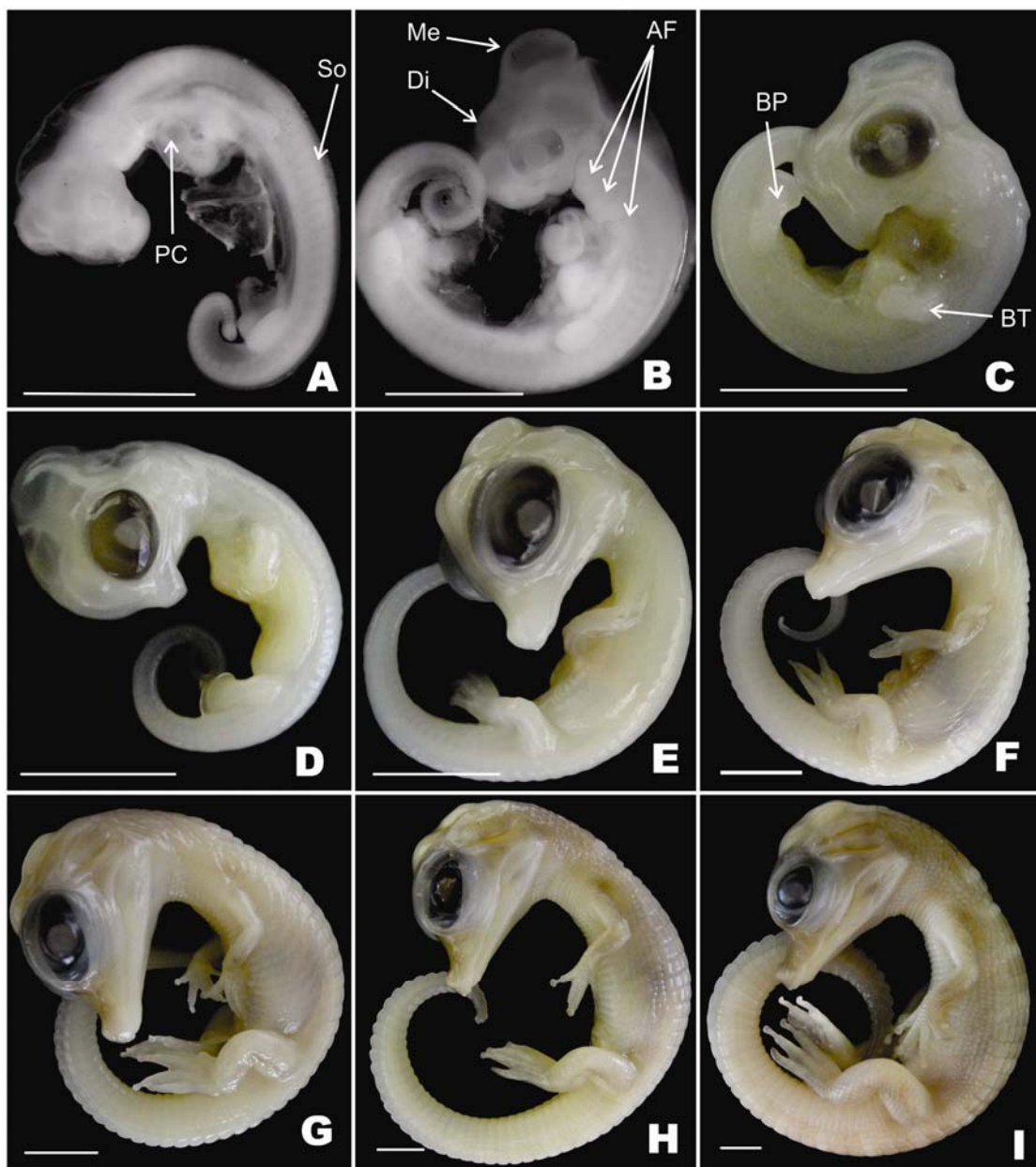


Figura 2. Estágios de desenvolvimento embrionário de *M. niger* em vista lateral. (A) estágio 5, (B) estágio 6, (C) estágio 8, (D) estágio 10, (E), estágio 12, (F) estágio 13, (G) estágio 14, (H) estágio 16 e (I) estágio 18. Abreviaturas: AF, arcos faríngeos; Di, diencéfalo; Me, mesencéfalo; BP, broto membro pelvino; BT, broto membro torácico; PC, proeminência cardíaca; So, somitos. Escala: 10 mm.

Estágio 14 (embriões com 30 a 31 dias e CT 100,60 mm): Os dedos estão bem diferenciados e apresentam a membrana interdigital como no adulto em ambos os membros (Figs 2G, 4E). Áreas de pigmentação estão agora concentradas na cauda, membros e superfície dorsal do pescoço, porém com tonalidade bem fraca. A cloaca

começa a se destacar com presença de dois pequenos lobos. Ainda nesse estágio, as garras começam a se desenvolver no 1º, 2º e 3º dedos dos pés e no 1º e 2º dedos das mãos (Figs. 2G, 4E).

Estágio 15 (embrião com 32 dias e CT 107,90 mm): O orifício cloacal agora envolve a papila urogenital (Fig. 6E). As garras são claramente visíveis em ambos os dedos das mãos e pés e a extremidade da garra do 2º dedo apresenta-se ligeiramente curvadas. A pigmentação na superfície dorsal, apresenta um pouco mais intensa em relação ao estágio anterior, isso confere ao embrião uma aparência levemente acastanhada. Outra característica marcante foi o aparecimento das primeiras fileiras de escudos nucais.

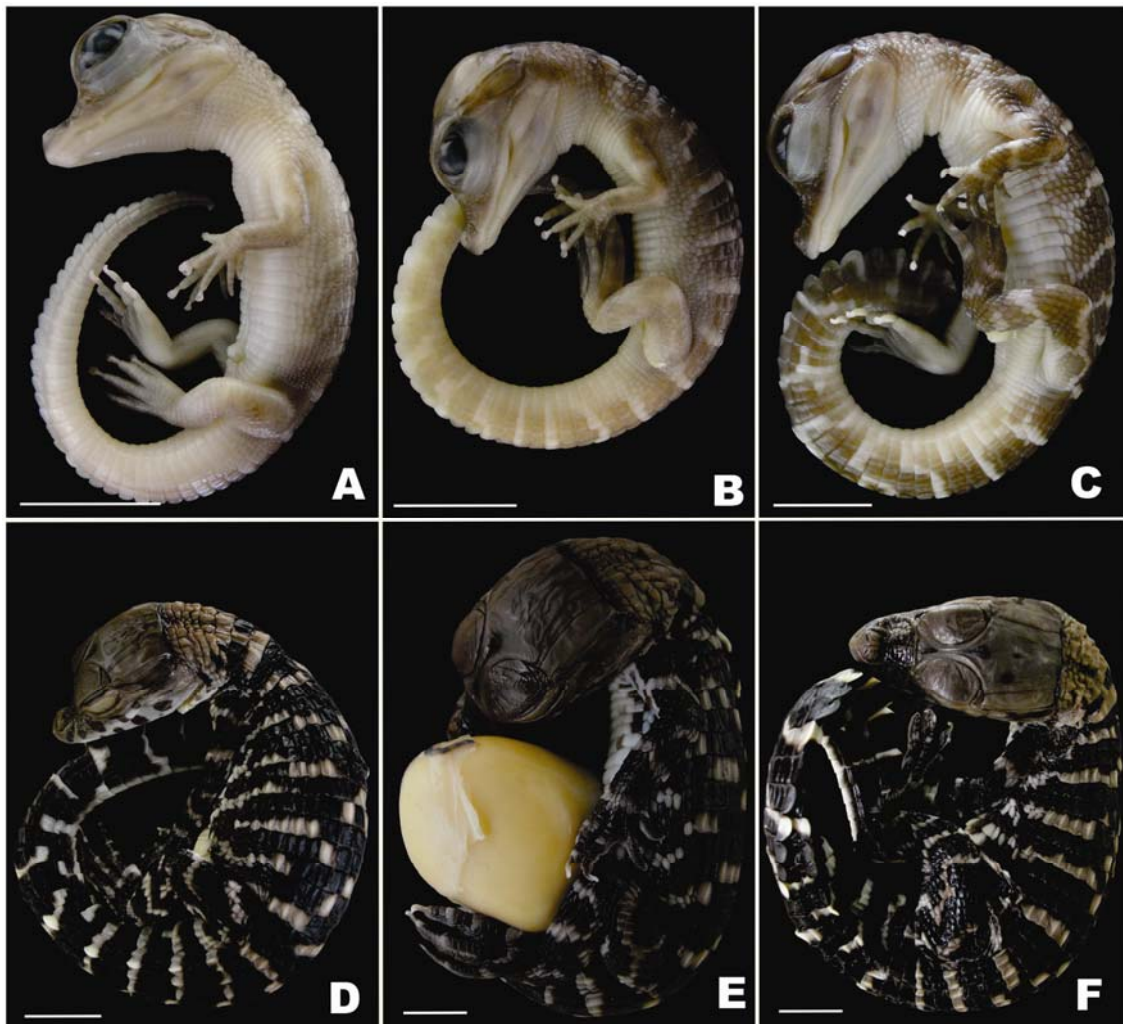


Figura 3. Estágios de desenvolvimento embrionário de *M. niger* em vista lateral. (A) estágio 21, (B) estágio 22, (C) estágio 23, (D) estágio 24, (E) estágio 27 e (F) estágio 28. Escala: 20 mm.

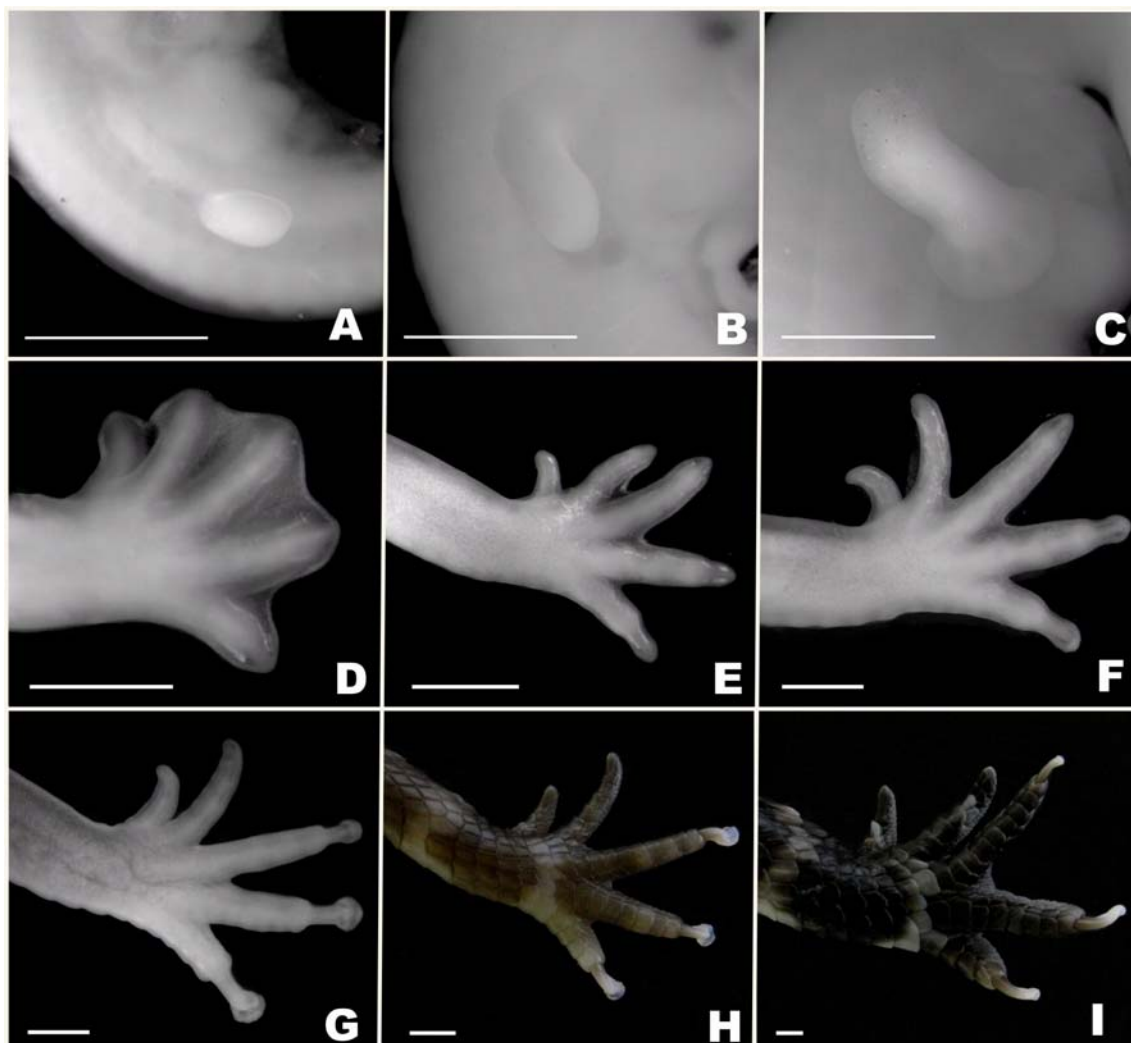


Figura 4: Desenvolvimento do membro torácico de *M. niger*. (A-C) vista lateral do membro torácico nos estágios 6, 7 e 11, respectivamente, (D-I) vista dorsal da mão direita. (D) estágio 12, (E) estágio 14, (F) estágio 16, (G) estágio 18, (H) estágio 24 e (I) estágio 27. Destaque para o desenvolvimento progressivo da placa digital e serração digital do membro e aparecimento de garras. Escala: 4 mm.

Estágio 16 (embriões com 33 a 38 dias e CT 110,04 mm): As pálpebras superior e inferior estão separadas apenas por uma estreita fenda. Há cinco fileiras de escudos nucais, ligeiramente pigmentadas. Uma série de saliências nos dedos marca o início das articulações interfalângicas. Pigmentação se estende em direção aos membros torácicos e pelvins. A garra do 3º dedo apresenta-se achatada lateralmente e curvado ventralmente, enquanto as outras são ainda planas (Figs. 2H, 4F, 5F).

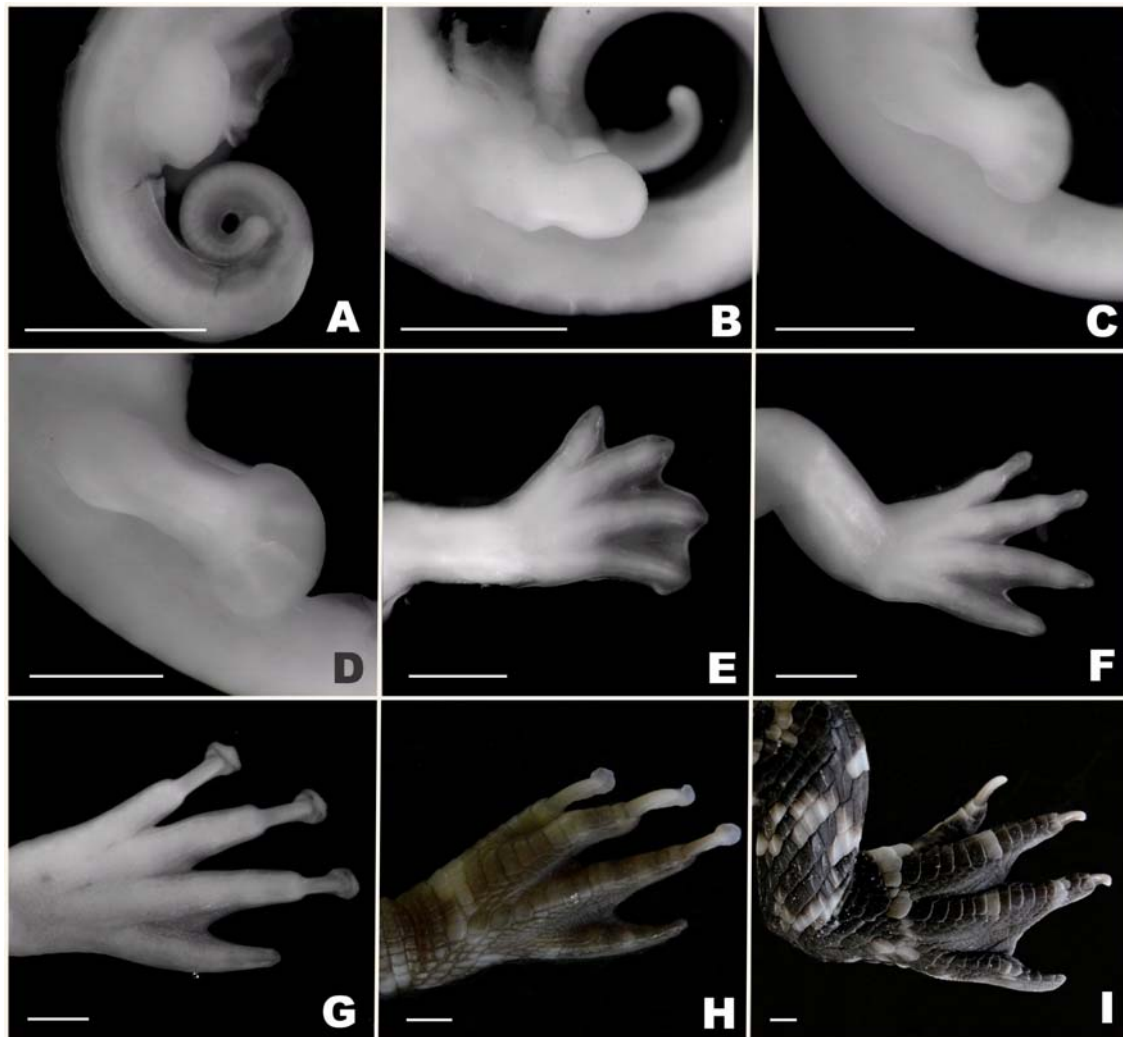


Figura 5: Desenvolvimento do membro pelvino de *M. niger*. (A-D) vista lateral do membro pelvino direito nos estágios 6, 8, 10 e 11, respectivamente. (E-I) vista dorsal do pé direito. (E) estágio 12, (F) estágio 16, (G) estágio 18, (H) estágio 24 e (I) estágio 27. Destaque para o desenvolvimento progressivo da placa digital e serração digital do membro e aparecimento de garras. Escala: 4 mm.

Estágio 17 (embrião com 39 dias e CT 133,05 mm): A musculatura da parede abdominal está completamente fechada ao longo da linha mediana ventral, exceto na região umbilical. O intestino antes exposto, foi agora englobado completamente. Os contornos dos dedos estão totalmente individualizados e as diferenças de tamanho entre eles são bem visíveis.

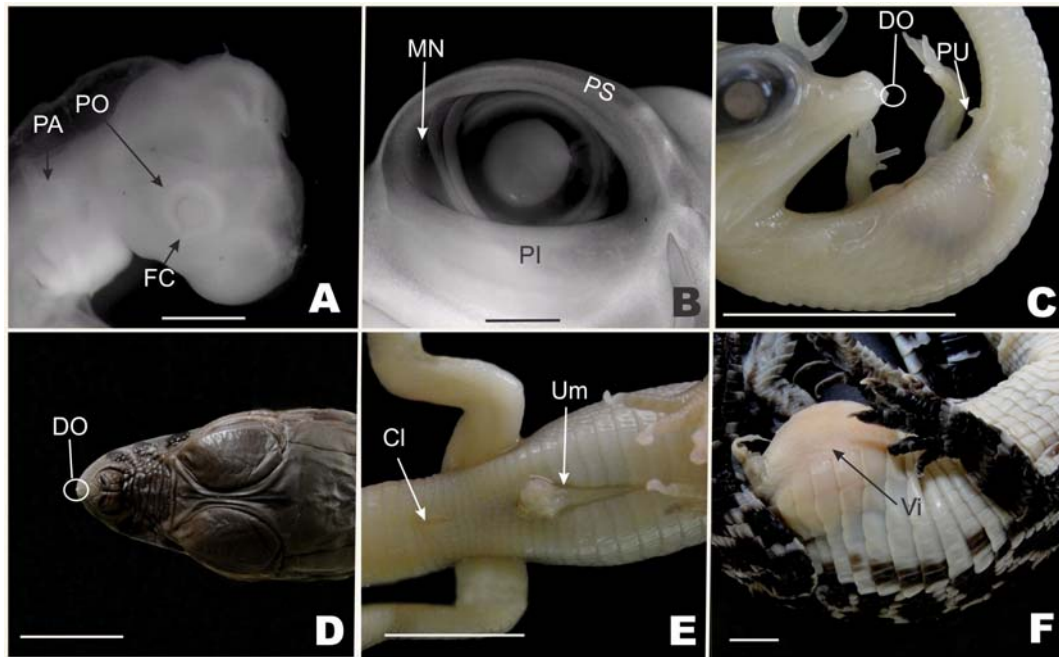


Figura 6: Estágios de desenvolvimento embrionário de *M. niger*. (A-C) vista lateral. (A) estágio 5, (B) estágio 15, (C) estágio 18, (D) estágio 24, vista dorsal; (E) estágio 15, vista ventral e (F) estágio 27. Abreviaturas: Cl, cloaca; DO, dente do ovo; FC, fissura coróide; MN, membrana nictante; PA, placódio auditivo; PI, pálpebra inferior; PO, placódio óptico; PS, pálpebra superior; PU, primórdio da papila urogenital; Um, cicatriz umbilical; Vi, vitelo. Escala: A e B 5 mm; C-F 10 mm.

Estágio 18 (embriões com 40 a 45 dias e CT 143,20 mm): Sete fileiras de escudos nucais estão presentes no dorso do embrião. A exposição da papila urogenital entre os membros pelvins agora é menor (Fig. 6C). Uma característica marcante desse estágio foi o aparecimento de um pequeno dente do ovo na ponta da maxila (Figs. 6D). As garras dos dedos mostram-se arqueadas. Há crescente aumento na pigmentação em todo o corpo do embrião, passando do pálido ao cinza escuro (Figs. 2I, 4G, 5G).

Estágio 19 (embriões com 46 de 47 dias e CT 162,20 mm): Nesse estágio, o padrão da pigmentação de todo o corpo apresenta-se como no recém-nascido, com as típicas faixas dorsais pretas intercaladas com as faixas marrom claro e a cabeça de cor marrom, embora esteja com tonalidade bem mais clara em relação ao filhote recém-eclodido.

Estágio 20 (embriões com 48 a 50 dias e CT 165,30 mm): A abertura umbilical foi reduzida de tamanho. Na superfície da cabeça a pigmentação apresenta-se com cor marrom mais escuro. A cabeça mostra-se bastante rígida, o que indica processo de ossificação, exceto por uma pequena janela oval, a fontanela no centro da plataforma dorsal do crânio através do qual o cérebro ainda é visível.

Estágio 21 (embriões com 51 a 52 dias e CT 175,60 mm): O orifício da cloaca está completamente fechado e a papila urogenital não é mais visível. A pigmentação do corpo inteiro apresenta-se mais intenso. As glândulas de almíscar são pouco visíveis ao longo das margens caudolateral do assoalho intergular da maxila (Fig. 3A).

Estágio 22 (embriões com 53 a 55 dias e CT 188,20 mm): Os escudos da cauda formam duas fileiras mais pontiagudas e se destacam das demais, apresentam também uma pigmentação mais intensa. A pupila apresenta uma fenda vertical. A membrana timpânica cobre toda do meato acústico externo (Fig. 3B).

Estágio 23 (embrião com 56 dias e CT 193,55 mm): Na cauda, os escudos mais craniais estão eriçados, como nos recém-eclodidos. Na mandíbula e maxila, começam a surgir algumas saliências assinalando o início do desenvolvimento dos dentes. Quanto a pigmentação, não houve nenhuma mudança considerável em relação ao estágio 22 (Fig. 3C).

Estágio 24 (embriões com 57 a 66 dias e CT 222,06 mm): As pálpebras permanecem abertas, mas encobre grande parte do olho. Tanto os olhos como todo o corpo do embrião apresentam-se com pigmentação mais intensa. Houve também um crescimento bem acentuado em relação ao estágio anterior (Fig. 3D, 4H, 5H, 6D).

Estágio 25 (embriões com 67 a 71 dias e CT 278,20 mm): As pálpebras estão totalmente formadas e cobrem completamente toda a superfície do olho. A fontanela cranial ainda se mantém, no entanto não é mais possível visualizar o tecido encefálico. Agora tanto a pigmentação quanto o padrão de faixas apresentam-se de forma típica do espécime recém-eclodido. Outra característica marcante nesse estágio foi o início da redução do vitelo, que começa a ser englobado pelo embrião.

Estágio 26 (embriões com 72 a 75 dias e CT 284,10 mm): Cerca de 50% do saco vitelino foi englobado pelo embrião. Os primeiros dentes aparecem na mandíbula e maxila. Outras características permanecem inalteradas.

Estágio 27 (embriões com 76 a 77 dias e CT 293,40 mm): A pigmentação é intensa. O saco vitelínico é completamente englobado, deixando apenas uma cicatriz umbilical. Esse evento assinala que o nascimento está bem próximo (Figs. 4I, 5I, 6F).

Estágio 28 (embriões com 78 a 91 dias e CT 330,90 mm): Nesse último estágio, os embriões estão prontos para o nascimento. Eles apresentam uma cicatriz umbilical longa e estreita. A fontanela craniana é fechada e o teto do crânio é bem desenvolvido com pigmentação intensa de todo o corpo (Fig. 3F).

4.1.2 DISCUSSÃO

No presente trabalho, descrevemos 28 estágios embrionários para *M. niger*. O mesmo número de estágios foram descritos para *A. mississippiensis* (Ferguson, 1987), *Alligator sinensis* (Hua et al., 2004) e *C. latirostris* (Iungman et al., 2008); enquanto Magnusson e Taylor (1980) determinaram uma série com 15 estágios para *Crocodylus porosus*. Apesar desta diferença, acreditamos que possa existir um padrão que delimita uma seqüência de aparecimento das principais estruturas morfológicas avaliadas aqui, uma vez que pouca variação entre os táxons foi encontrada, exceto no que diz respeito à cronologia. Em *M. niger*, as descrições iniciaram-se no estágio 4 devido a dois fatores. Primeiro, não disponibilidade de material durante os estágios iniciais de clivagem a neurulação. Segundo, o embrião mais jovem apresentou características semelhantes àquelas descritas no estágio 4 por Iungman et al. (2008).

Nos vertebrados *Paroedura pictus* (Noro et al., 2009), *Anolis sagrei* (Sanger et al., 2008), *Pelodiscus sinensis* (Tokita e Kuratani, 2001), *Apalone spinifera* (Greenbaum e Carr, 2002), *Gallus gallus domesticus* (Hamburger e Hamilton, 1951), *A. mississippiensis* (Ferguson, 1987), *C. latirostris* (Iungman et al., 2008) e *C. porosus* (Magnusson e Taylor, 1980), os **primeiros estágios** foram determinados com o aparecimento de vesículas cerebrais primárias, placódios, arcos faríngeos, número de somitos, flexão e rotação do corpo. Os **estágios intermediários**, pelo aparecimento e morfologia dos membros, características craniofaciais e surgimento do dente de ovo, enquanto que os **estágios mais tardios** foram detectados por meio da diferenciação de pigmentação, padrões de escudos e englobamento do vitelo. Assim, utilizamos esses critérios na caracterização e descrição de *M. niger*. Greenbaum e Carr (2003) enfatizaram que essas características tornaram-se parâmetros para estudos comparativos entre embriões de répteis.

Segundo Graham (2001), os arcos faríngeos contribuem grandemente com a aparência externa do embrião nos primeiros estágios. Inicialmente eles consistem em segmentos de tecido mesenquimais separados pelas fendas branquiais. Esses arcos começaram a surgir antes do estágio 7 na série embriológica de *A. mississippiensis* (Ferguson, 1987), assim como para *M. niger*, especificamente no estágio 4, enquanto que para Iungman et al. (2008), essas estruturas são visíveis exatamente no estágio 7 em *C. latirostris*, Magnusson e Taylor (1980) descreveram o aparecimento de dois arcos faríngeos logo no estágio 1 de *C. porosus*.

Quanto ao surgimento dos placódios ópticos em *M. niger* sua observação no estágio 4 é semelhante ao observado por Ferguson (1987) para *A. mississippiensis* e Iungmam et al. (2008) para *C. latirostris*. Em *C. porosus* (Magnusson e Taylor, 1980), esta estrutura foi descrita mais cedo, no estágio 2. A formação do placódio auditivo é relatada por Ferguson (1987) para *A. mississippiensis*, Iungmam et al. (2008) para *C. latirostris* e Magnusson e Taylor (1980) para *C. porosus* no estágio 2. Em *M. niger*, foi observado no estágio 4. Porém, a falta de amostragem de estágios anteriores não nos permitiu uma melhor avaliação quanto ao surgimento dessa estrutura. Já em *Gallus gallus domesticus* (Hamburger e Hamilton, 1951) o placódio auditivo está presente no estágio 14. Uma característica comum aos Crocodylia *A. mississippiensis*, *C. latirostris*, *C. porosus* e *M. niger* foi o aparecimento da fissura coróide no estágio 7 e da papila urogenital no estágio 8, que representam estruturas marcantes nestes estágios para estas espécies, exceto em *C. porosus*, onde a fissura coróide, não foi descrita por Magnusson e Taylor (1980).

O aparecimento dos somitos foi evidenciado principalmente por uma proeminência dorsal no estágio 4 de *M. niger*. Magnusson e Taylor (1980) ressaltaram seu surgimento em *C. porosus* logo no início do desenvolvimento, no estágio 1, diferentemente das espécies *C. latirostris* (Iungmam et al., 2008) e *A. mississippiensis* (Ferguson, 1987), ambos no estágio 2. É importante observar que embora os somitos apareçam bem cedo nessas espécies, a quantidade deles varia consideravelmente durante o desenvolvimento, sendo 20 somitos no *A. mississippiensis*, e *C. latirostris*, 25 no *C. porosus* e 26 no *M. niger*. Em nossas observações para *M. niger*, concordando com as descrições de Iungmam et al. (2008) para *C. latirostris*, a partir do estágio 5 a observação individual dos somitos tornam-se cada vez mais difícil, o que para *Gallus gallus domesticus* (Hamburger e Hamilton 1951) ocorreu a partir do estágio 14. Segundo Hamburger e Hamilton (1951), isto é, em parte, devido à dispersão do mesoderma dos somitos mais craniais e em estágios finais pela curvatura da cauda. Portanto, outras estruturas, como a formação dos membros, foram utilizados como critérios de identificação do estágio 5 em diante para os Crocodylia supracitados.

Com relação ao desenvolvimento dos membros, os Testudines exibem a tendência da diferenciação dos membros torácicos antes dos membros pelvins, exceto para tartarugas marinhas, onde ambos se desenvolvem sincronicamente (Miller, 1985). Em *M. niger*, *Gallus gallus domesticus* (Hamburger e Hamilton, 1951), *C. latirostris*

(Iungmam et al., 2008) e *C. porosus* (Magnusson e Taylor, 1980) os brotos dos membros torácicos surgem antes ou simultaneamente com os brotos dos membros pelvins. Tal informação não é coerente com as descrições de Ferguson (1985 e 1987) para *A. mississippiensis*, onde o surgimento dos membros pelvins ocorre primeiro.

Entre os anfíbios, mesmo dentro de um único gênero, existe uma considerável variação na seqüência de aparecimento dos membros. Em *Xenopus*, os brotos dos membros pelvins aparecem primeiro (Nieuwkoop e Faber, 1967), diferente de *Ambystoma* (Harrison 1969; Schreckenberg e Jacobson, 1975) que ainda apresentam diferenças significativas entre várias espécies (Schreckenberg e Jacobson, 1975), assim como em *Rana*, onde os brotos dos membros pelvins aparecem em estágios diferentes (Shumway, 1940). As variações apresentadas na cronologia do desenvolvimento dos membros podem refletir valor funcional. No gambá, por exemplo, os brotos dos membros torácicos se desenvolvem mais rapidamente em relação a outras espécies de mamíferos (McCrary, 1938). Segundo o autor, essa heterocronia revela uma adaptação às características da biologia reprodutiva marsupial, haja vista que os recém-nascidos necessitam subir no marsúpio, com o auxílio desses membros.

Infelizmente, não conseguimos observar se há uma ordem de aparecimento desses membros em *M. niger*, devido seu rápido desenvolvimento, mesmo com amostras coletadas diariamente. Acreditamos que novos estudos podem refletir a falta de uma série ontogenética completa, tornando difícil de observar o desenvolvimento desta característica. Sugerimos também que, para observações clara desses possíveis eventos, serão necessárias análises mais precisas de muitos espécimes nas fases em que esses episódios ocorrem, possivelmente, em intervalos menores de 24 horas ou mesmo um estudo mais elaborado com cultura de embriões.

Nos estágios finais de *C. latirostris* (Iungman et al., 2008) e *M. niger*, a pigmentação é aparente apenas após a formação das garras. Em ambos, a pigmentação começa na cabeça, especificamente entre os olhos e focinho, seguindo pelos membros e superfície dorsal do corpo, no entanto, há pouca ou nenhuma pigmentação ventral. Em *C. porosus* a pigmentação inicia no dorso e cauda (Magnusson e Taylor, 1980). Iungman et al. (2008) apresentaram como uma característica única de *C. latirostris* o padrão de coloração durante seu desenvolvimento, esta informação também é pertinente para *M. niger*. No geral, os filhotes apresentam detalhes diferentes no padrão

e tonalidade de coloração para cada espécie; essa especificidade facilita a distinção de espécies entre o neonatos.

Outra característica interessante é o surgimento do dente do ovo, com função de romper as membranas do ovo no momento da eclosão. Segundo Ferguson (1987), esta estrutura marca o início do estágio 26 em *A. mississippiensis*. Para Iungman et al., (2008) determina o estágio 23 de *C. latirostris*. Já, em nossas observações, essa estrutura foi vista mais cedo, no estágio 18, como uma pequena protuberância esbranquiçada e rígida na maxila. Após o nascimento, constatamos que essa estrutura sofreu uma redução progressiva desaparecendo logo depois da primeira semana de eclosão, assim como na maioria das aves. Em contrapartida, o dente do ovo pode ser também mantido por mais tempo, como observado por Wiebe (2010), esse autor concluiu que em algumas espécies de aves, o tamanho e a persistência do dente do ovo sugerem uma função alternativa ou complementar, como orientação dos pais durante a alimentação em ninhos localizados em lugares com pouca luminosidade. Como faltam dados quantitativos sobre a permanência desse dente do ovo em *Crocodylia*, não foi possível associar qualquer outra função desta estrutura nos répteis.

Wise et al. (2009), ressaltaram que, mesmo sob condições controladas, embriões de mesma idade cronológica, podem não corresponder, necessariamente, ao mesmo estágio de desenvolvimento morfológico. Em *M. niger* observamos tal constatação dentro de um mesmo ninho e entre ninhos. As variações no surgimento das estruturas podem ser explicadas, em parte, pela temperatura de incubação, que pode variar em condições naturais dentro e entre os ninhos; portanto, resultando em períodos de incubação frequentemente variáveis (Lang et al., 1989; Piña, 2007). Além da temperatura, o desenvolvimento pode ser influenciado por outras variáveis, como umidade do ninho (Packard e Packard, 1984), ambiente gasoso (Warburton et al., 1995) e equilíbrio ácido-base (Etchberger et al. 1992), tipo de substrato e luz (Peterka et al., 2010). Isto pode explicar as diferenças relatadas entre *M. niger* e as espécies *A. mississippiensis* (Ferguson, 1987), *C. latirostris* (Iungman et al., 2008), *C. porosus* (Magnusson e Taylor, 1980). Desta maneira, as principais diferenças se concentraram nas variações cronológicas. Mais estudos são necessários para uma análise filogenética comparativa devido ao elevado potencial de variações intra e interespecíficas em espécies de *Crocodylia*.

4.2 ONTOGENIA DO ESQUELETO

4.2.1 ESQUELETO APENDICULAR

4.2.1.1 Resultados

Descrição anatômica do esqueleto adulto

Cintura peitoral

A cintura peitoral une o membro torácico ao corpo do animal. Por meio de dois ossos planos, a escápula e o coracóide, situados na superfície dorsal e ventral do tórax, respectivamente.

Escápula: Trata-se de um osso alongado e com duas extremidades bem demarcadas, uma voltada em direção dorsal e outra ventral. A região dorsal da escápula é larga e delgada e sua porção final mantém-se cartilaginosa. A região ventral é mais robusta e apresenta duas faces articulares, uma mais longa formada pelo processo acromial, para o osso coracóide, e outra ovóide, o processo glenóide da escápula, que junto com o coracóide forma a superfície articular para a cabeça do úmero, a cavidade glenoidal (Figs. 7A, B).

Coracóide: É um pouco menos alongado em relação à escápula, com expansões craniocaudais em ambas extremidades. Sua superfície dorsal articula-se firmemente à escápula, por meio da superfície articular dorsal. Nessa região é bem visível o grande forame do coracóide que carrega nervo e vasos sanguíneos. Na margem dorsocaudal situa-se o processo glenóide da coracóide, que contribui com a formação da cavidade glenoidal (Figs. 7A, B).

Membro torácico

Úmero: O úmero é um osso tipicamente longo, apresentando duas epífises, uma proximal e outra distal, e a diáfise. Este é o maior e mais robusto elemento dos membros torácicos. A diáfise é cilíndrica, com a epífise proximal alongada e mais larga mediolateralmente, formando uma superfície articular convexa. Na face caudal da cabeça do úmero, logo abaixo da superfície articular, há uma grande tuberosidade, a crista deltopeitoral, que se estende obliquamente a partir da face medial. A epífise distal é também alargada no sentido craniocaudal formando uma volumosa massa óssea, dividida pelo sulco intercondilar em côndilo lateral e medial, cada um com uma grande

superfície articular. Ambos os côndilos são arredondados e similares, apresentando poucas rugosidades (Figs. 7C, D).

Ulna: A ulna é o osso lateral do zeugopódio, sendo tipicamente longa e arqueada, e forma com o rádio um espaço interósseo, sendo ligeiramente mais longa que o rádio e muito mais robusta que este. A epífise proximal possui superfície articular triangular e delimitam três bordas, uma cranial levemente convexa, que se articula como côndilo medial do úmero, outra medial e plana, que se articula com a cabeça do rádio e outra caudal, levemente côncava. Contornando a base da epífise proximal, numa região similar a um pequeno colo, existem estrias que denotam regiões possivelmente de inserção da cápsula articular e de origens musculares. A diáfise é trirradiada, com a presença de uma margem caudal bem marcada. Sua porção proximal é mais larga no sentido craniocaudal e bastante curvada craniomedialmente. Sua margem interóssea é romba, sendo lisa em toda sua extensão. A epífise distal possui uma área articular menor em relação a região proximal e se articula com o ulnar, pisiforme e radial do carpo (Figs. 7E, F).

Rádio: É o osso medial do zeugopódio, apresenta-se linear com aspecto cilíndrico na região da diáfise e com ambas as epífises expandidas. Estas se orientam ao longo do mesmo plano longitudinal. A epífise proximal é mais expandida e articula-se com o côndilo medial do úmero. A epífise distal do rádio apresenta-se com contornos irregulares. A face lateral é ligeiramente plana, enquanto a face medial é côncava, formando assim dois tubérculos, um maior e mais distal localizado caudalmente e o outro na posição cranial, onde se apóia a face radial da região distal da ulna (Figs. 7E, F).

Ossos do carpo

No carpo de *M. niger* estão presentes quatro ossos, são eles: ulnar do carpo, fusão do radial+intermédio, fusão dos distais do carpo 3+4+5 e o pisiforme.

Ulnar do carpo: É um osso alongado em relação ao distal do carpo, mas consideravelmente menor e mais delgado que o radial+intermédio. Possui as extremidades expandidas, deixando uma curvatura nas margens medial e lateral, conferindo ao osso aspecto de ampulheta. Possui quatro superfícies articulares. A superfície articular proximal, que se articula com a ulna, é pequena e ligeiramente côncava, a superfície distal articula-se com o osso distal do carpo, mais ampla que a

proximal. A margem medial articula-se com o osso radial do carpo, enquanto que a superfície laterocaudal articula-se com o pisiforme (Fig. 8).

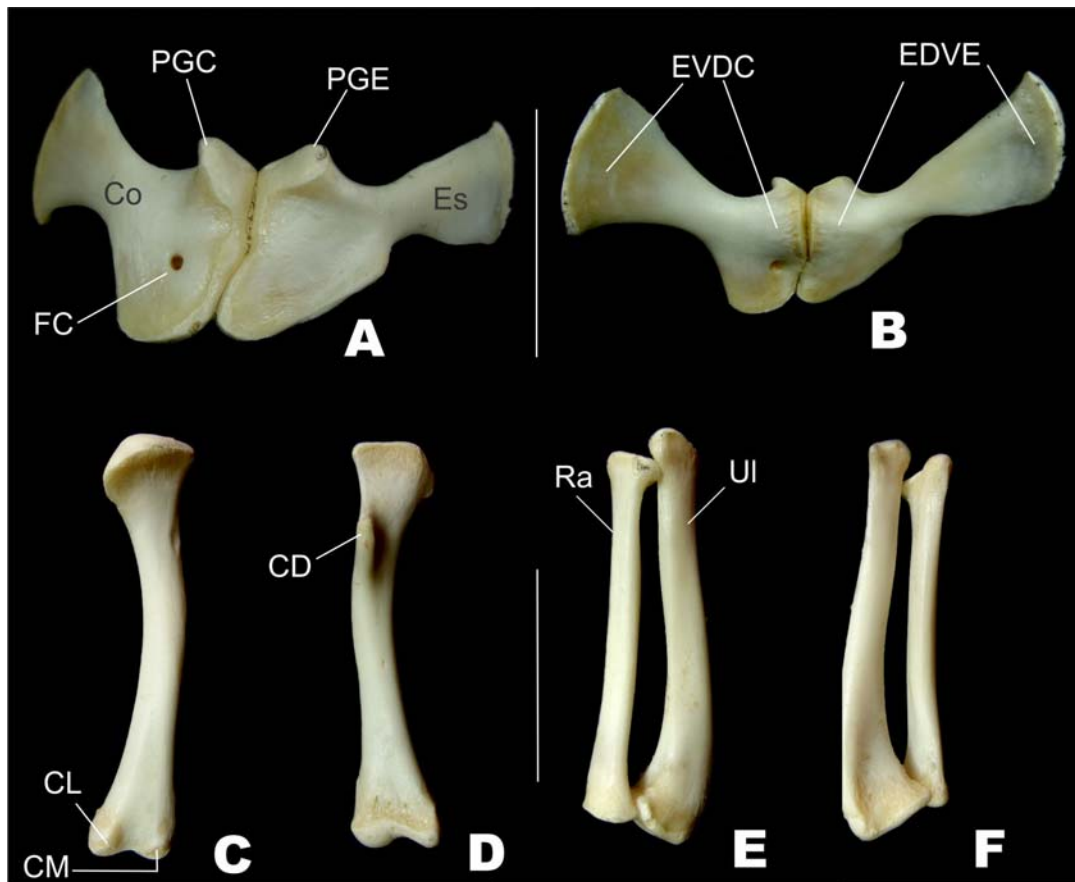


Figura 7: Cintura peitoral e membro torácico direito de *Melanosuchus niger*. Escápula e coracóide em vista lateral (A) e medial (B); úmero direito em vista cranial (C) e caudal (D); rádio e ulna direito em vista cranial (E) e caudal (F). Abreviaturas: CD, crista deltopeitoral; CL, côndilo lateral; CM, côndilo medial; Co, coracóide; Es, escápula; EVDC, expansão ventral e dorsal do coracóide; EDVE, expansão dorsal e ventral da escápula; FC, forame do coracóide; PGC, processo glenóide do coracóide; PGE, processo glenóide da escápula; Ra, rádio; Ul, ulna. Escala: 30 mm.

Radial+intermédio do carpo: É o maior osso do carpo, apresenta-se robusto, com extremidades expandidas, deixando uma curvatura nas margens medial e lateral, conferindo ao osso aspecto de ampulheta, assim como o ulnar do carpo. Possui três superfícies articulares. A superfície articular proximal, que se articula com o rádio, é ampla e côncava, a superfície distal articula-se com os metacarpos I e II, sendo levemente ovalada e por fim, sua face medial se articula com o osso ulnar do carpo por meio de uma crista em forma de lingueta projetada ventralmente (Fig. 8).

Distal do carpo 3+4+5: É um osso curto e robusto localizado na porção distal do carpo, junto a epífise proximal dos metacarpos III e IV, proximalmente contata com o osso ulnar do carpo. Suas superfícies dorsal e ventral são convexas, existindo ventralmente, na porção proximal, uma pequena fossa (Fig. 8).

Pisiforme: É um pequeno osso com poucas superfícies de articulação, localizado ventrolateralmente, articular-se com o ulnar do carpo com sua margem medial e distalmente com a ulna. Na superfície ventral, o pisiforme emite uma projeção que se aproxima medialmente do radial+intermédio do carpo (Fig. 8).

Metacarpos: Possui cinco metacarpos, numerado lateromedialmente como metacarpo 1, 2, 3, 4 e 5. Todos são ossos longos com os metacarpos II e III maiores e V o menor deles. O metacarpo I destaca-se por ser muito mais robusto que os demais e por apresentar a expansão proximal mais desenvolvida lateroventralmente, de modo que abraça a maior parte da superfície articular proximal do metacarpo II. Os três primeiros metacarpos apresentam uma expansão em forma de aleta obliquamente orientada em sua extremidade proximal, e que sobrepõe à aleta do imediato metacarpo lateral, de modo que esses metacarpos articulam entre si justapostamente e de maneira imbricada. Os metacarpos IV e V, por outro lado, não possui essas expansões proximais e suas articulações são ligeiramente mais espaçadas. Nas extremidades distais, os metacarpos I a IV são levemente sulcados como polias que salientam-se mais nas faces palmares, articulando-se com as falanges proximais por meio de um par de facetas côncavas separadas por uma discreta crista (Fig. 8).

Falanges: *M. niger* possui a seguinte fórmula falângica 2:3:4:3:2, com falanges tipicamente longas. Em vias gerais, as extremidades proximais são largas e possuem facetas ovais côncavas adaptadas para articulação. Sua epífise distal é levemente sulcada, como polias que se salientam mais nas faces palmares adaptadas para articulação. As últimas falanges dos dedos I, II e III possuem a face dorsal convexa e a palmar côncava o que lhes confere o aspecto de garra (Fig. 8).

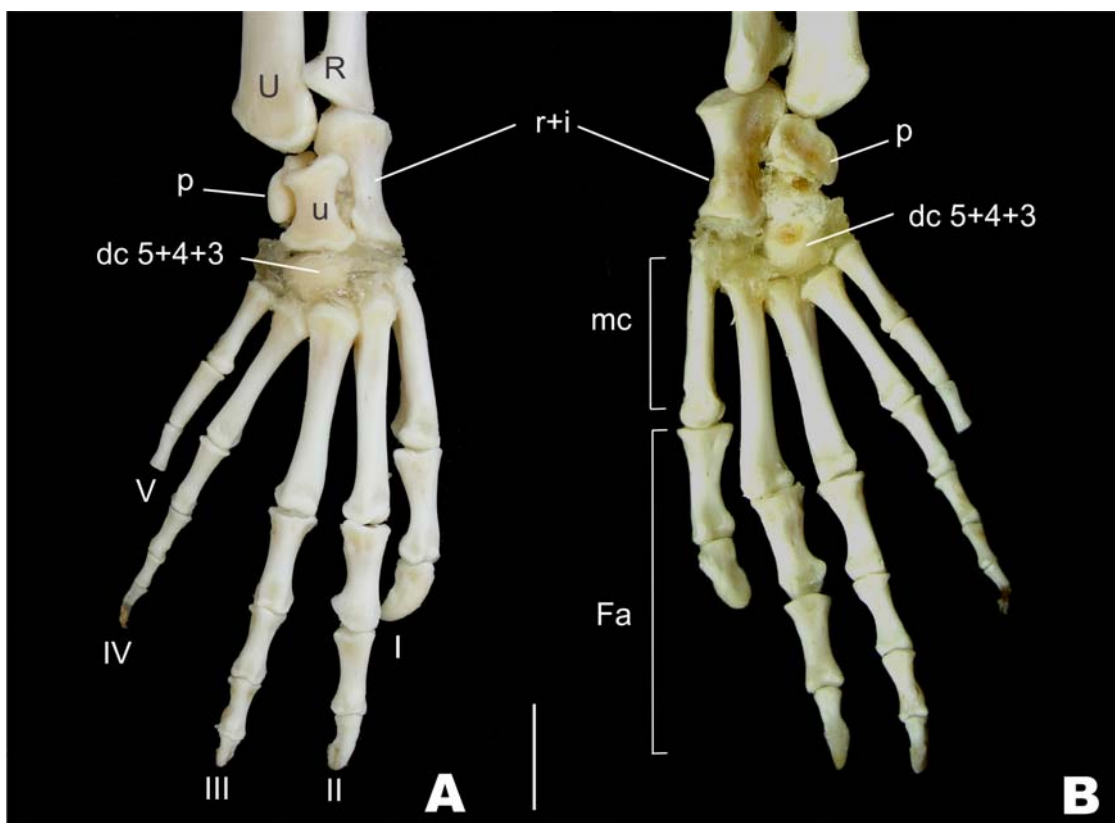


Figura 8: Mão direita de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A) e ventral (B). Abreviaturas: dc5+4+3, distal do carpo 5+4+3; Fa, falanges; I-V, dedos I-V; mc, metacarpos; p, pisiforme; R, rádio; r+i, radial+intermedio; U, ulna; u, ulnar do carpo. Escala 30 mm.

Cintura pélvica

A cintura pélvica une o membro pelvino ao corpo do animal por meio da articulação com as costelas das vértebras sacrais. É composta por três ossos, ílio, ísquio e púbis.

Ílio: Possui formato irregular e destaca-se pela presença de uma enorme asa, projetada dorsocaudalmente, denominada asa do ílio. A superfície ventral na margem cranial é bastante côncava e forma grande parte do acetábulo para acomodação da superfície articular proximal do fêmur. Lateralmente, contornando a margem inferior do acetábulo, destaca-se o processo isquial caudal, que é curto com ampla superfície de articulação, onde contata com o ísquio. O processo isquial cranial não se articula diretamente com o ísquio; estes estão ligados por meio de tecido fibroso (Figs. 9A, C).

Ísquio: Corresponde a um par de ossos posicionados caudoventralmente e que se contatam na linha mediana. Possui uma extremidade plana e delgada ventralmente, e

outra robusta, dorsalmente, articulada com o ílio. A lâmina ventral do ísquio é triangular e inclinada caudalmente. Dorsalmente ele possui dois processos que se articulam com o ílio, caudal e púbis, cranial. Entre estes processos existe uma incisura que forma uma extensa fenestra acetabular (Figs. 9B, C).

Púbis: O púbis de *M. niger* é um osso notadamente alongado, com a extremidade dorsal cilíndrica e a ventral plana e laminar, conferindo ao osso a forma de uma raquete, que se contata ventralmente com seu contralateral. A porção dorsal arredondada do púbis representa a face articular. Possui um tubérculo espesso e convexo, que se articula à concavidade lisa presente no processo dorsal cranial do ísquio. Partindo deste tubérculo na direção cranial existe um longo e sinuoso colo que se alarga em uma lâmina (Figs. 9B, C).

Membro pelvino

Fêmur: Possui uma extremidade proximal irregular com cabeça do fêmur bem evidente, o colo anatômico deste contorna a margem da cabeça do fêmur, exibindo uma forma achatada. Nele estão presentes diversas rugosidades e estrias longitudinais, que possivelmente correspondem a pontos de ancoragem de ligamentos ou para inserção muscular. Sua diáfise apresenta uma torção de modo que os côndilos e a cabeça estão posicionados em planos levemente divergentes, sendo cilíndrica ou levemente ovalada. A epífise distal é alargada e forma uma área articular com dois côndilos, lateral e medial, separados pelo sulco intercondilar (Figs. 9D, E).

Tíbia: É um osso longo, localizado na margem medial da perna, apresenta-se mais robusto que a fibula. Possui extremidades levemente expandidas, sendo mais expressivo na porção distal da tíbia. A superfície articular proximal tem contorno retangular e é dividida discretamente pela presença de um sulco intercondilar. A superfície articular proximal é sobreposta pela extremidade distal do fêmur quando em articulação. A diáfise possui formato cilíndrico na sua porção mais central. A extremidade distal é expandida lateromedialmente e repousa sobre a superfície articular do intermédio (Figs. 9F, G).

Fíbula: É um osso retilíneo localizado na margem lateral da perna, ligeiramente mais curto que a tíbia e possui extremidades pouco expandidas. A superfície articular proximal, que recebe o côndilo lateral do fêmur, tem contorno aproximadamente em forma de cunha e ao redor dessa superfície porta estrias longitudinais tênues. A epífise

distal da fibula é mais larga lateromedialmente e possui um processo medial, com aspecto de gancho que se articula a uma leve concavidade na superfície articular do intermédio. A face articular distal, que se articula com o fibular, tem contorno ovalado e plano. Todo o entorno da extremidade distal da fibula porta estrias longitudinais de adesão ligamentar (Figs. 9F, G).

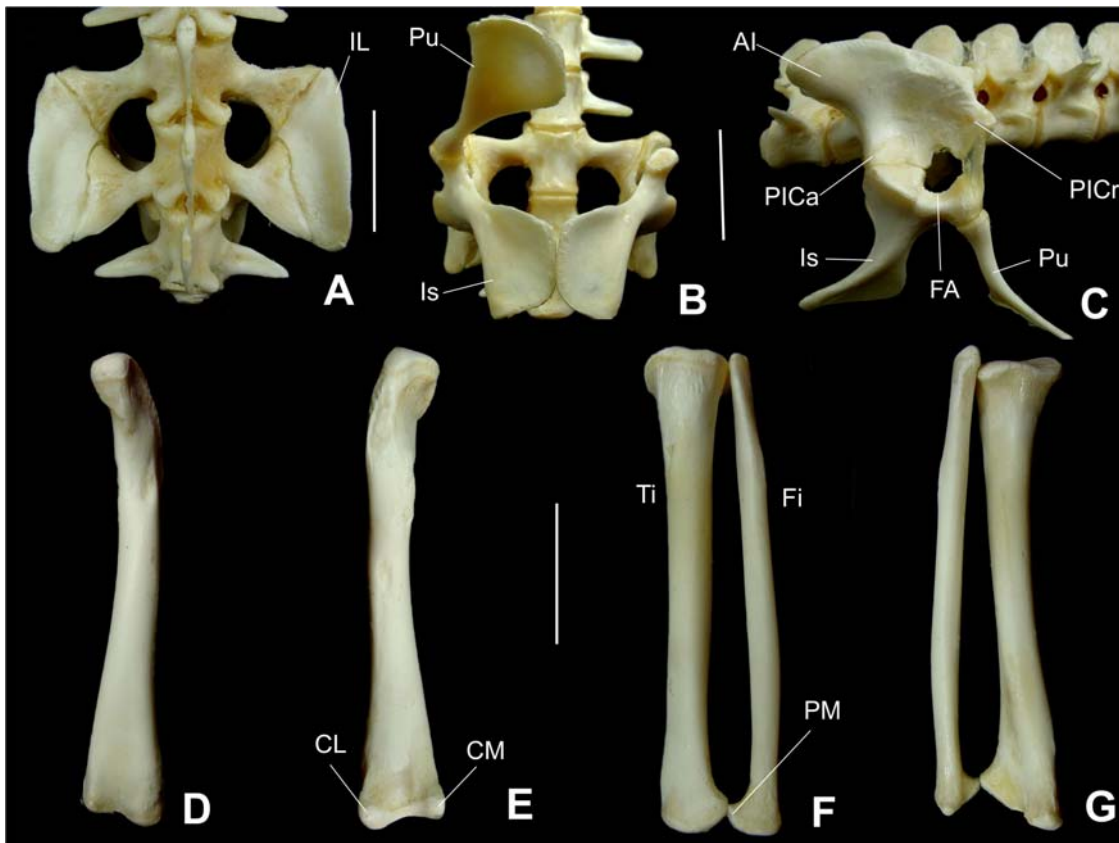


Figura 9: Cintura pélvica e membro pelvino direito de *Melanosuchus niger*. Ílio, ísqio e púbis em vista dorsal (A), ventral (B) e lateral (C); fêmur em vista cranial (D) e caudal (E); tíbia e fibula em vista cranial (F) e caudal (G). Abreviaturas: AI, asa do ílio; CL, côndilo lateral; CM, côndilo medial; FA, fenestra acetabular; Fi, fibula; IL, ílio; Is, ísqio; PICa, processo isquial caudal; PICr, processo isquial cranial; PM, processo isquial medial; Pu, púbis; Ti, tíbia. Escala: 30 mm.

Ossos do tarso

No tarso de *M. niger* estão presentes quatro ossos, são eles: fusão do intermédio+central, fibular do tarso, distal do tarso 3, distal do tarso 4.

Intermédio+central: É um osso com concavidades e projeções, que funcionam como meio de articulação com os ossos adjacentes do tarso. Sua face proximal articula-se com a tíbia e fíbula. A face articular medial contata o fibular do tarso. Enquanto a superfície articular distal contata com o metatarso I e distal do tarso 3 (Fig. 10).

Fibular do tarso: É um osso que se articula com a fíbula, intermédio+central e distal do tarso 4, formando o calcânhar pela projeção do túber do fibular. Este é relativamente curto e projeta-se caudalmente (Fig. 10).

Distal do tarso 3: É levemente arredondado, menor que o distal do tarso 4, sua face proximal articula com o intermédio+central, distalmente com os metatarsos II e III e com o distal do tarso 4 lateralmente (Fig. 10).

Distal do tarso 4: É um osso curto com uma porção proximal que se articula com o processo articular convexo do fibular e intermédio+central, articula também com o distal do tarso 3 e lateralmente com o metatarso V e distalmente com os metatarso III e IV (Fig. 10).

Metatarsos: Os metatarsos I, II, III e IV são ossos longos típicos, sendo os metatarso II e III relativamente maiores que os demais. Estes ossos articulam-se proximalmente entre si de maneira imbricada, com todos sobrepondo-se sequencialmente de modo que o elemento posicionado medialmente sobrepõe-se àquele lateral e a superfície articular distal contata com a falange 1 de seus respectivos dedos. O metatarso V é um osso bastante reduzido e levemente achatado, este difere dos demais metatarsos em todos os aspectos morfológicos. Com a perda do dedo V, durante a evolução dos Crocodylia, este foi o único remanescente ósseo lateralmente disposto ao dedo IV. Ele contata com uma pequena porção do metatarso IV, e medialmente possui uma grande área de articulação com o distal do tarso 4 (Fig. 10).

Falanges: O *M. niger* possui a seguinte fórmula falângica 2:3:4:4. Tais falanges são tipicamente longas. E cada uma delas, exceto as ungueais, possuem uma cabeça, uma diáfise e uma base proximal. A diáfise afila-se em sua porção média, o que evidencia a largura das epífises. As falanges distas dos dedos I, II e III possui aspecto de garra (Fig. 10).

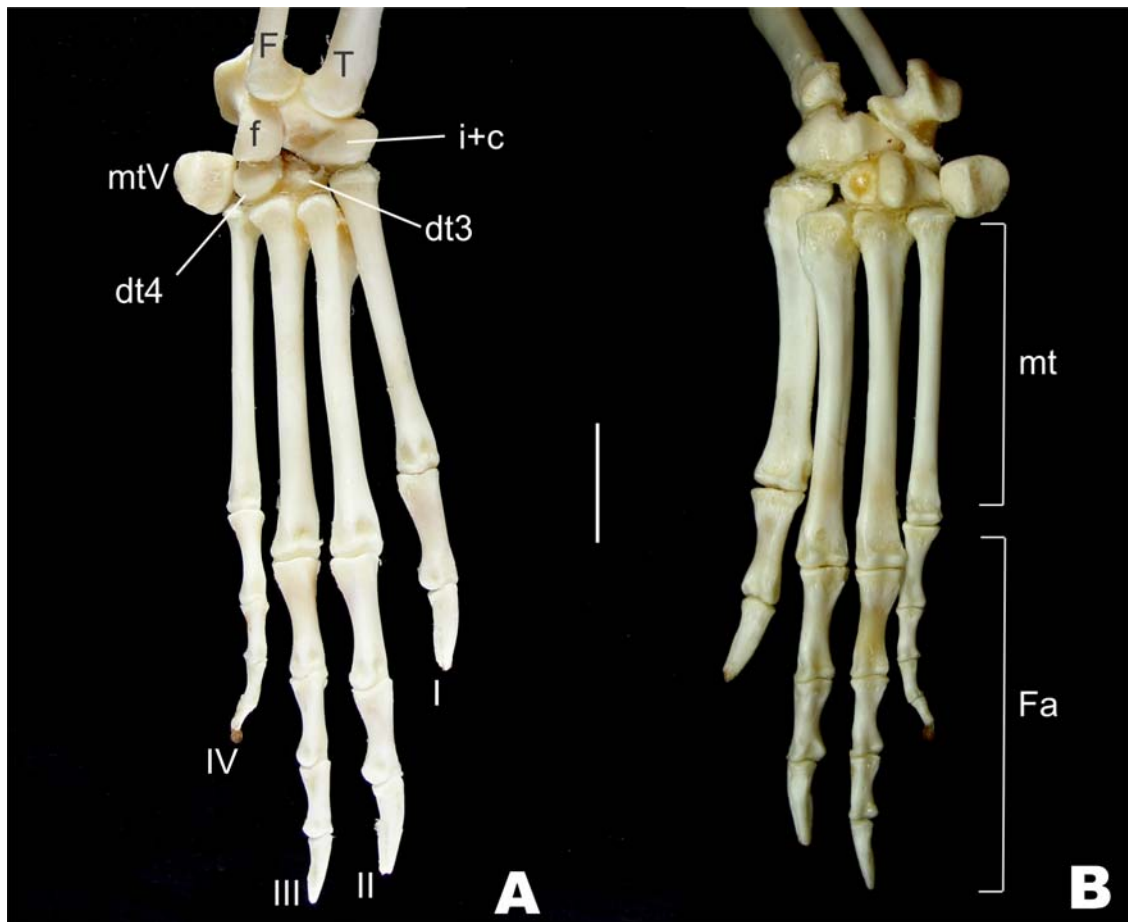


Figura 10: Pé direito de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A) e ventral (B). Abreviaturas: dt3-4, distal do tarso 3 e 4; Fa, falanges; F, fibula; f, fibular do tarso, i+c, intermédio+central; I-V, dedos I-IV; mt, metatarsos; mtV, metatarso V; T, tibia. Escala 30 mm.

Condrogênese da cintura peitoral e membros torácicos

No estágio 10, observou-se o início do desenvolvimento dos membros torácicos, com eventos típicos de outros tetrápodes, em que os elementos do estilopódio, úmero e zeugopódio, ulna e rádio formam-se no sentido próximo-distal, de maneira a produzir alongamento e ramificação em uma condensação visível, marcada de azul com formato de Y (Fig. 11A). Nesse estágio, esses membros são evidenciados externamente como uma placa digital com início de formação dos sulcos entre os dos dedos. Em seguida, no início do estágio 11 é nítida a formação do eixo primário, composto pelo ulnar do carpo e distal do carpo 4, este se estenderá pelo dedo IV nos estágios posteriores. Observou-se também o centro cartilágneo do radial do carpo (Fig. 11B). E antes do fim desse

estágio, os dois elementos que formam a cintura peitoral, escápula e coracóide, apresentaram-se com a morfogênese da cartilagem definida (Fig. 14A).

No fim do estágio 11, observa-se a formação do arco digital composto pelos distais do carpo 4, 3 e 2. Surge também o distal do carpo 5, que não faz parte desse arco. Além desses, todos os metacarpos apresentam-se em formação, sendo o metacarpo V o mais atrasado em relação aos demais. A falange 1 dos dedos I-IV mostram-se com focos condrogênicos bem nítidos. É visível também o pisiforme, que surge como uma nova condensação pré-axial e lateral ao ulnar do carpo (Fig. 11C). Externamente, o membro é visto com dedos individualizados, mas ainda com membrana interdigital (Fig. 4C).

A falange 1 do dedo V inicia o processo de condrogênese no estágio 12 assim como a falange 2 dos dedos I, II e III. Nesse estágio possui uma fórmula falângica 2:2:2:1:1. Outro foco condrogênico surge distal ao radial do carpo, este aparece quando os demais elementos do carpo, incluindo os distais do carpo, já estão formados. Este elemento será referido como central do carpo (Fig. 11D). Externamente é possível observar nesse membro, os esboços dos dedos dentro dos discos expandido, porém sem individualização (Fig. 4D). No início do estágio 13, a falange 3 dos dedos II e III e a falange 2 do dedo IV já mostram focos de condrogênese bem visível. A fórmula falângica nesse embrião é: 2:3:3:2:1. O intermédio, em nenhum momento foi visto individualmente, sua presença foi detectada nesse embrião como uma pequena expansão do radial do carpo em direção a parte distal do rádio e ulna (Fig. 11E).

No estágio 14, surge a falange 3 do dedo IV, a falange 2 do dedo V e falange 4 do dedo III, gerando a fórmula falângica, 2:3:4:3:2. Nesse espécime os ditais do carpo 4 e 5 se aproximam e começam a fundir-se, já o central do carpo apresenta-se mais robusto e mantém distal ao radial do carpo. (Figs. 11F, 13A, B). Externamente os dedos estão bem diferenciados e apresentam a membrana interdigital como no adulto (Fig. 4E).

O distal do carpo 3 começa a fundir-se aos distais do carpo 4 e 5, formando um único e grande elemento do carpo, dc 5+4+3 (Figs. 12A e 13C, D). O central do carpo se aproxima destes elementos fundidos e do distal do carpo 2, mas não chega a fundir com estes (Figs. 13B-D). Além desses surge também a falange 4 do dedo IV, gerando a fórmula falângica 2:3:4:4:2.

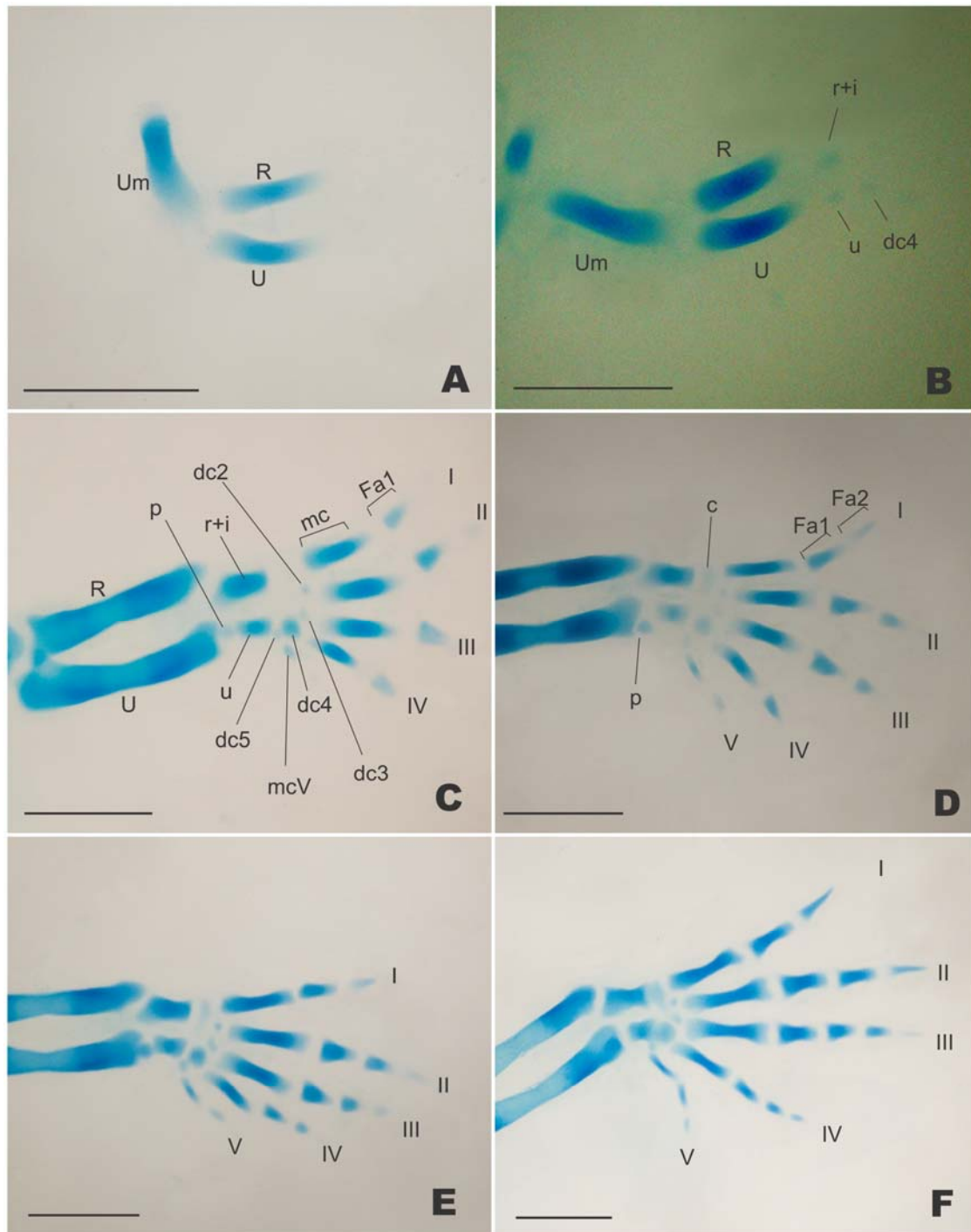


Figura 11: Condrogênese dos membros torácicos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) estágio 10, (B) início estágio 11, (C) fim estágio 11, (D) estágio 12, (E) início estágio 13, (F) estágio 14. Abreviaturas: c, central do carpo; dc 2-5, distais do carpo 2-5; I-V, dedos I-V; Fa1-Fa2, falanges 1-2; mc, metacarpos; p, pisiforme; R, rádio; Ra+i, radial mais intermédio do carpo; U, ulna; u, ulnar do carpo; Um, úmero. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 2 mm.

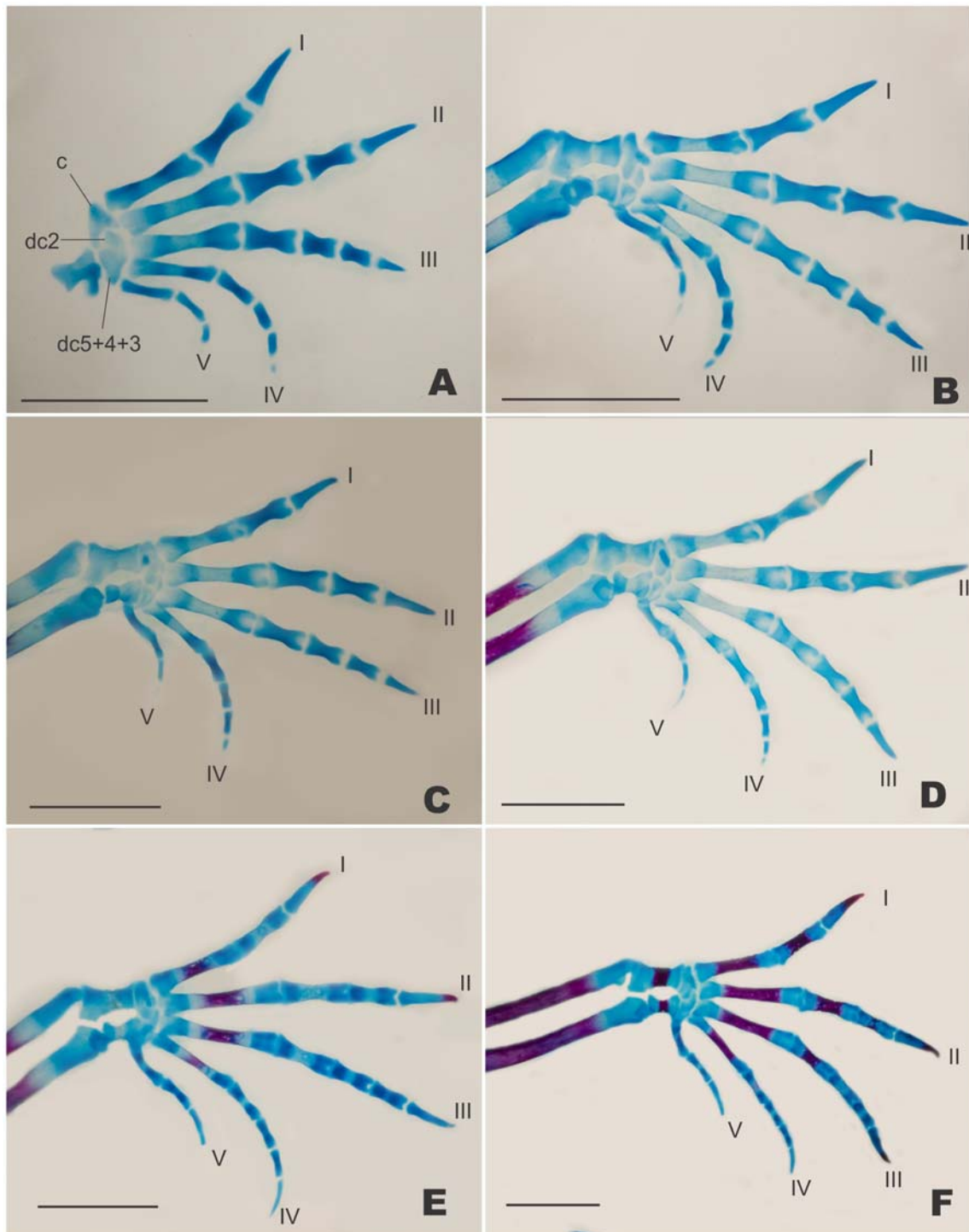


Figura 12: Condrogênese e ossificação das mãos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) estágio 16, (B) início estágio 18, (C) fim estágio 18, (D) estágio 19, (E) fim estágio 22, (F) início estágio 24. Abreviaturas: c, central do carpo; dc 2, distal do carpo 2; dc5+4+3, fusão dos distais do carpo 5+4+3; I-V, dedos I-V. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 2 mm.

A falange 3 do dedo V surge no início do estágio 18, gerando a fórmula falângica 2:3:4:4:3; essa falange é transitória pois não se ossifica no adulto (Fig. 12B, 4G). No estágio 19, a falange 5 do dedo IV aparece, com coloração bem suave (Fig. 12C), gerando durante a condrogênese a fórmula falângica 2:3:4:5:3 (Fig. 12D). Essa falange começa a se fundir com a falange 4 no início do estágio 20, reduzindo a fórmula falângica para 2:3:4:4:3. No fim do estágio 22 a falange 4 se funde completamente com a falange 5 (Fig. 12E). Logo, a falange 3 do dedo 5 começa a fundir com a falange 2 desse mesmo dedo no estágio 23; essa fusão só se completa no início do estágio 24, gerando a fórmula falângica cartilaginosa final 2:3:4:4:2 (Fig. 12F, 4). O processo de formação cartilaginosa está resumido no quadro 1 do apêndice.

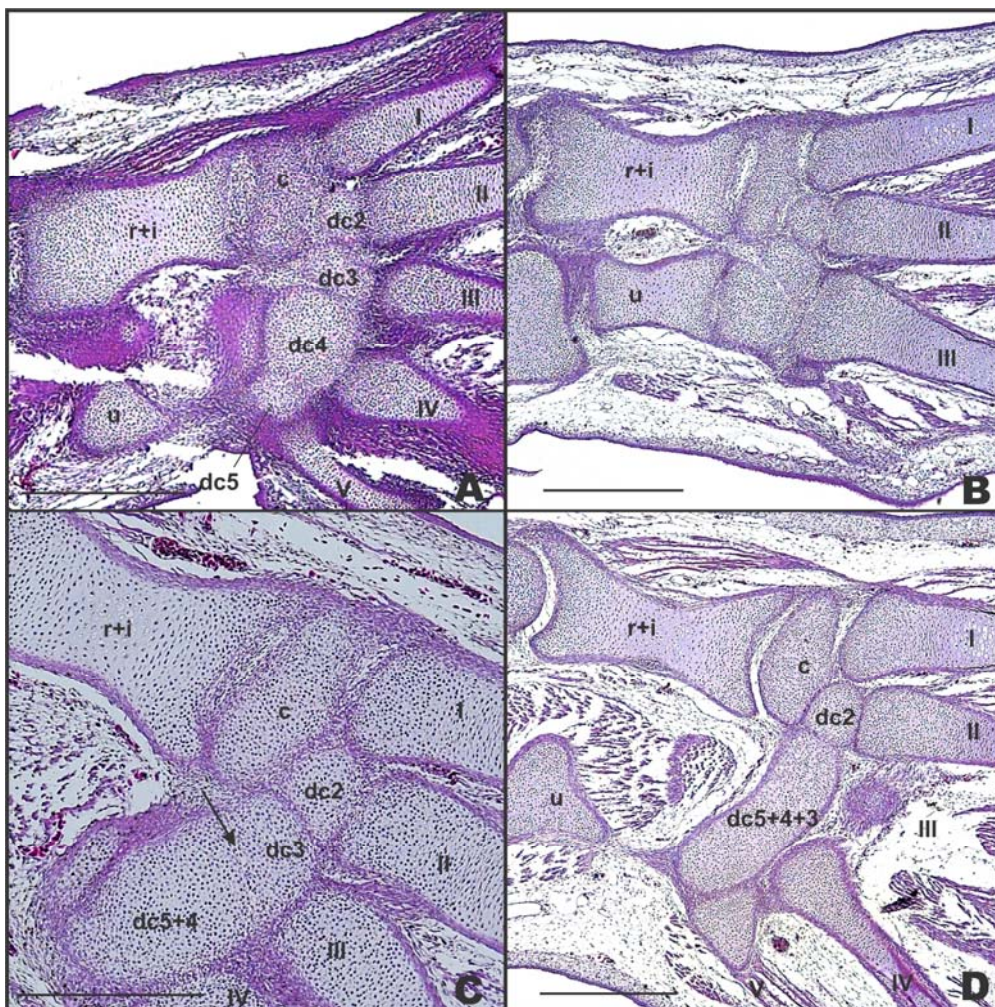


Figura 13: Cortes histológicos de mãos de *M. niger*. (A) início estágio 14, (B) fim estágio 14, (C) estágio 15, (D) início estágio 18. Abreviaturas: c, central do carpo; dc2-5, distais do carpo 2-5; I-V, dedos I-V; r+i, radial mais intermédio do carpo; u, ulnar do carpo; seta, local de fusão. Coloração: Hematoxilina e eosina. Escala: 200 µmm.

Padrão de ossificação da cintura peitoral e membros torácicos

A escápula apresenta centro de ossificação no início do estágio 21 e o coracóide apenas no fim desse estágio (Fig. 14B). A retenção de corante alizarina é observada nas diáfises do úmero, rádio e ulna, no início do estágio 18, indicando o começo do processo de ossificação pericondral. A seqüência de aparecimento desses elementos do estilopódio e zeugopódio (Fig. 15A) não é tão evidente. A retenção do corante avança gradativamente em direção às epífises destes elementos e, no estágio 28 apresentam esboço rígido bem definido, com morfologia bastante similar aos ossos nos adultos (Fig. 16E).

A ossificação dos metacarpos (mc) começa na diáfise dos mc II e III, com discreta retenção de alizarina no estágio 21 (Fig. 15B). O mc I e IV iniciaram sua ossificação no estágio 22. Neste mesmo embrião surgem também centros de ossificação na falange 2 do dedo I e na falange 3 do dedo II. No fim deste estágio foi observado apenas um discreto centro de ossificação no radial+intermédio e outro centro no ulnar do carpo, os quais se intensificaram nos embriões posteriores (Fig. 15C).

Mais tarde, no início do estágio 24, observou-se centros de ossificação na falange 1 dos dedos I ao III e um discreto centro de ossificação na falange 4 do dedo III (Fig. 15E). Foram observados, ainda, leves indícios de retenção de alizarina no metacarpo V e falange 1 do dedo IV, evento que se intensificam em estágio 24 mais avançado. Além destes, observamos retenção de alizarina na falange 1 do dedo IV e falange 2 dos dedos II e III, sendo mais discreto neste último dedo (Fig. 15F). No fim deste estágio, o embrião apresentou apenas discreta retenção de alizarina na falange 3 do dedo III (Fig. 16A). A falange 1 do dedo V só apresentou centro de ossificação no início do estágio 25 (Fig. 16B).

As falanges 2, 3 e 4 do dedo IV e a falange 2 do dedo V, mostraram centros de ossificação no estágio 25 mais avançado; já no carpo, observou-se centro de ossificação no pisiforme (figura 16C). No estágio 26 o dc 5+4+3 mostra um único centro de ossificação; este é o último elemento do carpo a iniciar o processo de formação óssea (Fig. 16E).

Variações foram observadas em alguns embriões no fim dos estágios 25 e 28. Nestes espécimes observou-se centros de ossificação em todos os elementos do carpo e

ausência de ossificação na falange 4 do dedo IV, que já havia aparecido nos embriões no início do estágio 25, 26 e fim do estágio 28 (Fig. 16).

Como consequência dos eventos da série morfológica descritos acima, o carpo de embriões de *M. niger* consiste de três elementos proximais, o radial+intermédio, ulnar e pisiforme e cinco elementos distais, o central do carpo, distais do carpo 2, 3, 4 e 5. Entre o final do período embrionário e eclosão dos filhotes, os elementos do carpo sofreram um extenso remodelamento, fusões e ossificação para formar o padrão do adulto. Ou seja, o radial+intermédio, o ulnar e o pisiforme se ossificam completamente. Os distais do carpo 3, 4 e 5 se fundem e ossificam com apenas um centro de ossificação, mas retêm uma extensa cobertura cartilaginosa que representa a sua forma poligonal; o distal do carpo 2 contribui com essa cobertura, pois não se ossifica e o central do carpo também não ossifica e torna-se mais fibrocartilágneo. O processo de ossificação está resumido no quadro 2 do apêndice.

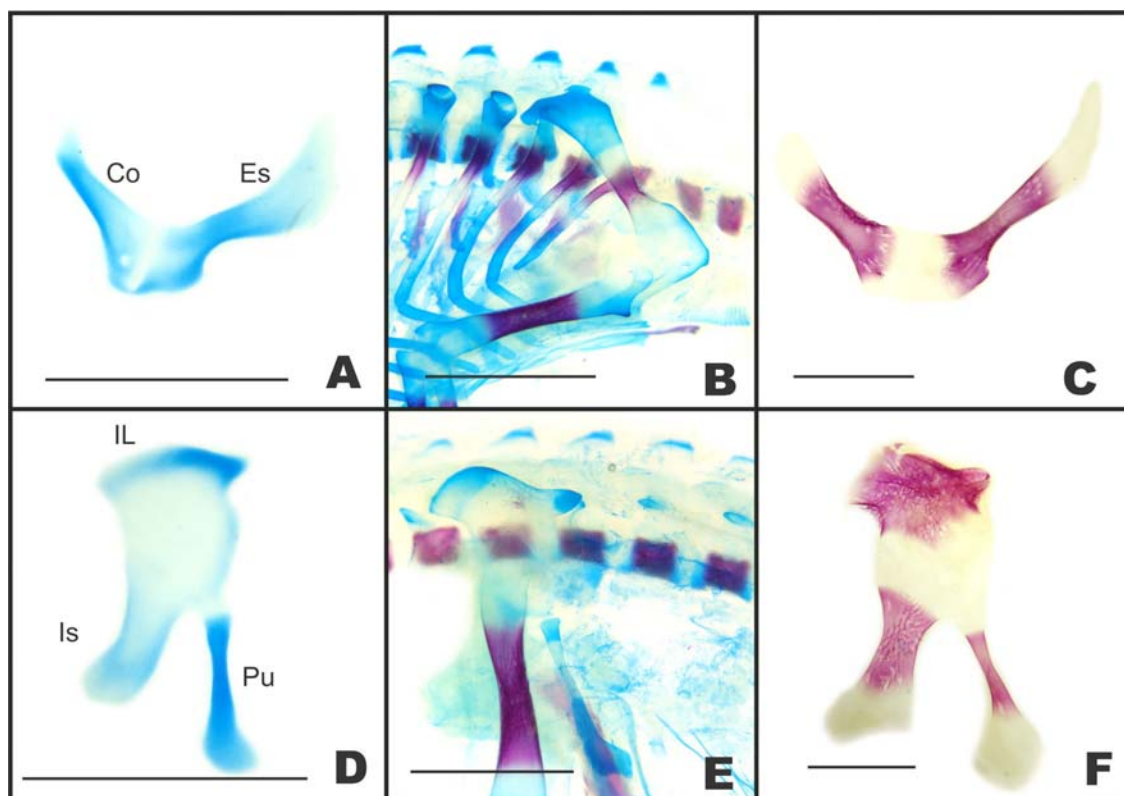


Figura 14: Condrogênese e ossificação da cintura peitoral (A, B e C) e pelvina (D, E e F) de embriões de *M. niger*. (A) vista ventral, início estágio 13, (B) vista lateral, fim estágio 21, (C) vista ventral, fim estágio 24, (D) vista lateral, início estágio 13, (E) vista lateral, fim estágio 21, (F) vista lateral, fim estágio 24. Abreviaturas: Co, coracóide; Es, escápula; IL, ílio; Is, ísquio; Pu, púbis. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.

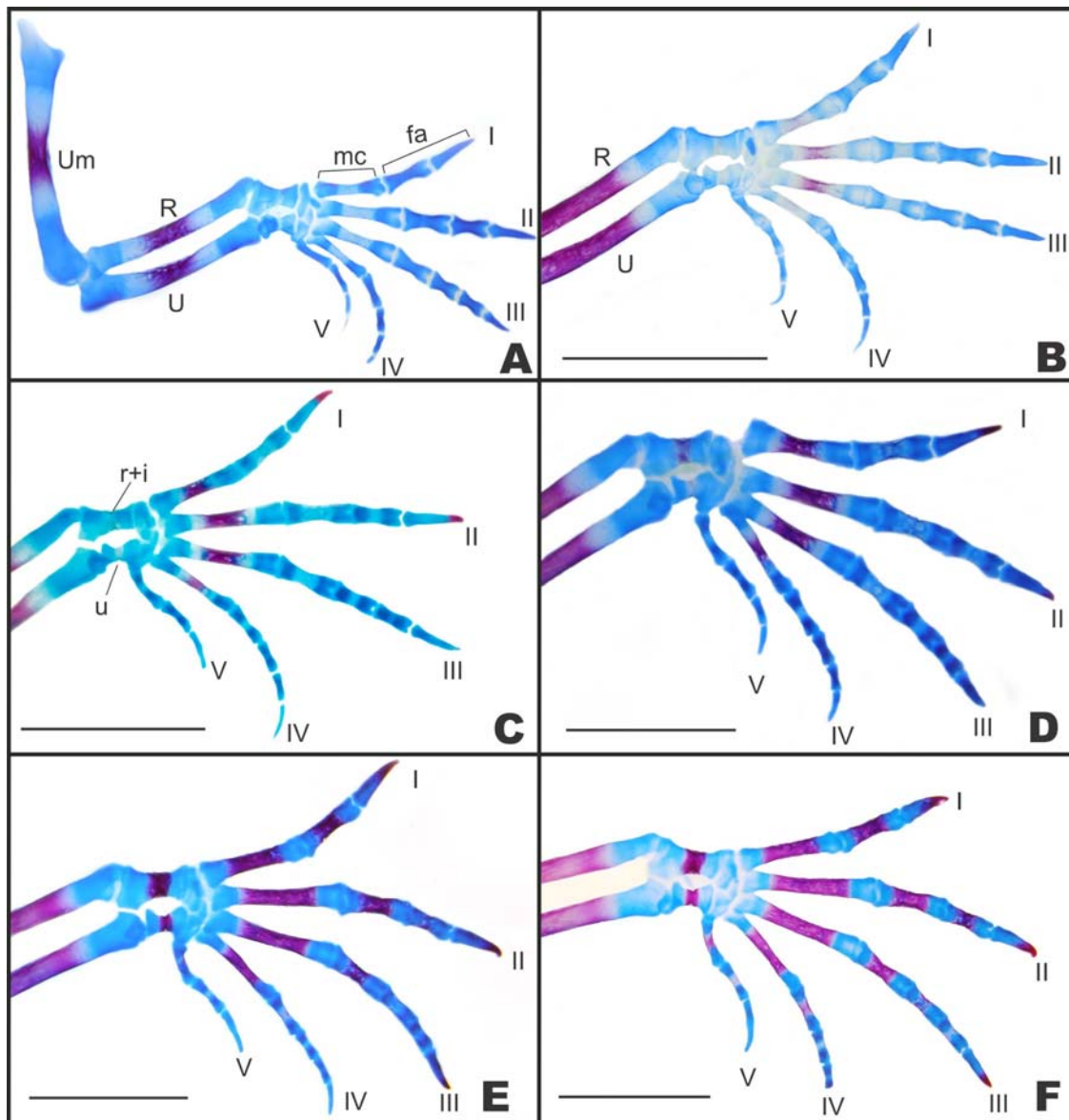


Figura 15: Padrão de ossificação das mãos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) início estágio 18, (B) estágio 21, (C) fim estágio 22, (D) estágio 23, (E) início estágio 24, (F) estágio 24 avançado. Abreviaturas: fa, falanges; I-V, dedos I-V; mc, metacarpos; U, ulna; u, ulnar do carpo; Um, úmero; R, rádio; r+i, fusão do radial mais intermédio do carpo. Diafanização por KOH e coloração vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.

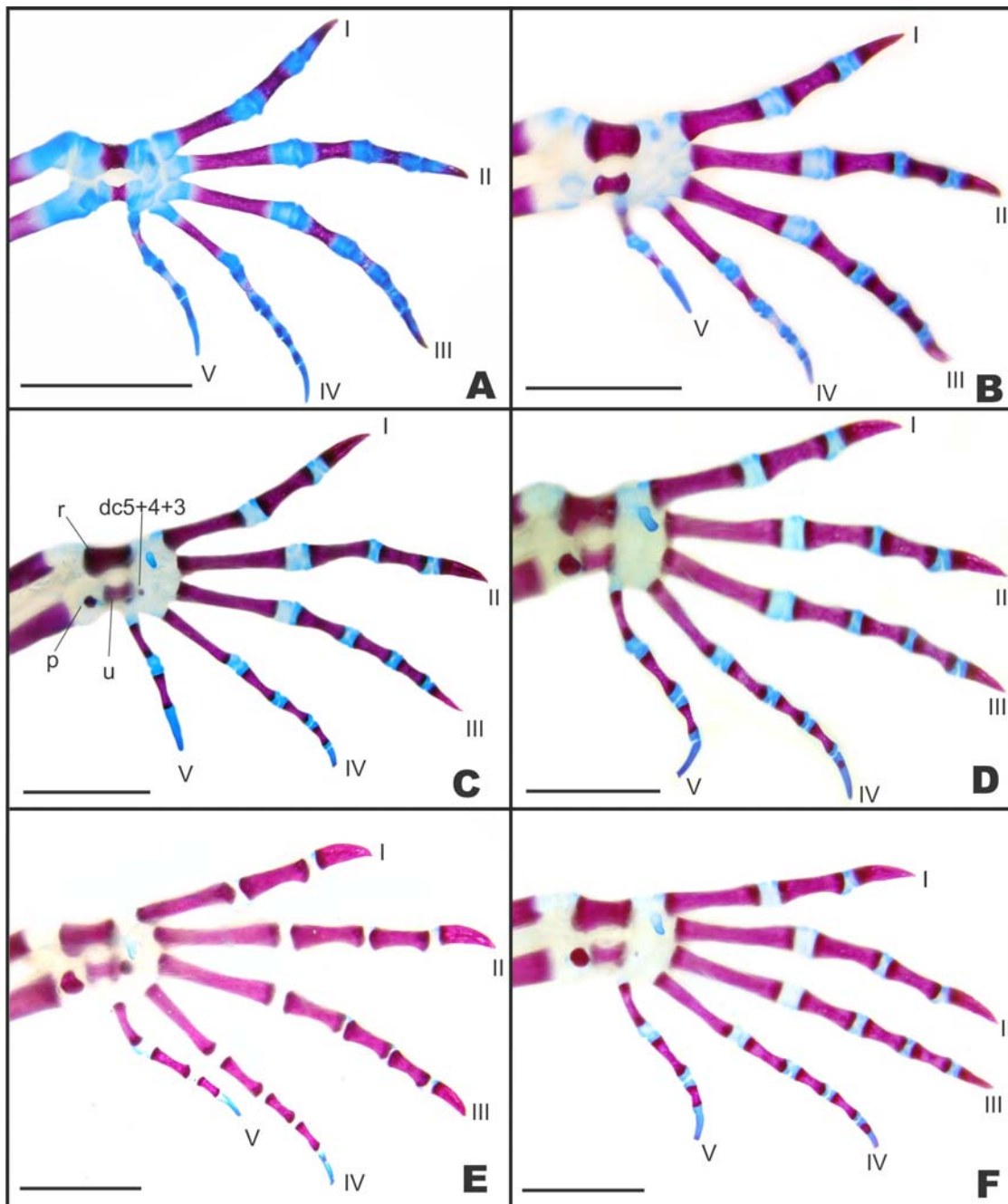


Figura 16: Padrão de ossificação das mãos de embriões de *Melanosuchus niger*, vista dorsal. (A) fim estágio 24, (B) início estágio 25, (C) estágio 25 avançado, (D) fim estágio 25, (E) início estágio 26, (F) estágio 28. Abreviaturas: dc5+4+3, fusão dos distais do carpo 5+4+3; I-V, dedos I-V; p, pisiforme; r+i, fusão do radial mais intermédio do carpo; u, ulnar do carpo. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.

Condrogênese da cintura e membros pelvins

O aparecimento da primeira condensação cartilágnea surge no fim do estágio 7, período em que a placa digital dos brotos aparece no embrião pela primeira vez. Neste estágio, o acúmulo de condensação cartilágnea, marcada de azul, assume um formato de Y, a parte proximal corresponde ao elemento do estilopódio, fêmur, e os ramos distais aos elementos do zeugopódio, fíbula e tibia. No fim do estágio 8 é possível observar nitidamente que o esboço cartilágneo do fêmur, tibia e fíbula exibem uma fraca, mas notável separação entre si (Fig. 18A, 5B).

No fim do estágio 9, aparece na extremidade distal da fíbula, o fibular do tarso e o distal do tarso 4, com discreta retenção do corante azul de alcian. Ambos aparecendo como um broto pós-axial, e dá início ao eixo primário desse membro (Fig. 18B). A retenção do corante fica um pouco mais evidente no início do estágio 10. Há ainda um leve indício de formação do intermédio, que se encontra arranjado entre as extremidades distais da fíbula e tibia, além dos metatarsos III e IV, como continuação do eixo primário (Fig. 18C). Posteriormente, o intermédio desenvolve-se como um distinto processo anterior e ocupará a região distal da tibia (Fig. 17). Nesse estágio, de acordo com as características morfológicas externas, a placa digital ainda não sofre individualização dos dedos (Fig. 5C).

No início do estágio 11, observa-se indicação do distal do tarso 3, sem conectividade aparente entre o distal do tarso 4, dando início à formação do arco digital, no fim do estágio 11 (Fig. 18D). O intermédio apresenta-se mais robusto com uma expansão em direção a extremidade distal da tibia e devido a essa origem embrionária e incompleta segmentação, esta área condrogênica será referida como central do tarso. Como observado nos estágios seguintes, o central não se separa completamente do intermédio; ambas as condensações formam um único elemento, o intermédio+central. O tuber do fibular do tarso começa a demonstrar retenção do corante azul de alcian. Além desse elemento, forma ainda os metatarsos, incluindo o atípico metatarso V e a falange 1 de todos os dedos, a falange 2 também se apresenta nos dedos II, III e IV. Neste estágio, no sentido látero-medial, a fórmula falângica é: 1:2:2:2 (Fig. 18D). Observa-se também os três elementos que formam a cintura pelvina, o púbis, ílio e ísquio com a morfogênese da cartilagem definida. Externamente, na placa digital do pé

são distintos sulcos pronunciados, formando os raios digitais, indicando os futuros dedos (Fig. 5D).

No estágio 12, os únicos eventos novos foram o aparecimento da falange 2 do dedo I e a falange 3 do dedo IV, esta apresenta-se mais discreta (Fig. 18E). A falange 3 dos dedos II e III, aparece no início do estágio 13, além disso surge ainda o distal do tarso 2 (Fig. 17C). A falange 4 do dedo III surge no fim do estágio 13. Nestes dois últimos embriões a característica morfológica externa dos membros revela, claramente, os dedos demarcados com início de individualização (Fig. 5E). A falange 4 do dedo IV surge no estágio seguinte, o estágio 14.

No início do estágio 18, período em que os dedos apresentam-se completamente individualizados, surge o último elemento cartilágneo do membro pelvino, a falange 5 do dedo IV com pouca retenção de azul de alcian, gerando a fórmula falângica cartilágnea final 2:3:4:5 (Fig. 18H, 5G). O processo de formação cartilágnea está resumido no quadro 3 do apêndice.

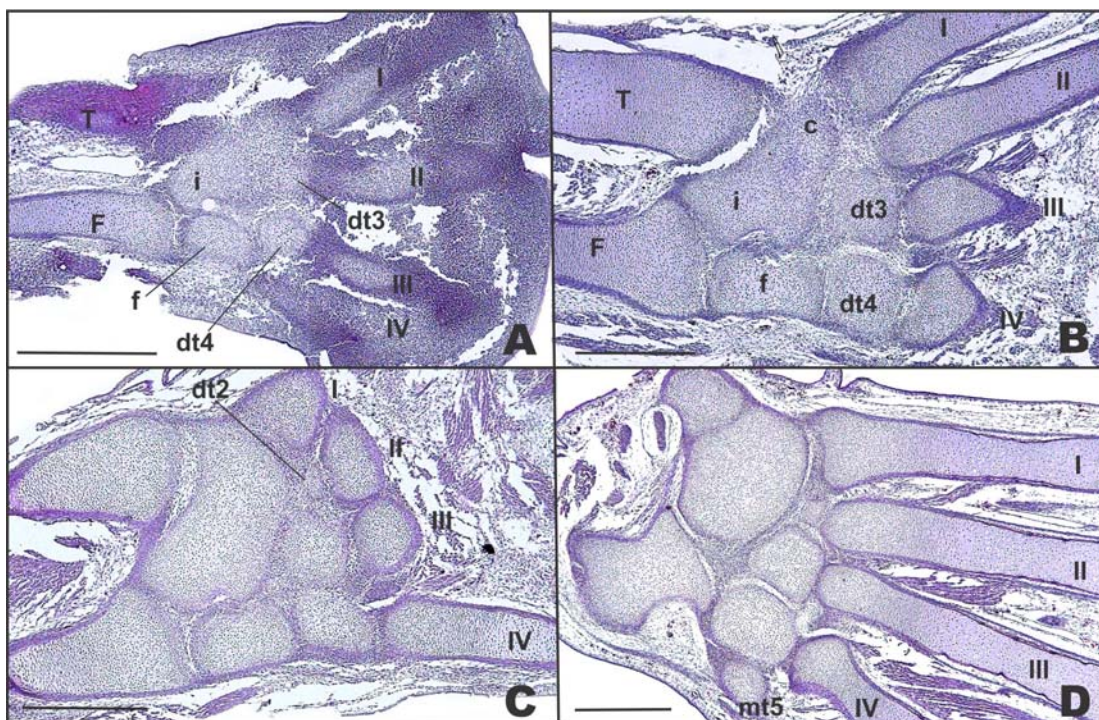


Figura 17: Cortes histológicas de membros pés de *M. niger*. (A) fim estágio 11, (B) início estágio 13, (C) fim estágio 13, (D) fim estágio 16. Abreviaturas: c, central; dt2-4, distais do tarso 2-4; F, fíbula, f, fibular do tarso; i, intermédio; I-V, dedos I-V; mt5, metatarso 5; T, tíbia. Coloração: Hematoxilina e eosina. Escala: 200µm.

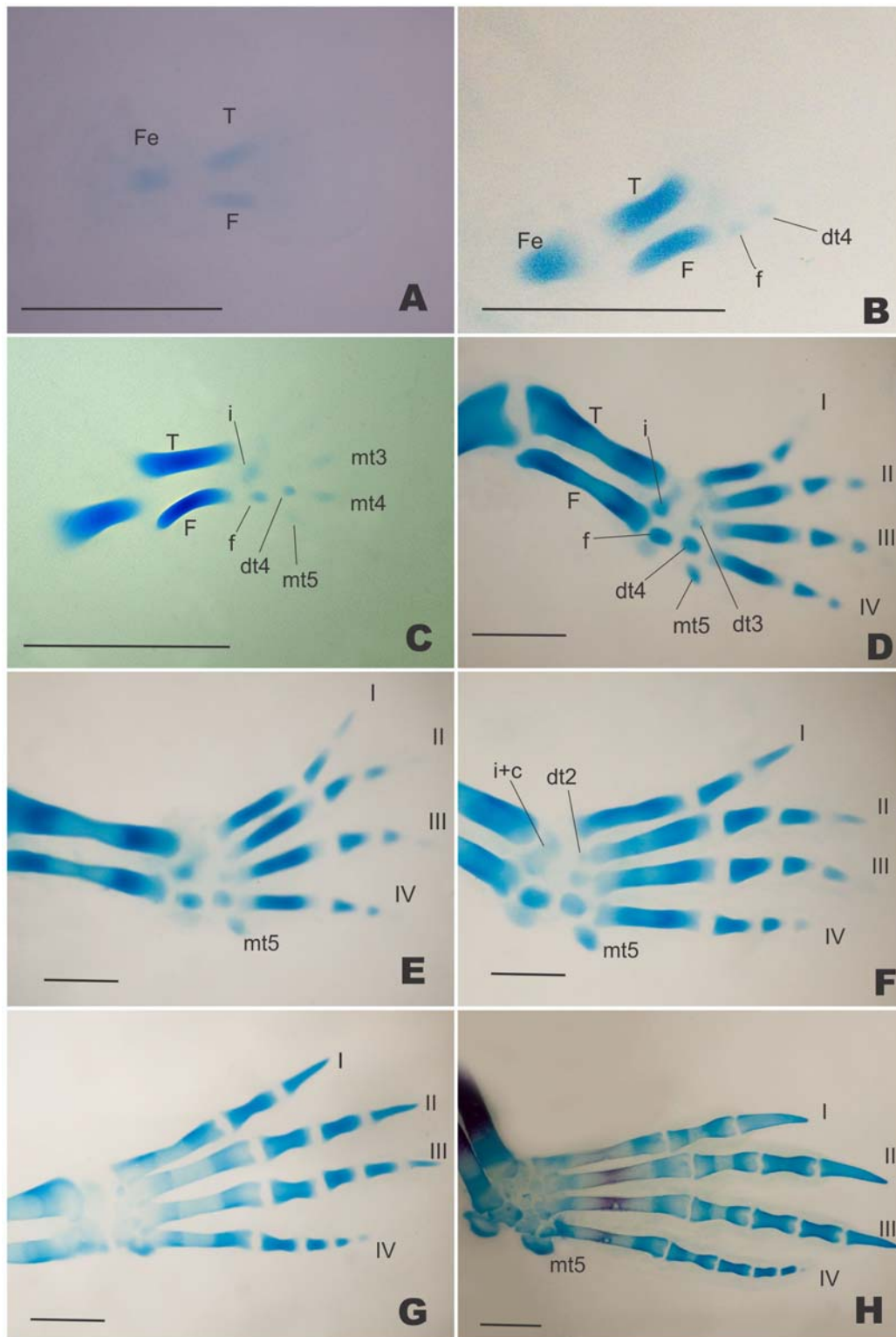


Figura 18: Condrogenese dos membros pelvicos de embriões de *M. niger*, vista dorsal. (A) fim estágio 8, (B) fim estágio 9, (C) início estágio 10, (D) fim estágio 11, (E) estágio 12, (F) início estágio 13, (G) fim estágio 14, (H) início estágio 18. Abreviaturas: dt2-4, distais do tarso 2-4; Fe, fêmur; F, fibula; f, fibular do tarso; I-IV, dedos I-IV; i, intermédio; i+c, fusão do intermédio mais central; mt5, metatarso 5; T, tibia;. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 2 mm.

Padrão de ossificação da cintura e membros pelvins

Os elementos da cintura pelvina começam a se ossificar no fim do estágio 21 com um minúsculo centro de ossificação na asa do ílio e no fim deste estágio o ísquio e púbis. A ossificação do estilopódio, fêmur, e elementos do zeugopódio, tíbia e fibula, retêm alizarina, simultaneamente, pela primeira vez no fim do estágio 18 (Fig. 19A). A formação óssea tem início sempre pelas diáfises, a partir do processo pericondral, avançando em direção as epífises; no estágio 28 apresentam seu esboço rígido bem definido.

A ossificação dos metatarsos (mt) começa pela diáfise no fim do estágio 19 com retenção de corante nos mt II e III, seguido pelos mt I e IV no início do estágio 20 (Figs. 19B e C). O atípico metatarso V ossifica bem mais tarde, junto com elementos do tarso no início do estágio 25, período onde os demais metatarsos estavam em processo bastante adiantado (Fig. 19H).

Entre as falanges, ossificação é aparente pela retenção de alizarina apenas na falange 2 do dedo I no fim do estágio 21 (Fig. 19C). Observa-se ainda, modificações na diáfise da falange 1 em todos os dedos, mas sem retenção de alizarina. Apenas no início do estágio 22 essas falanges mostraram coloração. Além dessas, a falange 3 do dedo II apresenta-se com intensa retenção de alizarina. Houve leves indícios de retenção de alizarina na falange 2 dos dedos II e III (Fig. 19D). No fim do estágio 22 o único episódio que ocorre é o aparecimento de centro de ossificação na falange 3 do dedo II (Fig. 19E). No início do estágio 24, a falange 2 dos dedos II e III mostram centros de ossificação. Além destas, a falange 2 do dedo IV e a falange 3 do dedo III apresentam também centros de ossificação e no fim deste estágio observa-se leves indícios de retenção de alizarina na falange 3 do dedo IV. Nos elementos do tarso observa-se um discreto centro de ossificação no fibular do tarso e outro no Intermédio (Fig. 19F e G).

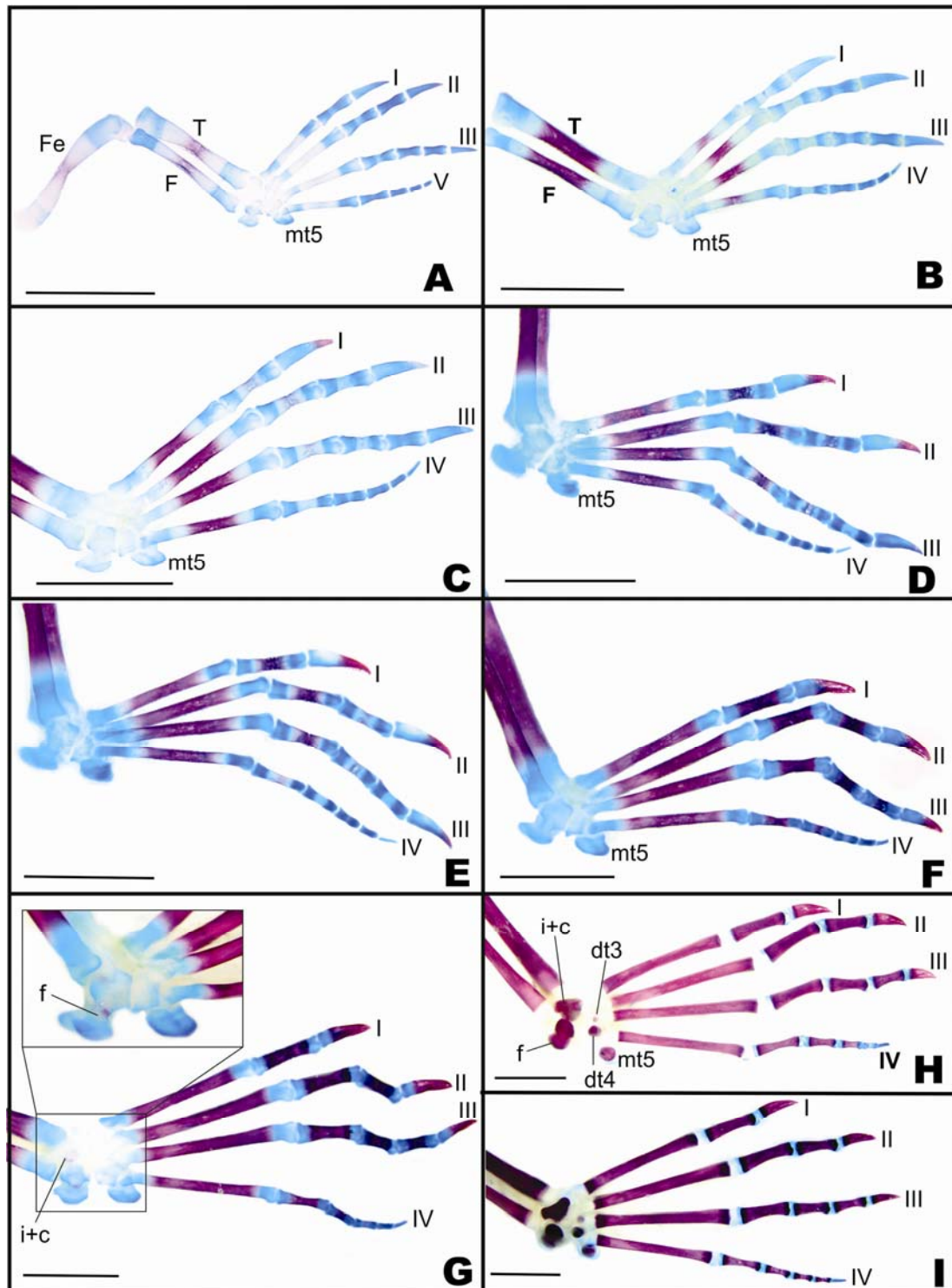


Figura 19: Padrão de ossificação dos pés de embriões de *M. niger*, vista dorsal. (A) fim estágio 18, (B) fim estágio 19, (C) fim estágio 21, (D) início estágio 22, (E) fim estágio 22, (F) início estágio 24, (G) fim estágio 24, (H) início estágio 25, (I) início estágio 26. Abreviaturas: dt3-4, distais do tarso 3-4; Fe, fêmur; F, fibula; f, fibular do tarso; I-IV, dedos I-IV; i+c, intermédio mais central do tarso; mt5, metatarso 5; T, tibia;. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5 mm.

O distal do tarso 4 e metatarso V apresentaram centros de ossificação no início do estágio 25. No fim deste estágio, aparece o distal do tarso 3, que se intensifica apenas no início do estágio 26. Observa-se, ainda, indícios de ossificação na falange 4 do dedo IV, fato que fica evidente no estágio seguinte. Assim, o embrião no estágio 27 apresenta a fórmula falângica do adulto: 2:3:4:5 (Fig. 19 H e I).

O resultado do número de elementos do tarso do embrião são cinco: intermédio+central, fibular, os distais do tarso 4, 3 e 2. Como no carpo, os elementos do tarso dos juvenis, sofreram extensa remodelagem e mudanças relativas no tamanho para obter a forma adulta. O intermédio+central, o fibular, distal do tarso 4 e distal do tarso 3 ossificam. O distal do tarso 2 torna-se fibrocartilágneo e permanece intimamente associado com o distal do tarso 3 e com a base do metatarso I. A falange 5 do dedo IV, permanece cartilágnea e torna-se reduzida no adulto. O processo de ossificação está resumido no quadro 4 do apêndice.

4.2.1.2 DISCUSSÃO

Cintura peitoral e pelvina

Segundo Clark, 1994, a escápula é maior do que o coracóide, sendo esta uma condição primitiva. De fato, a maior parte dos Mesoeucrocodylia basais conhecidos possuem a escápula mais longa que o coracóide. Esta diferença de comprimento é intermediária entre os Crocodyliformes basais e Crocodylia viventes, que possuem a escápula apenas ligeiramente mais longa que o coracóide. Durante o desenvolvimento embrionário, a escápula de *M. niger* mantém sempre essa diferença de comprimento em relação ao coracóide, além de apresentar centros de ossificação primeiro e estar sempre mais adiantada. Esta informação foi também constatada por Rieppel (1993b) em *A. mississippiensis*. Em *C. yacare*, Lima et al. (2011a) informou que a escápula apresenta gradiente de coloração mais intenso que o coracóide, o que confirma a constatação anterior. A evolução da variação no comprimento desses ossos da cintura peitoral deve ainda ser corretamente avaliada, preferencialmente por meio de aplicação dos métodos filogenéticos comparativos.

Em *M. niger*, durante o desenvolvimento cartilágneo dos elementos da cintura pelvina, o ílio e ísquio se desenvolvem como uma peça única, apesar de se ossificarem

por dois centros de ossificação e formar elementos distintos no adulto, porém fortemente ligados por meio de uma articulação fibrosa (Figs. 14D, E). Já o púbis se desenvolve por um centro cartilágneo independente e se mantém livre, tal característica reflete na sua funcionalidade.

A não participação do púbis de *M. niger*, *C. yacare* (Lima et al., 2011a) e demais Crocodylia na formação do acetábulo, onde o contato se dá apenas por ligamentos com o ílio e sua articulação convexa numa superfície ligeiramente côncava do ísquio, permite movimentos dorso-ventrais em decorrência da contração de músculos hipoaxiais (*rectus abdominis* e *ischiopubis*). Este movimento púbico, em associação ao movimento da gastrália é responsável por parte da respiração, na qual movimentos pélvicos auxiliam na ventilação pulmonar por meio da expansão e contração dos pulmões, guiadas principalmente pelo grande músculo *diaphragmaticus* (Farmer e Carrier, 2000).

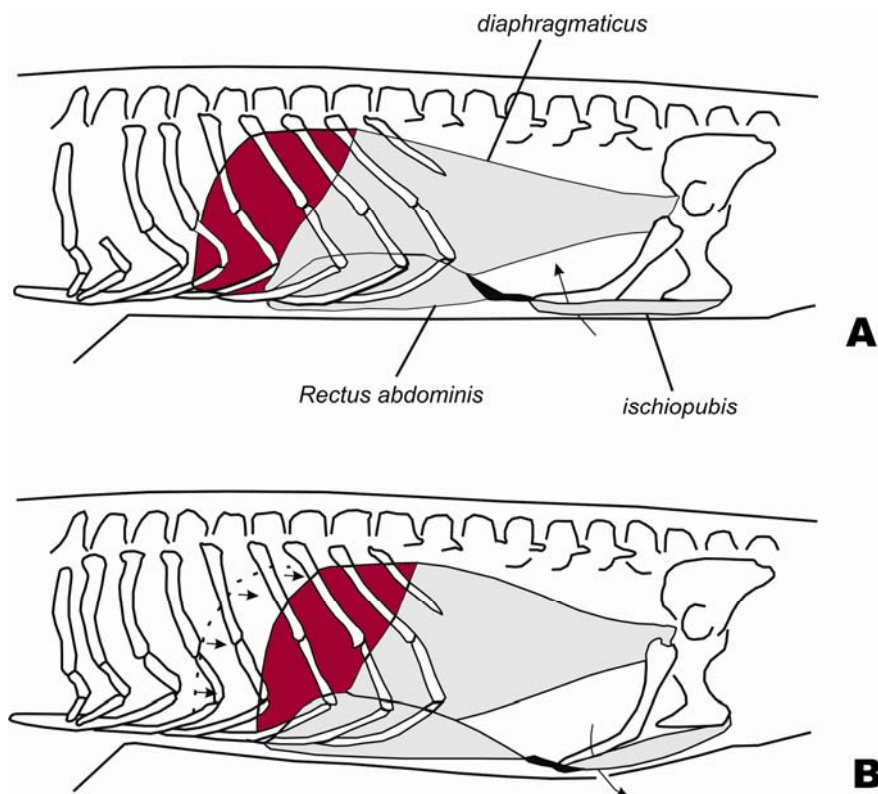


Figura 20: Desenho esquemático do mecanismo da respiração pélvica em *Alligator* durante a expiração (A) e inspiração (B). Modificado de Carrier e Farmer (2000).

Tanto *M. niger* quanto *C. yacare* (Lima et al., 2011a), apresentam um púbis capaz de participar de movimentos acessórios à respiração, com participação do

músculo *diaphragmaticus* e livre de articulação com o ílio, condição que ocorre nos Crocodyliformes (Carrier e Farmer, 2000; Claessens, 2004a). No entanto, nos Crocodylomorpha basais, como em *Terrestrisuchus*, o púbis é mantido firmemente articulado ao ílio e contribui com a formação do acetábulo, de modo que nestes táxons o púbis não é capaz de movimentos dorso-ventrais (Fig. 21). É possível que a evolução do osso púbis nos Crocodylia possa refletir uma tendência de hábitos aquáticos com benefícios durante a submersão.

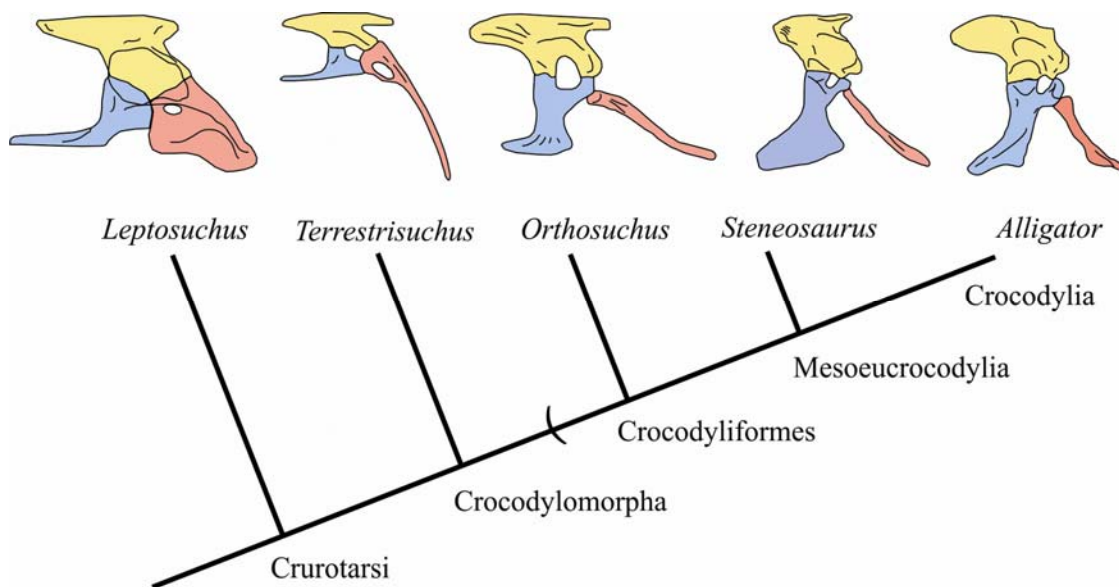


Figura 21: Filogenia da transição do osso púbis. Vista lateral da pelve direita. Em *Leptosuchus* e o crocodylomorpha basal *Terrestrisuchus* o púbis ainda articula com ambos os ossos ílio e ísquio. Nos crocodyliformes basal *Orthosuchus*, o púbis articula apenas com a margem anterior proximal do ísquio. Ílio destacado de amarelo, ísquio em azul e púbis em vermelho. Modificado de Claessens (2004a).

Membros

As observações sobre o desenvolvimento dos membros do Alligatoridae *M. niger*, descritas acima, são consistentes com o padrão de outros tetrápodes (Shubin e Alberch, 1986) e podem ser comparadas com estudos similares realizados em outros táxons. No entanto, algumas variações ocorrem e são discutidas abaixo.

Eixo primário e arco digital

Shubin e Alberch (1986) descreveram o desenvolvimento do esqueleto com base em conexões espaciais, onde as primeiras condensações esqueléticas aparecem proximalmente, e ainda outras condensações por meio de segmentação e eventos de bifurcação ocorrem e formam o eixo primário, no qual o úmero/fêmur alonga-se e sofre ramificação para formar a ulna e rádio/fíbula e tibia, e o eixo primário se estende através da ulna/fíbula, ulnar do carpo/fibular do tarso e elementos do dedo IV. Müller e Alberch (1990) concluíram que esta é a característica invariável mais proeminente no desenvolvimento dos membros. *M. niger* segue o padrão esperado, bem como outros representantes Archosauria como *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990), *Struthio camelus* (Kundrát, 2009) e *Gallus gallus* (Burke e Feduccia, 1997), além de espécies de anuros (Fabrezi e Alberch, 1996), Lagartos (Blanco e Alberch, 1992) e Testudines (Sanchez-Villagra et al., 2008b, 2009; Sheil e Portik, 2008).

A diferenciação precoce desse eixo primário é uma importante ferramenta morfológica que permite uma interpretação da identidade e homologia dos dedos e elementos específicos do autopódio, bem como identificar e discutir a relação de posições das estruturas e direções de crescimento (Burke e Feduccia, 1997).

Outra estrutura, que também parece ser invariante, durante o desenvolvimento é o arco digital (Sheil e Portik, 2008). Segundo Müller e Alberch (1990), em *A. mississippiensis*, esse arco origina-se como um ramo do eixo primário, composto pelos distais do carpo/tarso 4, 3 e 2; seus correspondentes metacarpos/metatarsos aparecem como resultado de uma seqüência de eventos de ramificação que acompanha o desenvolvimento desse arco. Os resultados desses autores são semelhantes aos encontrados por Kundrát (2009), na ave *Struthio camelus*, o qual ressaltou ainda, que os distais do carpo 3 e 2 desenvolvem-se com apenas um foco cartilágneo, e em estágios posteriores se fundem com o distal do carpo 4 formando um único elemento, o distal do carpo 4+3+2. Burke e Feduccia (1997) assumiram que o membro dos Terópodes desenvolveu com o típico eixo primário, seguido também pelo desenvolvimento do arco digital. As análises realizadas no *M. niger* confirmam o surgimento deste arco após o eixo primário; no entanto não é claro o padrão de ramificação na origem desses elementos, como relatado por vários autores com pesquisas realizadas em diferentes táxons (Burke e Alberch, 1985; Shubin e Alberch, 1986; Müller e Alberch, 1990;

Fabrezi et al., 2007). A indicação pela coloração de azul de alcian e corte histológico é que há condensações independentes de todos os distais do carpo de *M. niger* (Figs. 11C, 13, 17). É importante também considerar a possibilidade de ocorrer variação inter-específica na origem dessa estrutura.

Radial+intermédio e central do carpo

Em *M. niger* o intermédio em nenhum momento apresentou-se individualizado. Esse dado concorda com Hinchliffe e Hecht (1984), Müller e Alberch (1990) e Burke e Feduccia (1997), que relataram a presença de uma condensação embrionária que representa a fusão do intermédio com a condensação do radial nos Crocodylia e aves. Isso contrasta com os Testudines, onde esses elementos desenvolvem-se com foco condrogênico individual (Burke e Alberch, 1985; Sheil, 2003, 2005). Já Mathur e Goel (1976) descreveram o intermédio como uma cartilagem transitória que desaparece durante o desenvolvimento do lacertídeo *Calotes versicolor*. Fabrezi et al., (2007) analisaram vários táxons de lagartos e concluíram ser necessária análise mais detalhada sobre o desenvolvimento dos membros para confirmar a identidade desse elemento. No entanto, para Crocodylia, como descrevemos acima, não há provas claras de que o intermédio e radial têm origens distintas: o radial tem origem pré-axial, enquanto o intermédio tem origem pós-axial. Todavia, ambos os elementos exibem grande proximidade espacial durante o desenvolvimento.

No presente trabalho, assim como observações de Müller e Alberch (1990) para *A. mississippiensis*, consideramos que durante a diferenciação dos derivados do arco digital, o único central do carpo permanece indiferenciado. Esses autores relataram que o central do carpo é o último elemento a surgir, este se desenvolve de maneira incomum, pois tem origem por meio de segmentação do radial+intermédio e pré-axial, enquanto, Shubin e Alberch (1986) ressaltaram que os elementos centrais do carpo têm origem pós-axial. Em *M. niger* também referimos a esse elemento como um central do carpo, devido a localização que ele ocupará no adulto, no entanto, não concordamos que o radial+intermédio esteja envolvido em sua gênese, uma vez que não foi observado nenhuma segmentação em *M. niger* que originasse o central do carpo.

Em outros répteis, como Testudines, Burke e Alberch (1985), observaram também que durante a diferenciação dos derivados do arco digital as regiões centrais do

carpo permanecem indiferenciadas, com exceção da condensação do intermédio. Esses autores ainda sugeriram que o central IV surge via condensação dentro dessa região central do autopódio. Tal evidência já havia sido constatada por Sanchez-Villagra et al. (2007), em estudos com *Chelonia mydas*, no entanto, seus comentários sobre estes elementos ficaram limitados apenas às observações de dimensões. Nos Testudines, diferentemente de Crocodylia, são descritos 3 centrais do carpo; é interessante ressaltar que entre as espécies de Testudines ordem ocorre muitas diferenças na formação cartilágnea, principalmente na origem e modificações dos elementos centrais do carpo.

Intermédio+central do tarso

Em *M. niger* e *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990), logo após a formação do eixo primário, surge o intermédio arranjado entre as extremidades distais da fibula e tibia, posteriormente, desenvolve-se como um distinto processo anterior e ocupa a região distal da tibia. Nesse processo, surge um centro cartilágneo secundário, o central do carpo, que se mantém conectado ao intermédio (Figs. 17, 18). Desta maneira, a cartilagem do intermédio-central se diferencia como uma única condensação condrogênica com dois focos: um proximal, o intermédio e outro distal, o central do tarso (astrágalo). À semelhança do *A. mississippiensis*, essa expansão do intermédio foi considerada como sendo o central do tarso, devido a essa origem embrionária e região que ocupa. No *M. niger* esse elemento se ossifica com apenas um centro de ossificação, apesar de sua gênese envolver dois focos condrogênicos. Lagartos possuem formação desses elementos semelhante a esses Crocodylia (Fabrezi et al., 2007). Já em outros répteis o central do tarso pode estar ausente, como nas espécies de Testudines *P. expansa* (Vieira et al., 2011), *C. mydas* e *C. caretta* (Sanchez-Villagra et al., 2007).

Redução do mesopódio

Holmgren (1933), Romer (1956), Hinchliffe (1985, 1991), tentaram explicar a evolução dos membros dos Archosauria. Muitos destes estudos foram baseados em dados comparativos e só mais tarde em observações embriológicas. De acordo com estas últimas observações, 13 pré-condensações representariam a condição inicial na morfogênese (Steiner, 1934 *apud* Müller e Alberch, 1990), subsequencialmente várias outras fusões ocorreriam produzindo apenas seis elementos no carpo (Müller e Alberch, 1990; Buscalioni et al., 1997).

Nossas observações contrastam com algumas das interpretações tradicionais. Observamos, por exemplo, que durante o período embrionário, há menos condensações cartilágnea do que relatado acima. Como consequência de eventos da série morfogenética, o carpo de *M. niger*, durante os primeiros estágios, consiste de três elementos proximais, o radial+intermédio, ulnar e pisiforme e cinco elementos distais, o central do carpo, distais do carpo 2, 3, 4 e 5, totalizando oito condensações. Em período embrionário mais adiantado (estágio 16), fusões, remodelações e ossificações ocorrem, e produzem um carpo com quatro elementos ossificados e dois cartilágneos. Fusões e ausência de ossificação conduziram a redução desses elementos em *M. niger*. Essa é uma característica compartilhada com demais Crocodylia viventes, como *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990; Rieppel, 1993a; Buscalioni et al., 1997) e *C. yacare* (Lima et al., 2011a).

Em geral, na fileira proximal o radial+intermédio e ulnar são os primeiro elementos a apresentarem centros de ossificação, esses são elementos alongados, com o radial maior que o ulnar. Segundo Benton e Clark (1988), essa característica é uma das sinapomorfias de Crocodylomorpha, sendo este, o mesmo padrão encontrado em *M. niger*. O pisiforme apresenta centro de ossificação após esses elementos, segundo Shubin e Alberch (1986), Müller e Alberch (1990) e também na espécie em estudo, o pisiforme aparece como uma nova condensação pré-axial e lateral ao ulnar do carpo. Diferente de outras condensações cartilágnea do membro, o pisiforme não apresenta conexões espaciais com demais elementos do autopódio. Este se ossifica completamente, e juntamente com o radial+intermédio e ulnar, são os mais comumente encontrados no registro fóssil (Buscalioni et al., 1997).

No presente trabalho, a fusão dos distais do carpo 3+4+5 em *M. niger*, e distais do carpo 4+5 em *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990), se ossificam com um único centro de ossificação. Os demais distais do carpo permanecem cartilagíneos, assim como o central do carpo. Segundo Müller e Alberch (1990), este elemento torna-se mais fibrocartilagíneo após a eclosão. Utilizando dados paleobiológicos e embriológicos, Buscalioni et al. (1997) realizaram um estudo comparativo com intuito de analisar a hipótese da perda de elementos do carpo em Crocodylia. Segundo esses autores, uma revisão dos táxons extintos revelou uma limitação na variação do número de ossos do carpo, sendo apenas três a quantidade máxima de distais do carpo, essa observação foi registrada em fósseis de espécies da família Atoposauridae e Thalattosuchia. Por outro lado, os Crocodylia viventes representam um grupo homogêneo em que todos os membros do clado só possuem um grande elemento distal do carpo ossificado (Romer, 1956). Essas afirmações são coerentes com nossas observações para *M. niger* bem como para *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990) e *C. yacare* (Lima et al., 2011a).

Segundo Riff (2007), nos Crocodylomorpha, a identificação dos distais do carpo, ao longo da sua história, é conflitante. Nos estudos fossilíferos o número e identidade dos distais do carpo, nos poucos crocodylomorpha que preservam estes elementos, diferem entre vários autores, o que historicamente dificultou a identificação de homologias entre estes elementos. Estudos embriológicos das formas recentes que detalhem a origem e desenvolvimento desses elementos são novos e em poucas espécies. Isto se restringe aos estudos de Rieppel (1993b), Lima et al. (2011a) e, agora em *M. niger*.

Se os crocodylomorpha apresentassem uma estabilidade morfológica nesse segmento do membro desde sua origem no Triássico, encontrar-se-ia apenas um distal do carpo ossificado no registro fóssil. Este elemento seria o distal do carpo 3+4+5 ou 4+5 como apresentado por Müller e Alberch (1990). Essa visão foi reforçada pela presença de apenas um distal do carpo no Crocodyliforme basal *Protosuchus richardsoni*, apesar de esse elemento ter sido identificado como sendo o produto da fusão dos distais do carpo 3+4 (Colbert e Mook, 1951). Formas ainda mais basais, como os Crocodylomorpha *Terrestrisuchus agilis* (Crush, 1984) e *Dibothrosuchus elaphros* (Wu e Chatterjee, 1993) também retêm apenas um distal do carpo, identificado também como sendo o distal do carpo 3+4.

A ocorrência de dois distais do carpo ossificados em *Orthosuchus stormbergi* (Nash, 1975) e em *Sichuanosuchus huidongensis* (Peng, 1995 *apud* Buscalioni *et al.*, 1997) foi sugerida como representando o distal do carpo 3+4 e o produto da fusão do distal do carpo 1 ao central do carpo, *Chimaerasuchus paradoxus* identificados como sendo o 1+2 e 3+4 (Wu e Sues, 1996) e *Junggarsuchus sloani* um crocodylomorpha basal situado como grupo-irmão dos Crocodyliformes, do Jurássico da China e *Notosuchus terrestris*, possui dois distais do carpo ossificados, não identificados (Clark *et al.*, 2004; Pol, 2005).

Os Atoposauridae e os Thalattosuchia, no entanto, possuem até três distais do carpo ossificados (Wellnhofer, 1971; Buscalioni *et al.*, 1997). Além desses, o *Sichuanosuchus shuhanensis* foi também descrito apresentando o mesmo número de distais do carpo ossificado identificados como sendo os distais do carpo 1+2, 3 e 4 (Wu *et al.*, 1997). Como consequência, observações desses distais do carpo nos fósseis desses crocodylomorpha, e à compreensão do desenvolvimento embrionário da mão dos Crocodylia viventes, tais como *A. mississippiensis*, *C. yacare* e *M. niger*, indicam que a ausência, pela não-formação, do distal do carpo 1 nos Crocodylia viventes pode ser estendida a outros Crocodyliformes; que a única fusão ocorrente entre os distais do carpo se dá entre os carpais 3, 4 e 5 e que o distal do carpo 2 mantém-se como elementos independentes ao longo da história evolutiva do grupo.

Além disso, ao observar a presença de dois ou três distais do carpo na filogenia dos Crocodyliformes, nota-se que há uma redução no número de distais do carpo ossificados. Desta maneira, a presença de três elementos ossificados, como ocorrente nos Atoposauridae e nos Thalattosuchia, pode representar a condição plesiomórfica para o grupo, e a presença de apenas um distal do carpo ossificado a condição apomórfica, originada por pedomorfose nos Crocodylia (Buscalioni *et al.*, 1997).

Já, no tarso proximal de *M. niger*, o intermédio+central e fibular apresentam discretos centros de ossificação, simultaneamente, no fim do estágio 24. Observação diferente foi registrada por Lima *et al.* (2011a) em *C. yacare*, e Müller e Alberch (1990) em *A. mississippiensis*, onde segundo esses autores o fibular apresenta centro de ossificação antes do intermédio+central. Já para Rieppel (1992, 1993a, 1994a,b), nos lacertília, o intermédio+central antecede o processo de ossificação em relação ao fibular.

No *M. niger* e demais Crocodylia viventes há três distais do tarso, cada um surge com condensação cartilágnea independente, denominados como Dt 2, 3 e 4, em referência aos dedos aos quais se articulam e à seqüência de sua formação (Brinkman, 1980; Müller e Alberch, 1990). Desses, apenas os distais do tarso 3 e 4 ossificam, assim como relatados por Müller e Alberch (1990) para *A. mississippiensis* e Lima et al. (2011a) para *C. yacare*. Enquanto o distal do tarso 2 mantém como um elemento cartilágneo diminuto, posicionado na base do metatarso 2 e em contato com o metatarso 1, mantido intimamente associado ao distal do tarso 3 na fase adulta de *M. niger* e *A. mississippiensis* (Müller e Abrech, 1990).

Apesar dos elementos do tarso proximal (intermédio+central e fibular) serem bem documentados no registro fóssil dos Crocodylomorpha, pouco se conhece sobre os distais do tarso, pois como ocorre com os distais do carpo, esses elementos são frouxamente articulados aos demais ossos dos pés e são facilmente transportáveis. Entretanto, a não-ossificação de ao menos um distal do tarso provavelmente representa a condição primitiva para os Crocodylomorpha, uma vez que *Terrestriisuchus*, *Orthosuchus* e *Geosaurus* preservam apenas os distais do tarso 3 e 4 (Romer, 1956; Naish, 1975; Crush, 1984), enquanto *Protosuchus* preserva apenas o distal do tarso 4 (Colbert e Mook, 1951).

Morfogênese cartilágnea e ossificação dos dedos

No *M. niger*, o desenvolvimento dos metapódios é semelhante entre si, com cada elemento aparecendo como uma pequena coluna cartilágnea. No entanto, não foi possível observar a seqüência de eventos descrita por Müller e Alberch (1990) para *A. mississippiensis*, onde os metacarpos aparecem como resultado de uma série de eventos de ramificação que acompanha o desenvolvimento do arco digital. As falanges individuais se formam como uma coluna extensa de condensação cartilágnea dos metacarpos e posteriormente sofrem segmentação. Infelizmente, não foi possível determinar a origem exata dos dedos em *M. niger*, pois estes tiveram um desenvolvimento muito rápido, apesar das amostras terem sido coletadas diariamente (Figs. 11, 18). Sugere-se que, para observações claras destes possíveis eventos, exigir-se-á análises precisas de muitos espécimes nos estágios em que esses episódios ocorrem e talvez com intervalos menores do que 24 horas.

Nos Crocodylia, incluindo nossa espécie em estudo, desenvolvem-se cinco dedos nas mãos, e todos permanecem na vida adulta desses animais. No entanto, em alguns grupos Archosauria os dedos I e V representam uma estrutura transitória, claramente visível em determinados estágios. Holmgren (1955) já havia relatado o primórdio do metacarpo 1 em embriões de *Struthio camelus* e *Larus fuscus*. Recentemente, Kundrát (2009) confirmou novamente a presença do dedo I em *Struthio camelus*, depois de formado, essa estrutura rapidamente degenera, com duração de apenas dois dias. Segundo o autor, essa informação, representa apoio à evidência de membros pentadáctilos nessa ave, mesmo que passageiro.

Em relação ao desenvolvimento do dedo V, já houve muito questionamento, em vários táxons sobre a sua origem e, principalmente, se pertence ao arco digital. Por exemplo, Burke e Alberch (1985), Shubin e Alberch (1986), Burke e Feduccia (1997), Sanchez-Villagra et al. (2008b), informaram não encontrar nenhuma ligação entre o dedo V e eixo primário e/ou arco digital em membros de tetrápodes, aludiram ainda que o dedo V pode ser formado por uma nova condensação. Em Testudines, a conectividade entre o distal do carpo 5 e o distal do carpo 4 já foi interpretada em fases iniciais do desenvolvimento embrionário em *C.mydas* por Sanchez-Villagra et al. (2007). Já foi sugerido por outros autores que o dedo V possa surgir como uma condensação do arco digital e/ou ulnar do carpo em anuros (Fabrezi e Barg, 2001), lagartos (Fabrezi et al., 2007) e Testudines (Sanchez-Villagra et al., 2008b). No entanto, este fato não apresenta confirmação em *M. niger* e *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990), uma vez que não foi observado qualquer conexão cartilaginosa do dedo V com o ulnar do carpo e elementos do arco digital.

No que diz respeito à homologia dos dedos, incluindo o dedo V, Fabrezi et al., (2009), inferiram que essa homologia é apoiada no padrão semelhante de desenvolvimento dos dedos; pelo tempo em que o dedo V aparece, ou seja, após condensação do eixo primário e antes dos dedos II e I e por fim as relações semelhantes entre o distal do carpo e o correspondente dedo no arco digital.

Conforme os resultados apresentados neste estudo para *M. niger* e demais amniotas, essas informações são coerentes, exceto quanto ao tempo de formação do dedo V, este não ocorre antes dos dedos I e II, como descrita acima, essa ressalva é válida para *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990), para os Testudines *Pelodiscus sinensis* (Sánchez-Villagra, 2009) e *C. mydas* (Sanchez-Villagra et al., 2007) e para o

Caudata *Triturus marmoratus* (Blanco e Alberch, 1992). Nesta última espécie, o desenvolvimento dos dedos ocorre de forma seqüencial; ou seja, cada dedo completa a condrogênese de todas as falanges antes do próximo dedo começar a desenvolver-se, essa seqüência começa no dedo I e termina no dedo IV. Segundo Blanco e Alberch (1992), esta seqüência parece ser um padrão geral no desenvolvimento dos membros dos Caudatas. Em *M. niger*, não existe essa regra seqüencial, os dedos I, II e III começam simultaneamente seguidos pelos dedos IV e V, no entanto o dedo IV é o último a terminar seu processo de condrogênese, esse padrão difere do Squamata *Paroedura picta*, onde o dedo IV aparece primeiro, em seguida, o dedo V surge posterior ao eixo primário, e os dedos III, II e I formam em uma seqüência posterior para anterior (Noro et al., 2009).

De acordo com as observações pontuadas acima, nos tetrápodes as estruturas fundamentais dos membros pentadáctilos são basicamente as mesmas; isso indica que eles originaram-se de um ancestral comum, mas durante o curso da evolução, estas estruturas foram se modificando. Tornaram-se estruturas superficialmente diferentes e aparentemente não relacionadas, que servem a diferentes funções devido a adaptação a diferentes ambientes e modos de vida.

Nos pés dos Crocodylia houve redução do quinto dedo. Em *M. niger*, à semelhança do *A. mississippiensis* e *C. yacare*, o metatarso V é o único elemento do dedo 5 (Müller e Alberch, 1990; Lima et al., 2011a). Essa alteração morfológica já havia sido mencionada em estudos de Parrish (1987). Segundo este autor, o metatarso V ainda sofreu drástica redução em relação aos demais metatarsos. O esqueleto dos pés de *Hesperosuchus* foi reconstituído por Colbert (1952), que em suas descrições relata a presença de um metatarso V robusto, com comprimento equivalente aos demais metatarsos, e portando quatro falanges. No entanto, em *Terrestriisuchus* o metatarso V, já se apresentava com metade da extensão dos demais metatarsos e portando apenas duas falanges diminutas (Crush, 1984). *Orthosuchus* e *Protosuchus* (ambos presentes no início do jurássico) e todos os demais Crocodyliformes, incluindo *M. niger*, *A. mississippiensis*, *C. yacare* e outras formas viventes, reduziram drasticamente o quinto dedo do pé a um pequeno metatarso sem falanges, possuindo então apenas quatro metatarsos funcionais no pé, sendo esse caracter uma sinapomorfia (Parrish, 1987; Müller e Alberch, 1990).

Quanto ao processo de ossificação dessa região dos membros, os metapódios de várias espécies de Testudines ossificam antes de qualquer outro elemento do autopódio e falange, essa informação é válida tanto para as mãos quanto para os pés, com exceção dos Chelydridae, *C. serpentina* e *M. temminckii*, onde a falange distal de vários dedos ossifica antes ou simultaneamente com os metapódios. Em conformidade com esses Chelydridae; em *M. niger* e *C. yacare* os metacarpos 1 a 3 apresentam centros de ossificação seguida pelas falanges distais dos dedos 1 e 2 e só depois os metacarpos 4 e 5 apresentam retenção do corante alizarina, seguindo o sentido ântero-posterior.

Os metacarpos 2-4 apresentaram os maiores graus de ossificação, sugerindo sua posição dominante no início da evolução da ossificação observado em todos os Testudines estudados (Rieppel, 1993a; Sheil e Greenbaum, 2005; Sanchez-Villagra et al., 2007). O metacarpo 3 em média ossifica primeiro e freqüentemente mostra maior grau de ossificação do que o dedo IV. É interessante verificar que os elementos do dedo III ossificam antes do dedo IV, apesar desse último ser o primeiro a formar durante a condrogênese em ambas as mãos e pés. Em *M. niger* concordamos no que diz respeito a ossificação do dedo III que também é visto em *C. yacare* (Lima, 2011a). No entanto, no início do desenvolvimento condrogênico o dedo IV segue quase simultâneo com os dedos I a III, e é o último a terminar o processo de condrogênese, isso ocorre talvez por esse dedo ter mais falanges do que o demais.

Após o aparecimento de centros de ossificação dos metapódios, as falanges começam a desenvolver o processo de ossificação. Em relação ao grau de ossificação das falanges de *M. niger*, a tendência geral foi conduzida no sentido ântero-posterior, ou seja, começa no dedo I e finaliza nos dedos IV (pés) e dedo V (mãos), apresentou também um sentido disto-proximal no dedo I (pés e mãos), próximo-distal nos dedos IV e V (mãos), IV (pés) e os dedos II e III não seguiram nenhum desses dois últimos sentido, começando nos dedos distais depois falanges proximais e por último nas falanges entre elas. A presença de mais de uma tendência de ossificação entre os dedos é compartilhada com outros táxons.

Fórmula falângica

A fórmula falângica dos dedos das mãos de Crocodylia, nas formas viventes tem tradicionalmente sido reconhecido como 2:3:4:4:3 (Reese, 1915; Gegenbaur, 1864; Romer, 1956). Segundo Riff (2007), é difícil definir o número de falanges nos dedos das espécies ancestrais, uma vez que, poucos fósseis preservam sua fórmula falângica completa. Nos Crocodylomorpha basais como *Terrestrisuchus* apresentam, assim como nos Crocodylia viventes, três e quatro falanges nos dedos II e III, respectivamente e ao menos três falanges nos dedos IV e V que, como o dedo I, não estavam preservados integralmente (Crush, 1984). Segundo Müller e Alberch (1990), se incluir as falanges que se mantêm cartiláginea no espécime adulto de *A. mississippiensis* obterá outra fórmula falângica, 2:3:4:5:4. Esses autores consideraram essa fórmula a correta para demais Crocodylia. Nossos dados não corroboram a proposta de que existe uma fórmula falângica única para Crocodylia. Em *M. niger*, após surgimento e fusões de falanges distais dos dedos IV e V a fórmula falângica no adulto, incluindo as falanges que não se ossificam é 2:3:4:4:2. Desta maneira, o número de falanges observado no final do período embrionário é o mesmo do adulto.

Outra consequência da ausência de ossificação nas extremidades das falanges IV e V em *M. niger* e nas demais formas recentes, é a presença da última falange em forma de garra apenas nos dedos I, II e III (Müller e Alberch, 1990), assim como nos Atoposauridae (Wellnhofer, 1971), *Uberabasuchus* (Vasconcellos et al., 2004) e *Stratiotosuchus* (Riff, 2007), sugerindo ser esta a condição plesiomórfica para os Crocodyliiformes.

Em relação ao pé, a fórmula falângica apresentada no *M. niger* e demais Crocodylia viventes é 2:3:4:5:0, incluindo as falanges distais em forma de garra e presentes apenas nos dedos I-III, sendo que a diminuta falange distal do dedo IV mantêm-se cartiláginea no adulto e as demais se ossificam completamente, esse mesmo padrão foi observado por Müller e Alberch (1990) em *A. mississippiensis*. Para Riff (2007), considerando o material preservado de *Stratiotosuchus*, destaca-se ossificação na falange 5 do dedo IV. Esta falange é representada neste táxon apenas por sua porção mais proximal, articulada à falange 4 do dedo IV. Apesar de não estar completa, a falange 5-IV é seguramente a menor falange do pé. Ainda segundo esse autor, não há

evidências, portando, de que a fórmula falângica do pé do Crocodyliforme *Stratiotosuchus* seja distinta do ocorrente nos Crocodylia viventes que, assim como para os dedos das mãos, mantêm a fórmula falângica plesiomórfica dos Crocodylomorpha, considerando-se apenas os dedos I-IV, havendo alterações apenas no dedo V, reduzido e sem falanges.

Dentre as poucas formas fósseis cuja fórmula falângica é conhecida, o número de falanges dos dedos I-IV destas é o mesmo dos Crocodylia viventes, se apenas os elementos ossificados forem considerados, no ancestral *Terrestrisuchus* sendo de 2:3:4:4:2, que ainda mantêm o quinto dedo funcional (Crush, 1984), 2:3:4:4:0 em *Protosuchus* (Colbert e Mook, 1951), com todos estes possuindo falanges distais em forma de garra apenas nos dedos I-III. Para Burke e Feduccia (1997), a variação da fórmula falângica é comum entre táxons e a perda de dedos pode acontecer, com maior frequência nos dedos I e V, isto já foi visto em anfíbios, mamíferos, lagartos, aves e Testudines (Alberch e Gale, 1985), *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990) e, agora, em *M. niger*. É interessante ressaltar que a inclusão de informações de caracteres fósseis e desenvolvimento embrionário dos membros são importantes para compreensão da evolução.

4.2.2 CRÂNIO

4.2.2.1 RESULTADOS

Descrição anatômica do esqueleto adulto

Pré-maxila: É um osso par, com formato triangular em vista dorsal. Juntamente com o seu contralateral forma a extremidade rostral do focinho onde demarca o contorno da narina. Na região caudal da narina, observa-se um pequeno processo em forma de “V” invertido projetando-se cranialmente, mas não o suficiente para dividir a narina, este processo é formado pelos ossos pré-maxila e nasal (Fig. 22).

A pré-maxila contata caudolateralmente com a maxila e caudomedialmente com os ossos nasais. Ventromedialmente articula-se com o seu contralateral apenas na porção caudal, visto que, rostralmente estes ossos são separados pelo forame pré-maxilar. Cada pré-maxila sustenta cinco dentes, o quarto é o maior deles e os dois primeiros os menores. Ainda na superfície ventral, há uma série de pequenos forames em linha paralela a margem externa curvada do osso. Entre esses pequenos forames e a base de inserção alveolar dos dentes há quatro depressões arredondadas para alojar os quatro primeiros dentes da mandíbula. A quarta depressão torna-se profunda e pode até perfurar a pré-maxila, expondo o ápice do dente durante o processo de oclusão.

Maxila: É um osso largo que forma grande parte do focinho caudolateral e sustenta a maioria dos dentes, 13 processos alveolares. Sua superfície dorsal apresenta forma de trapézio com projeção ventrocaudal relativamente longa e afilada, onde faz contato com o osso jugal, por meio de um processo que se ajusta em cunha. Ainda na superfície dorsal articula com a pré-maxila rostralmente; com o nasal medialmente e lacrimal caudalmente.

A face ventral da maxila é formada, principalmente, pelo processo palatino, este se apresenta plano e articula-se com o seu contralateral medialmente, exceto na porção rostromedial onde eles são separados pelo osso vômer e na porção caudomedial pelo osso palatino. Na região caudolateral a maxila articula-se obliquamente com o ectopterigóide. A maxila ainda contribui com grande parte do contorno lateral e rostral da fenestra palatina. O rostro ventral da maxila articula com a pré-maxila contribuindo com a formação do focinho. Paralelo aos dentes há um serie de pequenos forames, a continuação daqueles observados na pré-maxila. Acompanhando-os há algumas escavações circulares, sendo mais proeminentes entre os dentes 10 e 12, acomodam os

dentos da mandíbula ao ocluir. Destacados dos demais estão um par de forames localizados caudomedialmente, os forames palatinos caudais (Fig. 22).

Nasal: São ossos pares, longos com largura variável longitudinalmente, sendo mais afilados rostralmente formando um triângulo quando articulado medialmente com o seu contralateral e contribui com grande parte do teto da passagem nasal. Sua porção caudal estende-se até o osso frontal, com o qual se articula; caudolateral com o pré-frontal e lacrimal, lateralmente articula-se com a maxila. Alcançam sua máxima largura à frente dos pré-frontais, frontal e lacrimal, onde emitem um processo caudomedial que se acunha entre o pré-frontal e o frontal.

Rostralmente articula-se com a pré-maxila, na sua extremidade rostral estreitam abruptamente e forma uma projeção afilada em forma de “V” invertido que se estende até a narina, com contribuição das pré-maxilas (Fig. 22).

Lacrimal: São ossos que formam a margem rostral das órbitas, orientando-se verticalmente. Contata amplamente a maxila rostralmente e com os ossos nasal e pré-frontal medialmente. Dorsolateralmente sua superfície apresenta um sulco que segue até a maxila, formando uma crista medialmente que termina na abertura do forame lacrimal no interior da órbita. Este forame estende-se longitudinalmente através do osso lacrimal e abre em uma câmara nasal conectando a órbita à cavidade nasal. Lateralmente ao sulco, o osso lacrimal lança uma espícula que se articula com o jugal (Fig. 22).

Pré-frontal : É um osso alongado, com formato de losango, onde apresenta uma crista proeminente que forma duas depressões, rostral e caudal. Medialmente contata com o osso frontal, rostromedial com o osso nasal e lateralmente com o osso lacrimal. Contribui com a formação da órbita com uma pequena borda ligeiramente mediolateral. Ventralmente se articula com os processos palatino e pterigóide através de uma coluna descendente, o pilar pré-frontal. Estes pilares não se contatam medialmente, apenas emitem uma projeção medial de suas margens internas que delimitam dois espaços, um dorsal menor arredondado, e outro ventral maior e triangular, interligados por uma estreita passagem (Fig. 22).

Frontal: Os frontais estão fundidos e não há qualquer sinal de sutura inter-frontal. Este osso toma um aspecto de ponta de lança rostralmente, acunhando-se entre os ossos nasais e articula largamente com os pré-frontais na sua face rostromedial. Suas bordas laterais possuem uma crista arredondada que delimita, juntamente com o osso pré-frontal, a margem medial da órbita. Caudalmente alcançam sua máxima largura à frente

dos ossos parietal e pós-orbital com os quais se articulam, ocupando a maior parte da área do teto craniano acima das órbitas.

Ventralmente, a porção caudal do frontal contata com o laterosfenóide. Ainda na face ventral, o processo rostral do frontal posiciona-se sob a porção mais caudal dos pré-frontais, colocando-se acima dos pilares pré-frontais. Entre os pré-frontais e o laterosfenóide, há um profundo sulco, bordeado pelas *cristae cranii frontales*, que aloja o trato olfatório. O osso apresenta uma depressão dorsal limitada pelas cristas orbitais, que, juntamente com o sulco do trato olfatório, lhe confere a forma de “H” em um corte transversal (Figs. 22, 23).

Parietal: Os parietais também fundem-se numa peça única, tal como ocorre com os frontais. Rostralmente, em sua extremidade mais ampla, articula com o frontal e os pós-orbitais rostrolateralmente. Na porção caudal ele estabelece contato com o osso supra-occipital, haja vista que este se encaixa rostralmente com uma projeção do osso parietal.

Na porção média do parietal evidencia-se um estreitamento, superfície interfenestral, essa região contribui para a formação das bordas mediais das fenestras supra-temporais. Ao longo da parede interna dessas fenestras, o parietal contata ventralmente, com os laterosfenóides e os quadrados e com o esquamosal caudolateralmente. O canal para a artéria temporo-orbital se abre na fenestra entre os ossos parietal e esquamosal (Fig. 22).

Esquamosal: O esquamosal é um osso par localizado na porção caudolateral do crânio, ligeiramente plano com superfície irregular, apresentando uma pequena elevação na interseção entre as bordas medial e caudal. Expande-se lateralmente e curva em uma leve declividade que contorna a região caudal do ouvido médio, formando uma depressão que contata lateralmente com os ossos quadrados. rostralmente delimita uma pequena borda da fenestra supra-temporal.

Em vista dorsal, o esquamosal contata medialmente com o parietal, caudomedial com o supra-occipital e rostralmente com o pós-orbital. Em vista caudal este osso se articula amplamente com o exoccipital (Fig. 22).

Pós-orbital: Os pós-orbitais contribuem com a formação da fenestra supra-temporal delimitando a porção rostral e lateral desta. Rostralmente é retangular e expandido caudalmente. Em vista dorsal, articula-se medialmente com o parietal e na sua margem rostromedial contata a margem caudal do frontal, além de contribuir com uma pequena borda caudal da órbita. Ventralmente, adjacente à sutura com o parietal, o pós-orbital

recebe a margem rostródorsal do lateroesfenóide. Da margem rostrolateral do pós-orbital, prolonga-se e forma o processo descendente rostral ou coluna pós-orbital (*columnae postorbitales*), sendo ligeiramente largo lateromedialmente e inclinado. Este se estende até o processo ascendente do jugal e separa a órbita da fenestra temporal inferior. Há também um pequeno processo descendente caudal. Esse processo estende-se caudoventralmente bordeando uma pequena porção dorsal do quadradojugal, e contribui para a formação da porção dorsal da margem caudal da fenestra temporal inferior (Fig. 22).

Jugal: É um osso alongado que forma parte da borda lateral do crânio e medialmente forma grande parte da borda lateral da órbita. Rostralmente articula-se com a maxila, lacrimal e mais lateralmente com o ectopterigóide. Na segunda metade caudal é delgado, alonga-se e projeta uma espícula que se articula com o osso quadradojugal. Esta projeção contribui para a formação da parede lateral da fenestra temporal inferior. Medialmente ele emite o delgado e pontiagudo processo jugal ascendente. Este se articula obliquamente com o processo descendente rostral do pós-orbital, formando a porção lateral inferior da coluna pós-orbital, que recebe ainda uma pequena contribuição, em sua base, do osso ectopterigóide (Fig. 22).

Quadradojugal: É um pequeno osso cunhado entre o jugal e o quadrado caudalmente, chegando a contatar a superfície rostroventral do pós-orbital. Ele articula-se com a margem caudal do jugal e com a margem rostral do quadrado. Sua face rostromedial delimita a extremidade caudolateral da fenestra temporal inferior, avança rostralmente nesta margem através da projeção de um delgado estriamento, espinha quadradojugal, processo que finda na articulação do pós-orbital com o quadrado. Em sua margem ventral, o quadradojugal forma um sulco que termina no canto caudal da fenestra temporal inferior (Fig. 22).

Quadrado: Apresenta-se convexo e bastante alongado caudolateralmente. Dorsalmente forma a maior parte do assoalho do meato acústico externo. Rostrolateral articula-se amplamente com o quadradojugal, de maneira que o quadrado não participa da margem caudal da fenestra temporal inferior, sendo então isolado desta pelo quadradojugal. Em sua superfície lateral, o quadrado possui uma profunda e ampla convexidade oblonga que se estende dorsalmente até a margem laterocaudal do pós-orbital.

Caudolateralmente, o osso quadrado articula-se com o processo paraoccipital, contato que também é nítido na vista occipital. Ainda nesta vista, o quadrado articula

com o exoccipital e numa posição mais ventral com o basisfenóide. Na superfície dorsal na margem caudal o osso quadrado mantém íntimo contato com o esquamosal. Na porção ventral, observa-se o processo pterigóide do quadrado, este é robusto e estriado e contata o pterigóide. Na região dorsal e rostral, o quadrado contata, também fortemente, com o laterosfenóide e o pós-orbital. O quadrado projeta-se ventrocaudalmente e apresenta os seus côndilos mandibulares numa posição além do nível do côndilo occipital. Os côndilos mandibulares são separados entre si por uma reentrância em sua margem ventral (Fig. 22).

Ectopterigóide: Possui forma oblonga, estende-se ventralmente da maxila e jugal ao pterigóide, afina-se progressivamente e termina em um ápice pontiagudo que se cunha na superfície ventrolateral do pterigóide. Rostralmente contribui com a formação da fenestra palatina, sem contatar o osso palatino o que permite uma pequena comunicação do pterigóide com esta fenestra. Ele se articula rostralmente com a maxila, e sua sutura termina na altura do antepenúltimo dente, continuando na direção caudal até contatar com o osso jugal, e pouco contribui para a formação da base da coluna pós-orbital (Fig. 23).

Palatino: É um osso par que está compreendido, em quase toda sua extensão, entre as fenestras palatinas, formando a parede medial destas. São alongados e possuem extremidade rostral arredondada e a caudal sinuosa. Em vista ventral formam uma barra plana entre o pterigóide e a maxila, apresentando-se mais estreita entre as fenestras palatinas. São unidos com o seu contralateral por uma sutura mediana bem marcada e reta e forma parte considerável do assoalho da passagem nasal (Fig. 23).

Vômer: É um pequeno osso com formato de losango, onde se apresenta mais estreito e afilado na margem caudal, une-se medialmente com o seu contralateral e torna-se mais largo na porção mais rostral, contribui na formação do palato e está posicionado entre as pré-maxilas e os palatinos (Fig. 22).

Laterosfenóide: Os laterosfenóides correspondem a porção rostroventral do crânio. Contatam o frontal dorsalmente com forte sutura e ainda nessa porção, os laterosfenóides se projetam rostralmente e se articulam com o seu contralateral, delimitando um orifício dorsal por onde passa o trato olfatório. Látero-ventralmente forma uma coluna descendente que margeia a borda rostral do forame oval do nervo V (trigêmeo). Rostral a essa coluna, está uma segunda coluna laminar que juntas formam o forame lácer, e articula-se, por uma pequena porção de suas extremidades ventrais,

com os pterigóides. Dorsocaudalmente contata com o parietal e o quadrado. Projeta ainda um processo dorsal que contata o pós-orbital (Figs. 30F, 34E). No crânio adulto estas estruturas não foram mostradas por serem internas e de difícil visualização.

Pterigóide: São ossos com superfície ventral relativamente lisa. A sutura com seu contralateral é contínua e retilínea, finda na abertura rostral da coana e na margem caudal os pterigóides se fundem. A coana é dividida por um delgado septo ósseo vertical em coana direita e esquerda. Lateralmente apresenta uma forte saliência e superfície rugosa. Esta tem início na altura da base do ectopterigóide e se estende por dois terços ao longo de seu comprimento. Rostralmente o pterigóide articula-se com os palatinos, rostrolateral com os ectopterigóides, caudal com o basisfenóide e dorsomedial com os lateresfenóide e o quadrado. A porção caudolateral do pterigóide apresenta uma projeção laminar, os processos transversos, ou asas laterais do pterigóide. Rostralmente, no assoalho da passagem nasal emite os processos palatinos do pterigóide que articula-se em forte sutura com os palatinos (Figs. 22, 23, 24).

Supraoccipital: O supraoccipital é bem visível, tanto em vista caudal quanto dorsal. Nesta vista ocupa uma porção da margem caudomedial do crânio bem curta, no entanto, mais expandida latero-lateralmente. Suas margens laterais contatam os esquamosais e sua margem rostral articula com o parietal, onde recebe deste uma projeção que adentra a superfície medial.

Em vista caudal, articula-se com o exoccipital ventralmente, onde emite uma curta projeção arredondada que adentra na porção medial do exoccipital, mas não o suficiente para alcançar o forame magno. Ainda nesta vista, é possível observar uma expansão do supraoccipital que forma o processo lateral, este se estende e aproxima do esquamosal. Bordeia a abertura caudal da fenestra temporal superior.

Uma crista estende-se ventromedialmente até a margem dorsal do supraoccipital, onde forma uma leve concavidade, lateral a essa crista forma-se uma depressão bilateral em ambos os lados, realçando as extremidades do processo lateral do supraoccipital (Figs. 22, 24).

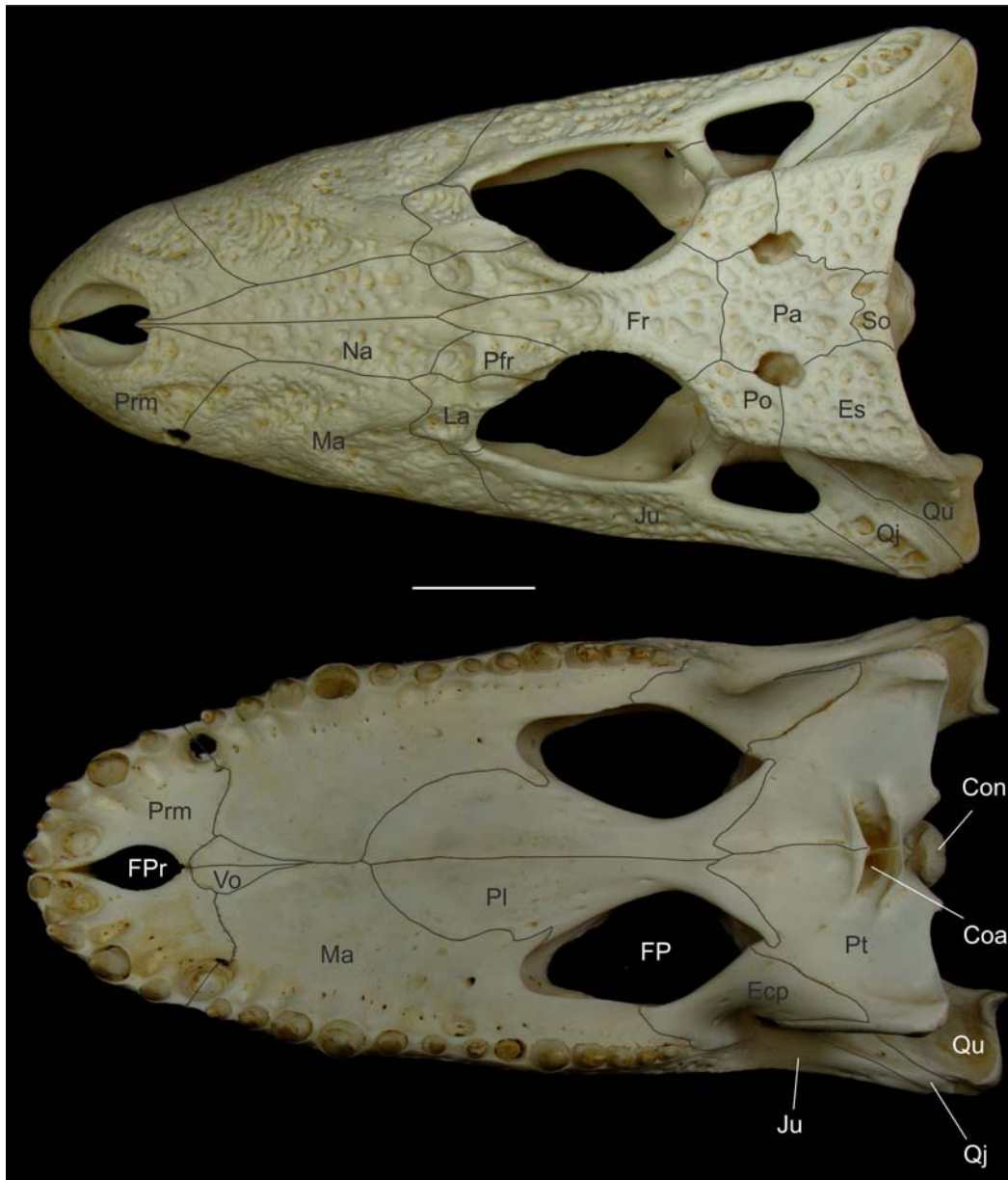


Figura 22: Vista ventral e dorsal do crânio de *Melanosuchus niger* adulto, com suturas demarcadas. Abreviaturas: Coa, coana; Com, côndilo; Ecp, ectopterigoide; Es, esquamosal; FPr, forame pré-maxilar; FP, forame palatino; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Ma, maxila; Na, nasal; Pa, parietal; Pfr, pré-frontal; Pl, palatino; Po, pós-orbital; Prm, pré-maxilar; Pt, pterigoide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; So, supraoccipital; Vo, vômer. Escala:50mm.

Exoccipital: São ossos pares que se articulam com o seu contralateral na margem medial. Na vista caudal se assemelha com um par de asas, com destaque para o processo paraoccipital na extremidade lateral. Este possui um leve enrugamento em sua porção lateral que provavelmente serve de local de inserção para músculos.

Os exoccipitais formam as bordas dorsais e parte das bordas laterais do forame magno e porta as aberturas do forame vagal, forame do hipoglossos e do forame caudal

da artéria carótida. Além de uma pequena contribuição na formação do côndilo occipital.

Lateralmente, eles se encaixam numa ampla superfície no terço laterocaudal dos esquamosais e estendem-se transversalmente. Na região de articulação com o seu contralateral evita o contato do supraoccipital com o forame magno. Ventralmente flexionam-se na margem rostral e se articulam com o basisfenóide e a porção ventral do osso quadrado (Fig. 24).

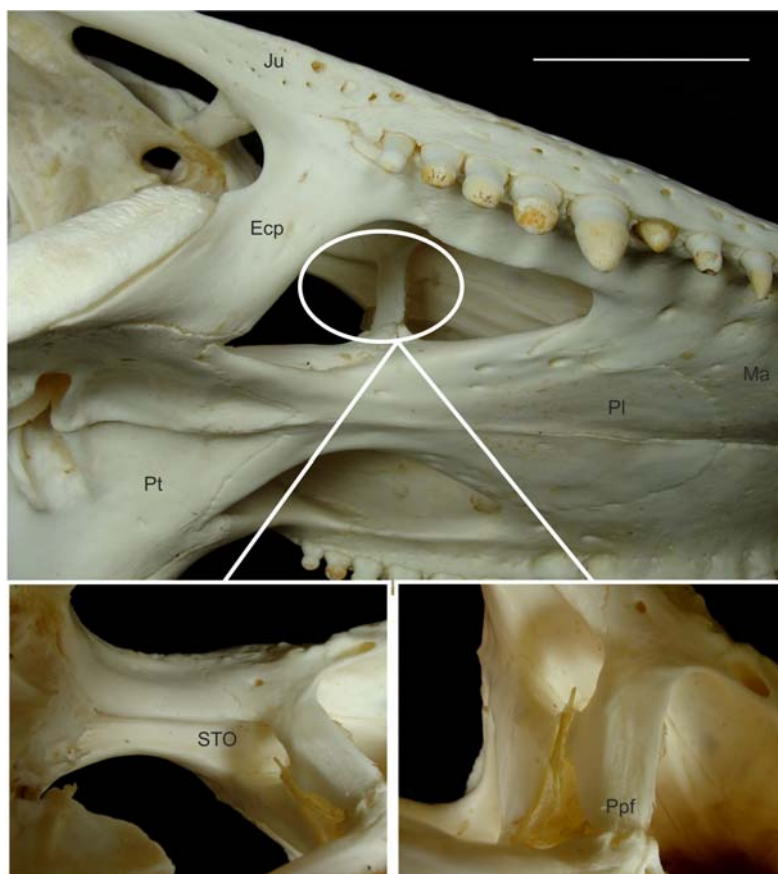


Figura 23: Vista lateroventral do crânio de *Melanosuchus niger* adulto. Abreviaturas: Ecp, ectopterigoide; Ju, jugal; Ma, maxila; Pl, palatino; Pt, pterigóide; Ppf, pilar pré-frontal; STO, sulco do trato olfatório. Escala: 50 mm.

Basioccipital: É visto na superfície caudal do crânio correspondendo ao côndilo occipital e a porção ventral a este. Consiste em uma porção dorsal que forma parte da parede ventral do forame magno, e forma a parte posterior da fossa da cavidade cerebral. Dorsolateralmente o basioccipital articula-se com o exoccipital por meio de uma sutura discreta, conferindo maior resistência, e ventralmente com o basisfenóide.

O côndilo occipital possui forma semi-esférica, sendo formado pelo basioccipital, e na porção dorsolateral, por uma pequena contribuição dos exoccipitais.

Na porção ventral do côndilo existe uma estreita tuberosidade que se estende ao longo da margem ventral e lateral da placa basioccipital que é demarcada lateralmente por duas cristas que findam próximo a sutura com o basisfenóide (Fig. 24).

Basisfenóide: Este osso articula-se com o quadrado, pterigóide e basioccipital. Na superfície dorsal do basisfenóide a fossa hipofisária é rasa e contribui para formar o assoalho da cavidade craniana. Este exhibe uma lâmina projetada rostralmente, o processo cultriforme, ou a porção rostral do basisfenóide, possui forma de cunha, alargada rostralmente, que se encaixa acima dos processos palatinos do pterigóide, formando uma espécie de septo ósseo nesta região (Fig. 24).

Mandíbula: Consiste de dois ramos similares, com os ângulos mandibulares reduzido, o que confere à mandíbula uma discreta curvatura ventral. A mandíbula está intimamente unida na sínfise mandibular com o seu contralateral. Cada metade da mandíbula consiste de seis ossos:

Dentário: É um osso que ocupa a porção rostral da mandíbula. Sua superfície palatal é levemente lisa, exceto nas bordas laterais que apresentam diversos forames pequenos dispostos longitudinalmente nesse osso. A borda lateral e a margem ventral são bastante porosas, possuindo sua margem dorsal retilínea afilada no sentido rostrocaudal.

O dentário se articula medialmente com o osso esplenial em uma articulação oblíqua e rostromedial com o seu contralateral. Na margem caudal articula com o suprangular em sutura dorsolateral e ventrolateralmente com o angular. Margeia ainda a porção rostral da fenestra mandibular externa (Figs. 25, 26).

Coronóide: É um osso pequeno, restrito a superfície medial da mandíbula. Possui um formato triangular com projeção expandida direcionada para a margem caudal. Articula-se com o esplenial rostralmente, com angular ventrocaudalmente e com o suprangular dorsocaudalmente (Figs. 25, 26).

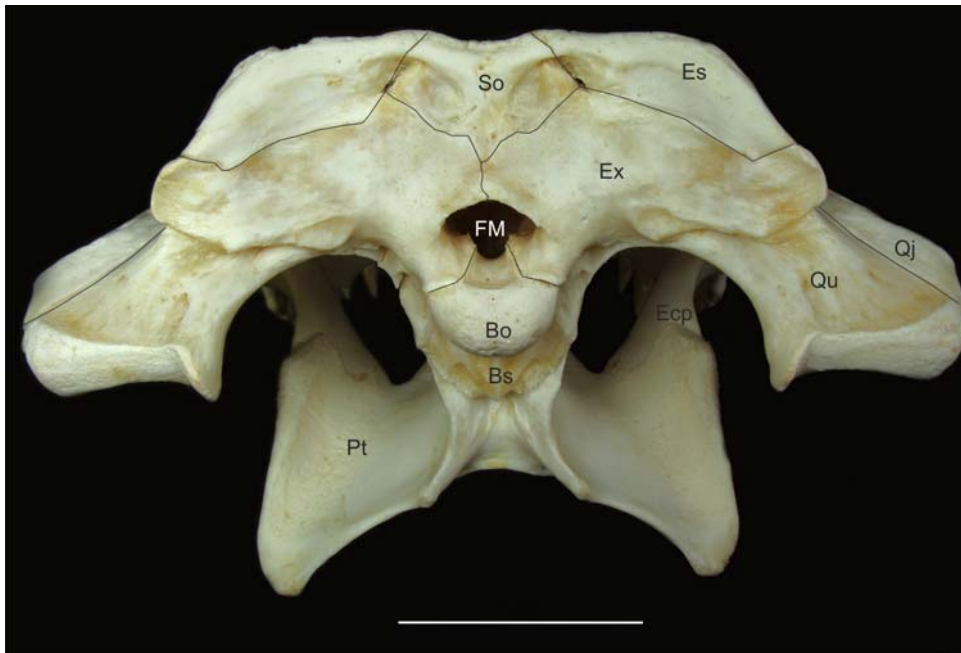


Figura 24: Vista caudal do crânio de *Melanosuchus niger* adulto, com suturas demarcadas. Abreviatur as: Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; Es, esquamosal; Ex, exoccipital; FM, forame magno; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; So, supraoccipital. Escala: 50 mm.

Esplênial: É um osso aplainado, alongado e pontiagudo rostralmente, com superfície medial lisa. Caudalmente articula-se com os ossos angular e suprangular e na borda medial com o coronóide. Seu contato com o dentário estende-se rostralmente de maneira retilínea junto a margem medial dos dentes, contribui para a formação dos alvéolos juntamente com o osso dentário (Figs. 25, 26).

Angular: É um osso longo e curvado ventralmente e forma o ângulo da mandíbula. Margeia caudoventralmente a borda da fenestra mandíbular externa onde se articula com o osso dentário e suprangular na porção rostral e dorsal, respectivamente.

Rostralmente acunha-se entre o dentário e o esplênial. Sua superfície lateral é fortemente porosa, exceto na sua porção caudal, onde este osso emite uma projeção que contribui para a formação do processo retroarticular. Atrás do canal mandibular existe uma fileira com dois ou três pequenos forames que se abrem ventralmente no ângulo da mandíbula. Medialmente, possui um contorno convexo e forma as margens ventral e caudal da fenestra mandíbular interna (Figs. 25, 26).

Suprangular: É um osso alongado, situado na porção dorsolateral da parte caudal da mandíbula, apresenta a porção rostromedial lisa com presença de alguns forames. Na porção caudal existe uma crista que delimita uma pequena área rugosa próxima a

articulação com o osso angular, com o qual articula-se até a extremidade caudal do processo retroarticular, por meio de uma projeção em forma de espícula alongada, que também contata com o osso articular. Margeia a porção dorsal da fenestra mandibular externa (Figs. 25, 26).

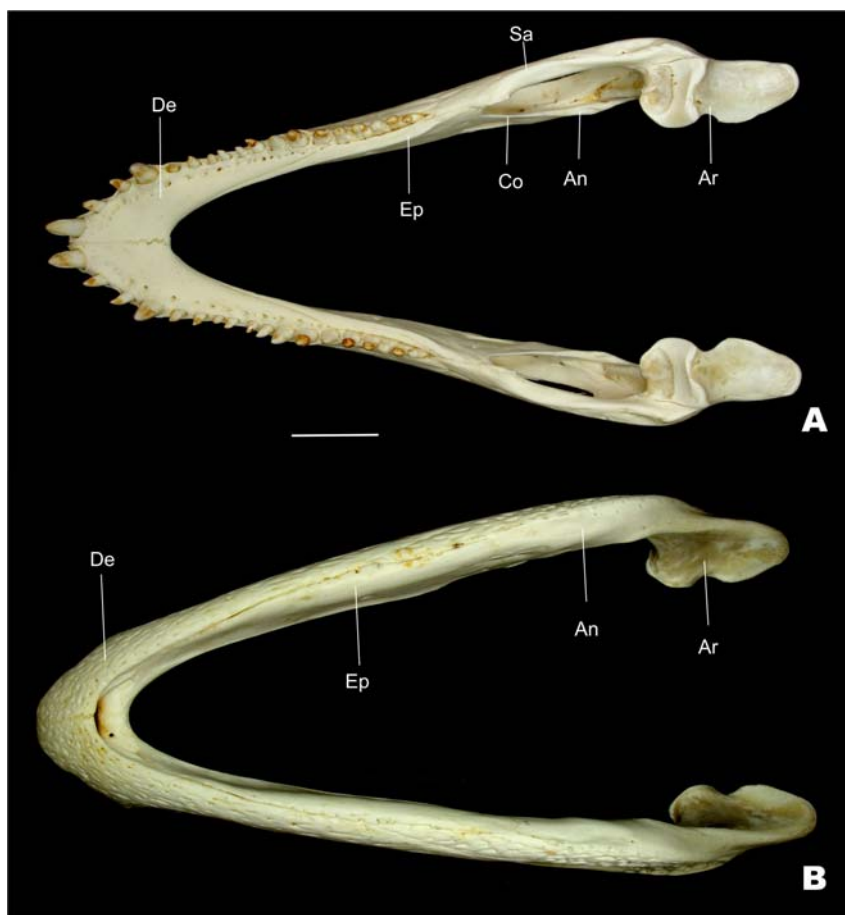


Figura 25: Vista dorsal (A) e ventral (B) da mandíbula de *Melanosuchus niger* adulto. Abreviaturas: An, angular; Ar, articular; Co, coronóide; De, dentário; Ep, esplênico; Sa, suprangular. Escala: 50 mm.

Articular: É um osso localizado na região mais caudal da superfície medial mandibular. Forma a grande maioria da superfície de articulação que recebe o côndilo do osso quadrado e uma crista transversa limita a fossa articular caudalmente. Uma proeminência divide a fossa articular em uma concavidade lateral e medial menor, correspondendo a convexidade lateral e medial do côndilo do osso quadrado. Na margem dorsolateral o articular contata com o suprangular, com o qual bordeia a fossa articular lateralmente. Possui um longo processo retroarticular, no qual mostra uma forte curvatura dorsal em uma borda medial convexa. Existe ainda um pequeno forame

na superfície dorsal, caudal a fossa articular. Rostrocaudal o osso articular emite outra projeção com o qual se articula com o angular medialmente, já na sua borda lateral articula-se com o suprangular (Figs. 25, 26)

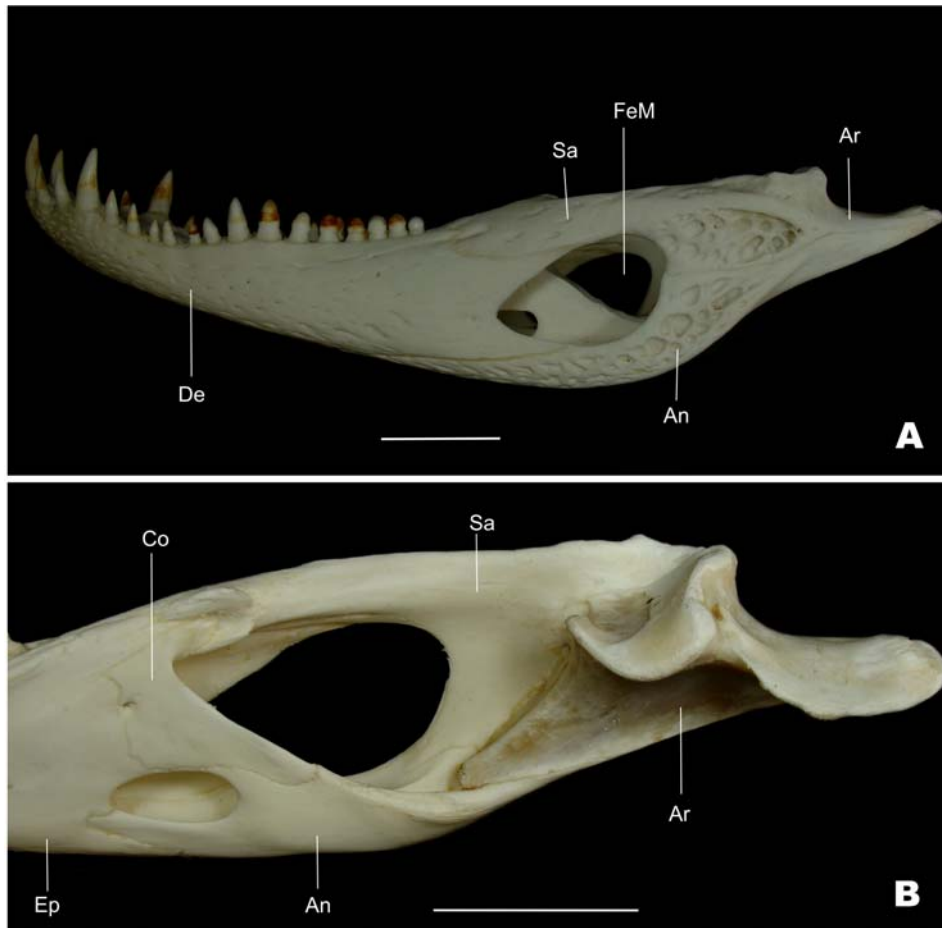


Figura 26: Vista lateral (A) e medial (B) da mandíbula de *Melanosuchus niger* adulto. Abreviaturas: An, angular; Ar, articular; Co, coronóide; De, dentário; Ep, esplênica; FeM, fenestra mandibular externa; Sa, suprangular. Escala: 50 mm.

Desenvolvimento do condrocânio

O condrocânio do *M. niger* é composto por três regiões: cápsula nasal, região órbito-temporal e região ótico-occipital. Cada região foi descrita em detalhes abaixo.

No estágio nove, o condrocânio apresenta-se longo com presença apenas de um par de trabéculas não fundidas, o qual é mais em sua porção caudal, que finda próximo a notocorda, na região órbito-temporal, onde é possível visualizar o primórdio da cartilagem acrocordal, que é perfurada pela notocorda e posicionada

dorsocaudalmente às trabéculas. O par de cartilagens de Meckel é bem evidente na porção ventral do condrocrânio (Figs. 27A,B).

No estágio 10, a região órbito-temporal é constituída pelo par de trabéculas, a trabécula comum, a cartilagem acrocordal, a pila metótica e a cartilagem quadrada (Figs. 27A, B, 29A). As trabéculas são duas colunas sinuosas mais definidas em sua porção caudal, as quais por sua vez contatam a margem ventrolateral da cartilagem acrocordal. Esta cartilagem se projeta dorsalmente e, a partir de sua porção média, emite outra projeção rostral, a pila metótica. Esta limitará as regiões órbito-temporal eótico-occipital. A porção occipital ou basal representa o primórdio do desenvolvimento da caixa craniana, embora, sem condrificações aparentes neste estágio. Em vista lateral, está presente o par de cartilagens quadrada, que nesta fase apresenta forma quadrangular. Dela projeta-se rostralmente a cartilagem pterigoquadrada (Fig. 27A, B). Neste estágio está também presente a cartilagem de Meckel na porção inferior ao crânio (Fig. 29A)

Com o início do desenvolvimento da cápsula nasal, no estágio 11, a porção rostral do condrocrânio agora é contínua com a região órbito-temporal. A cápsula nasal, nesse estágio, consiste na porção rostral da trabécula comum que forma o estreito septo internasal. A morfogênese da cartilagem da cápsula nasal é extremamente delgada e apresenta fraca retenção de corante azul de alcian. Desta projetam-se bilateralmente um arco que forma o teto nasal. Já a cartilagem quadrada ocupa uma grande porção da área laterocaudal (Figs. 27C, 29A).

No estágio 12, a cápsula nasal, como as demais estruturas do condrocrânio, apresenta uma extensa área cartilágnea. Medialmente essa cápsula é separada quase completamente pelo septo internasal, que caudalmente se une ao septo interorbital, já formado neste estágio com a redução da trabécula comum. A cartilagem parietotectal é visualizada como uma condensação na porção dorsorostral da cápsula nasal, embora, não esteja presente na parede lateral da cápsula, a qual ainda permanece aberta. Neste estágio, as conchas nasais estão presentes na cavidade bem como a cartilagem paranasal, esta forma a porção caudal da cápsula nasal junto com o plano anterorbital (Fig. 27D, E, F, 29D, E).

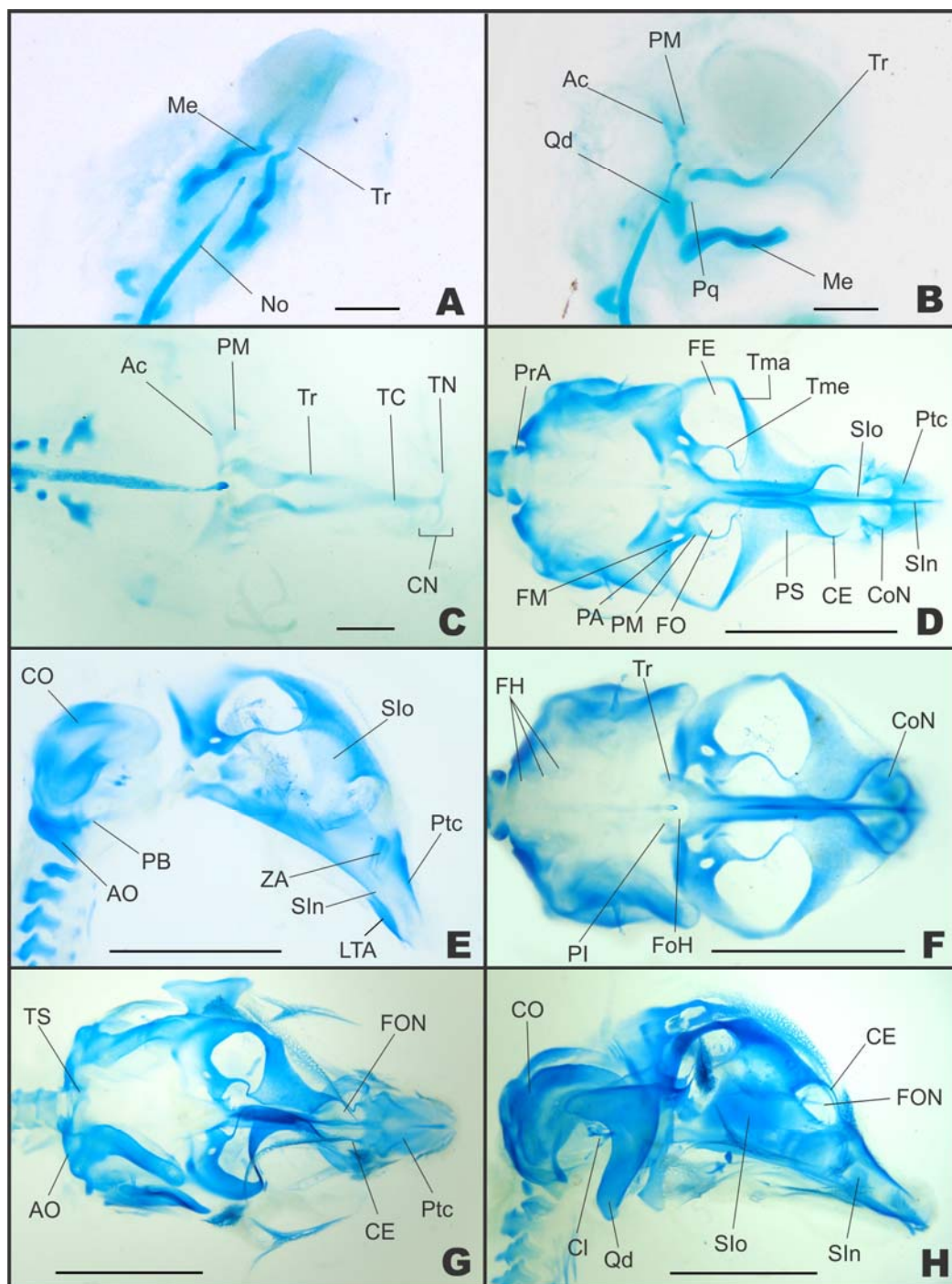


Figura 27: Condrocrânio de *Melanosuchus niger*. (A) vista ventral, estágio 10; (B) vista lateral, estágio 10; (C) vista ventral, estágio 11; (D) vista dorsal, estágio 12; (E) vista lateral, estágio 12; (F) vista ventral, estágio 12; (G) vista dorsal, estágio 14; (H) vista lateral, estágio 14. Abreviaturas: Ac, cartilagem acrocordal; AO, arco occipital; CE, comissura esfenometóide; CN, cápsula nasal; Cl, columela; CO, cápsula ótica; CoN, concha nasal; FE, fenestra epiótica; FH, forame hipoglossal; FM, fenestra metótica; FO, Fenestra ótica; FoH, fossa hipofisária; FON, fenestra orbitonasal; LTA, Lâmina transversa anterior; Me, cartilagem de meckel; No, notocorda; PA, pila antótica; PB, plano basal; PI, processo infrapolar; PM, pila metótica; Pq, cartilagem pterigoquadrada; PrA, proatlas; PS, plano suprasedal; Ptc, cartilagem parietotectal; Qd, cartilagem quadrada; SIn, septo internasal; Slo, septo interorbital; TC, trabécula comum; Tma, tência marginal; Tme, tência medial; TN, teto nasal; Tr, trabécula; TS, teto sinótico; ZA, zona anular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina e cartilagem com azul de alcian. Escalas: A, B e C 2 mm; D, E, F, G e H 5 mm.

O plano suprasedal está bem visível e projeta-se dorsolateralmente de onde avança e dá origem as ténias marginais, conectada com a pila antótica e, as ténias mediais, conectadas com a pila metótica. Entre as pilas metótica e antótica se forma a fenestra metótica. Rostralmente o condrocânio possui uma comissura esfenotimóide, que corresponde a uma pequena projeção da cartilagem do plano suprasedal e não se une, neste estágio, a cartilagem parietotectal (Fig. 27D).

Ainda no estágio 21, as trabéculas se resumem a uma pequena porção caudal ao septo interorbital em formato de “U”, delimitando as paredes laterais da fossa hipofisária, que ainda é incompleta devido a ausência da crista selar, na parede caudal. As trabéculas se projetam caudalmente a fossa hipofisária dando origem ao processo infrapolar (Fig. 29E). As fenestras óptica e epióptica são bem delimitadas, principalmente pelas ténias marginais e mediais (Fig. 27D, F).

Na vista dorsal, a região ótico-occipital se desenvolve até este momento sem conexão com as demais regiões. A notocorda não mais se cora com azul de alcian, mas ela pode ser visualizada de maneira discreta perfurando a estrutura do cndilo occipital se dirigindo até a fenestra hipofisária. Existe um pequeno proatlas livre. Apenas a porção lateral da placa basal é evidenciada pelo corante, permanecendo a região mediana indefinida. Estão presentes os forames para o nervo hipoglosso. Na porção mais caudal, levemente direcionado ventralmente, o arco occipital está presente, ainda como duas estruturas individualizadas e laterais ao eixo da coluna vertebral (Fig. 27E).

A cápsula ótica é contínua com a margem lateral do arco occipital, mas na porção ventral é livre, uma vez que a totalidade da placa basal não é distinta nesta fase. As barras da cartilagem de Meckel estão fundidas rostralmente, e caudalmente existe uma projeção dorsal que corresponde com o processo retroarticular. Deste, estende-se dorsalmente a columela, em direção a cavidade timpânica, adjacente à cartilagem quadrada, que por sua vez, está bem formada e com sua anatomia definida (Figs. 27E, 28, 29D, E).

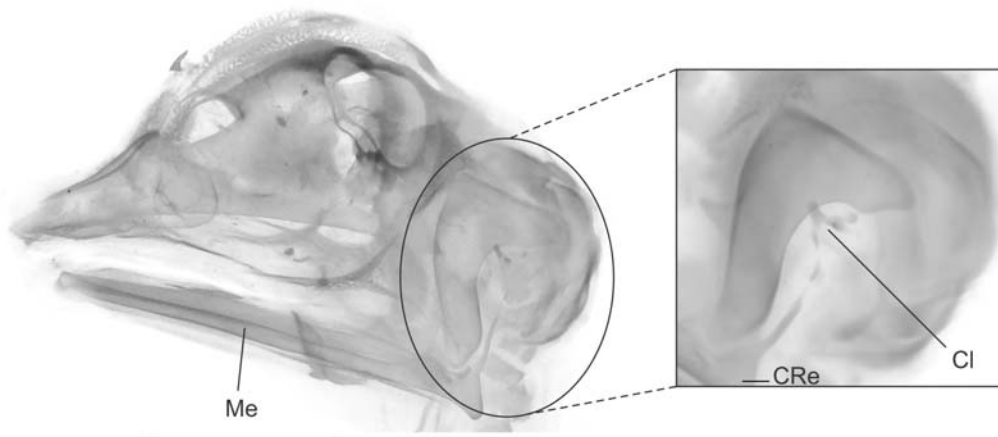


Figura 28: Condrocrânio de *Melanosuchus niger* com detalhe na columela. Fim do estágio 14. Abreviaturas: Cl, columela; Me, cartilagem de meckel; CRe, cartilagem retroarticular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 10mm.

No estágio 13, é possível perceber discretas alterações no desenvolvimento do condrocrânio, embora, sua anatomia permanece muito similar ao estágio anterior. O septo interorbital, o plano suprasedal e a placa basal têm expandido para completar as paredes do crânio. A trabécula e o dorso da sela delimitam um pouco mais a fossa hipofisária (Fig. 29F).

Visto o grande avanço no desenvolvimento das regiões órbito-temporal e ótico-occipital, que culminou com sua forma atual, descrita adiante, nesta fase, a cápsula nasal representa uma pequena parte da anatomia total do condrocrânio. A comissura esfenotimoidal contata a cartilagem parietotectal, formando uma estreita comunicação entre a cápsula nasal e a região órbito-temporal, delimitando ainda a fenestra orbitonasal. O assoalho da cavidade é formado pela lâmina transversa anterior.

Em vista lateral é possível avaliar, o desenvolvimento do septo interorbital em direção ao plano suprasedal. Entre estes ainda existe uma pequena região não corada, o que indica que tais estruturas ainda não se desenvolveram completamente. Três grandes fenestras estão bem delimitadas nesta vista, a fenestra ótica, a epiótica e a orbitonasal. Esta última se forma neste estágio devido a união da comissura esfenotimoidal com a cartilagem parietotectal.

No estágio 14, as três regiões do condrocrânio são bem desenvolvidas, robustas e com a estrutura cartilágnea bem definida. O assoalho da região basal está agora formado. A região ótico-occipital ocupa grande parte do condrocrânio e a cápsula nasal é estreita, conferindo característica cônica à estrutura (Fig. 27G, H). É possível identificar também

a presença de centros de ossificação em alguns ossos dérmicos. Estes foram relatadas com detalhes no tópico padrão de ossificação do crânio.

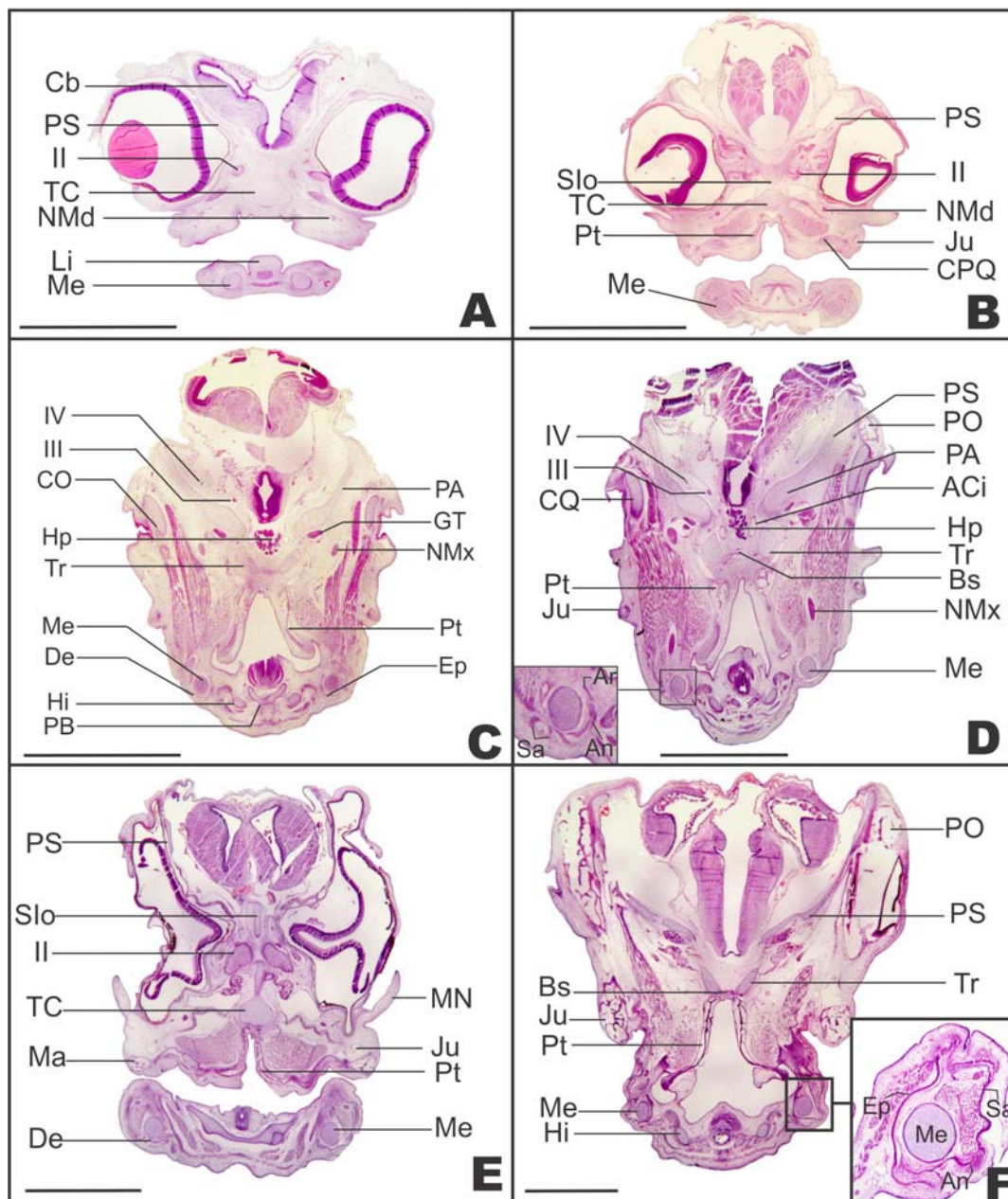


Figura 29: Cortes transversais seriados do condrocrânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 11; (B) estágio 12; (C) estágio 12; (D) estágio 13; (E) estágio 14; (F) estágio 16. Abreviaturas: ACi, artéria carótica interna; An, osso angular; Ar, osso articular; Bs, osso basisfenpoide; Cb, cérebro; CO, cápsula ótica; CPQ, cartilagem pterigoquadrada; De, osso dentário; Ep, esplênica; GT, gânglio trigêmeo; Hi, hióide; Hp, hipófise; Ju, osso jugal; Li, língua; Ma, maxila; Me, cartilagem de meckel; MN, membrana nictante; NMd, nervo mandibular; NMx, nervo maxilar; NOF, nervo oftálmico; PA, pila antótica; PB, placa basal; Po, osso pós-orbital; PS, plano suprasedal; Pt, osso pterigóide; Sa, osso suprangular; Slo, septo interorbital; TC, trabécula comum; Tr, trabécula; II, nervo óptico; III, nervo oculomotor; IV, nervo troclear. Coloração: Hematoxilina e eosina. Escala: 3mm.

Neste estágio a cápsula nasal parece mais robusta e as estruturas estão bem marcadas, representando aproximadamente 1/4 do tamanho total do condrocrânio. A superfície dorsal da cartilagem parietotectal é convexa e se estende lateralmente do septo internasal, sendo contínua com a lâmina transversa anterior, ventralmente, formando a zona anular (Fig. 27G, H).

O septo interorbital parece robusto e completamente formado. O plano suprasedal é amplo e suas asas delgadas e a margem caudal desta placa alcança a cápsula ótica. Cada pila antótica projeta-se caudalmente também, em direção às cápsulas óticas (Figs. 27G, H).

Em vista ventral na região ótico-occipital, a placa basal ocupa parte dessa região. A fenestra basicranial, embora pouco evidente, ocupa aproximadamente a porção medial da placa basal, que se apresenta ampla lateralmente e conectada a cápsula ótica. A cápsula ótica está unida ao condrocrânio dorsomedialmente pelo teto sinótico, que corresponde em uma delgada lâmina ligeiramente convexa e posicionada dorsocaudalmente. Apresenta uma pequena escavação côncava na margem rostral e contata lateralmente o arco occipital. (Fig. 27G, H).

A cartilagem quadrada apresenta, em sua margem caudal, uma incisura em forma de meia lua que se abre dorsoventralmente para acomodar a columela. A pequena cartilagem pterigoquadrada se estende a partir da margem rostromedial de cada cartilagem quadrada (Fig. 27G, H). O processo de formação do condrocrânio está resumido no quadro 5 do apêndice.

Padrão de ossificação do crânio e mandíbula

Pré-maxila: No fim do estágio 14, observou-se centros de ossificação na pré-maxila, em ambos os antímeros, orientados transversalmente sobre a placa parietotectal acima da cápsula nasal (Figs. 30, 33, 34A).

Maxila: Caudal à pré-maxila é visível retenção de vermelho de alizarina no fim do estágio 14. Neste estágio a maxila apresenta-se como uma placa triangular pequena e alongada. No estágio 15 sua extremidade rostral é ampla e a caudal alongada e contata pouco com o osso jugal. A margem ventral forma a maior porção da margem labial superior. No estágio 22, alguns dentes estão marcados pelo corante e a maxila contata o lacrimal e nasal e logo no estágio 24 com a pré-maxila (Figs. 30, 33, 34A, B).

Jugal: Se ossifica a partir de uma estreita barra trirradiada na porção caudal da órbita também no fim do estágio 14. No estágio 15 contata a maxila e no estágio seguinte e o quadradojugal e pós-orbital. Sua forma triangular é bem evidente no estágio 18 (Figs. 29 D-H, 30, 33, 34D-F).

Pós-orbital: Apresenta centro de ossificação no fim do estágio 14, representa uma pequena placa triangular marcado de vermelho de alizarina, que no estágio 16 contata o jugal. Seu esboço é bem corado em suas vistas lateral e dorsal (Figs. 29 F, H, 30, 31, 34D).

Frontal: Está presente como um par de faixas estreitas e pouco coradas na margem rostral do crânio, delimitando medialmente as órbitas. No estágio 16, ainda estão pouco corados e estendem-se da placa pré-frontal à pós-orbital. No estágio 23 contatam caudalmente o parietal. Os centros de ossificação não se fundem no período embrionário, embora se contatem na linha mediana no estágio 25 (Figs. 30, 31, 34C, D).

Pterigóide: Surge como duas placas alongadas no estágio 15. Ambas as placas ósseas estendem-se lateralmente ao longo da margem das trabéculas do condrocânio e no estágio 16 ambas estão separadas pela abertura da coana secundária, que se abre próximo a borda caudal das fenestras palatais. No estágio 26, esta coana é bem delimitada assim como a expansão lateral do pterigóide. Esta expansão sobrepõe o centro de ossificação do paraesfenóide e dificulta sua visualização (Figs. 29 D-F, 30, 31, 34C-E).

Quadradojugal: Surge como uma estrutura estreita no estágio 15, posicionado rostral à cartilagem quadrada. No estágio 16 está bem corado, e apresenta-se de forma trirradiada. No estágio 22, contata os ossos jugal e quadrado. O contato com o pós-orbital só ocorre no estágio 23 (Figs. 30, 31, 34F).

Pré-frontal: Observou-se centro de ossificação no estágio 15, posicionado na porção caudal do plano supraorbital do condrocânio. No estágio 24 apresenta os pilares dos pré-frontais bem desenvolvidos (Figs. 30, 31, 34B).

Esquamosal: Aparece durante o estágio 15 posicionado caudolateralmente no crânio. Está bem ossificado no estágio 22 e ocupa a porção dorsocaudal da cápsula óptica, acima da cartilagem quadrada (Figs. 30, 31, 34E, F).

Ectopterigóide: Está presente no embrião no estágio 15, embora pouco marcado com vermelho de alizarina, o que ocorre no estágio 19, quando a ossificação avança e esboça o seu processo ascendente (Fig. 33).

Palatino: Apresenta-se pouco corado no estágio 15, surge como uma estrutura estreita, rostral ao pterigóide. No estágio 19 ele corresponde a uma pequena placa de forma subtriangular, conectada com a maxila rostralmente e com o pterigóide caudalmente. (Figs. 30, 33, 34B, C).

Nasal: Centro de ossificação é evidente no estágio 15, surgem como duas placas independentes sobre a cartilagem parietotectal e se estendem caudalmente sobre o septo internasal até a porção rostral do septo interorbital. No estágio 21 sua morfologia está bem demarcada com vermelho de alizarina. Contata a maxila, lacrimal e pré-maxila no estágio 22 (Figs. 30, 31, 34A).

Lacrimal: No estágio 15, apresenta considerável retenção de vermelho de alizarina com forma triangular. Começa a desenvolver um processo pontiagudo que se direciona caudalmente até a articulação entre a maxila e o osso jugal no estágio 16 (Figs. 30, 31, 34B).

Vômer: No estágio 22, aparece corado pela primeira vez como uma placa pequena e alongada, posicionada ventralmente ao septo interorbital e rostralmente aos ossos palatinos. Sua morfologia não sofre grandes alterações ao longo do desenvolvimento pré-natal. Ao fim do período de incubação ele contata os ossos pré-maxila e maxila ventralmente (Fig. 34A).

Supraoccipital: Se forma a partir de um pequeno centro de ossificação localizado medialmente aos ossos epióticos, no teto sinótico. Ele se cora pela primeira vez no estágio 19. No estágio 23 ele se funde aos ossos epióticos e apresenta, no estágio 25, morfologia similar ao adulto (Figs. 34G).

Basisfenóide rostral: Retém o corante vermelho de alizarina, de forma discreta, no estágio 20 como uma placa estreita posicionada verticalmente.

Parietal: Este osso apresenta fraca retenção de vermelho de alizarina no estágio 20. É um dos últimos elementos a se ossificar. Corresponde a uma estrutura delgada e disposta lateralmente no teto craniano e caudal ao osso pós-orbital. Está ainda pouco corado no estágio 21. Durante o desenvolvimento, cresce por meio de dois centros de ossificação que se fundem durante a ontogenia. No estágio 24 o parietal está bem marcado e no estágio 26 os centros de ossificação se expandem pelas porções caudal e medial, onde contatam com seu contralateral (Figs. 32, 34E, F).

Palpebral: Se desenvolvem com um centro de ossificação para cada placa, que se cora pela primeira vez no estágio 20. Desenvolve-se rapidamente e localiza-se na pálpebra

superior e não se articula com qualquer outro elemento ósseo do crânio (Figs. 31, 34, 34B).

Dentário: Mostra insipiente retenção de corante vermelho de alizarina no estágio 15. O centro de ossificação é alongado e segue ventrolateralmente na margem rostral da cartilagem de Meckel. No estágio 16 o dentário cobre dois terços da porção rostral da face lateral da cartilagem de Meckel e estende-se caudalmente ao longo da margem ventral desta. No estágio 22, ele se desenvolve e articula na porção rostromedial com o seu contralateral (Figs. 29 E, 30, 31, 34A-E).

Suprangular: Centro de ossificação aparece pela primeira vez no estágio 15. É amplo e localiza-se na porção caudal da cartilagem de Meckel, junto a área articular da mandíbula. No estágio 18 contata com o dentário e o angular no estágio 19 (Figs. 29 F, 30, 31, 33, 34E-G).

Angular: Forma um centro de ossificação longo e bem estreito no estágio 15, posiciona-se ventromedialmente na porção caudal da cartilagem de Meckel. Contata o osso dentário no estágio 18 e o suprangular no estágio 19 (Figs. 29 F, H, 30, 31, 34E-G).

Coronóide: mostra um pequeno centro de ossificação no estágio 15, caudal ao dentário. Ele é bem desenvolvido no embrião com estágio 19 e forma uma pequena placa levemente triangular na margem caudal do dentário (Figs. 30, 31, 34E).

Esplênial: Apresenta fraca retenção de corante no estágio 16. Juntamente com o osso dentário, o esplênial cobre a cartilagem de Meckel e também se estende caudalmente ao longo desta (FigS. 34B-D).

Quadrado: A ossificação do osso quadrado ocorre pela substituição da cartilagem quadrada, inicialmente por uma pequena porção corada que contorna a borda da incisura columelar no estágio 16. O quadrado retém uma maior quantidade de vermelho de alizarina no final deste estágio, mas o esboço da cartilagem quadrada permanece durante a ontogenia. A partir do estágio 24 o processo de ossificação avança e contata, na base do crânio, o osso pterigóide, delimitando a margem caudal do forame para o trigêmeo (Figs. 30, 31, 34E, F).

Lateroesfenóide: Apresenta insipiente retenção de corante no estágio 21, na porção rostral da cavidade craniana, no estágio 24 mostra maior expansão marcada com vermelho de alizarina (Fig. 30F, 34E).

Basisfenóide + parasfenóide: O basisfenóide se evidencia pela primeira vez no estágio 16, como uma placa pouco pronunciada, posicionada no assoalho do crânio, na porção rostral da placa basal, entre os centros de ossificação do pterigóide. Ele se desenvolve a partir de um único centro de ossificação que substitui parte da placa basal e a porção caudal das trabéculas do condrocânio. No estágio 25 está bem ossificado e se expande lateralmente, quando contata o pterigóide. Ainda neste estágio, surge o centro de ossificação que corresponde ao parasfenóide. Este se funde ao basisfenóide durante a ontogenia, formando o parabasisfenóide. Esta fusão dificulta sua identificação, além da sobreposição durante a expansão do osso pterigóide (Figs. 29 F, 30E, 34E, F).

Basioccipital: Se ossifica no estágio 18, na porção caudal da placa basal do condrocânio. É alongado e posicionado ventralmente, mas se projeta caudalmente durante desenvolvimento para formar o côndilo occipital, que só completa sua formação após o nascimento (Figs. 32, 33, 34G).

Exoccipital: Surge primeiro no estágio 16, por meio de centros de ossificação distintos e alongados em ambos os antímeros, dispostos na porção caudal do crânio. Estão bem corados, mas não se articulam com nenhum outro elemento antes do estágio 24 (Figs. 32, 33, 34G).

Proótico: está presente no embrião no fim do estágio 20, a partir de um pequeno centro de ossificação na porção ventrolateral do crânio, caudal ao osso laterosfenóide. Ele se ossifica na cápsula óptica, junto a margem rostral da cartilagem quadrada e forma a margem caudal do forame para o nervo trigêmeo (Fig. 33).

Epiótico: Está presente também no estágio 20. Surge como uma pequena placa que se ossifica na margem lateral do osso supraoccipital, com qual se funde no início do estágio 22.

Opistótico: Está presente pela primeira vez no embrião no estágio 18. Forma-se a partir de três centros de ossificação bem corado na porção caudal do crânio. O opistótico e os ossos quadrado e supraoccipital são confluentes e se contatam firmemente no estágio 26 (Figs. 30F, 34E, F).

Hióide: começa sua ossificação no estágio 20. A retenção de vermelho de alizarina avança pouco, mas o suficiente para delinear a forma adulta deste osso no estágio 24 (Figs. 29E, 33E).

Articular: O primeiro indício do osso articular é evidente no embrião no estágio 21, quando forma uma pequena placa pouco corada e posicionada medialmente ao

suprangular, com qual se contata firmemente no estágio 24 (Figs. 29F, 34G). O processo de ossificação está resumido no quadro 6 do apêndice.

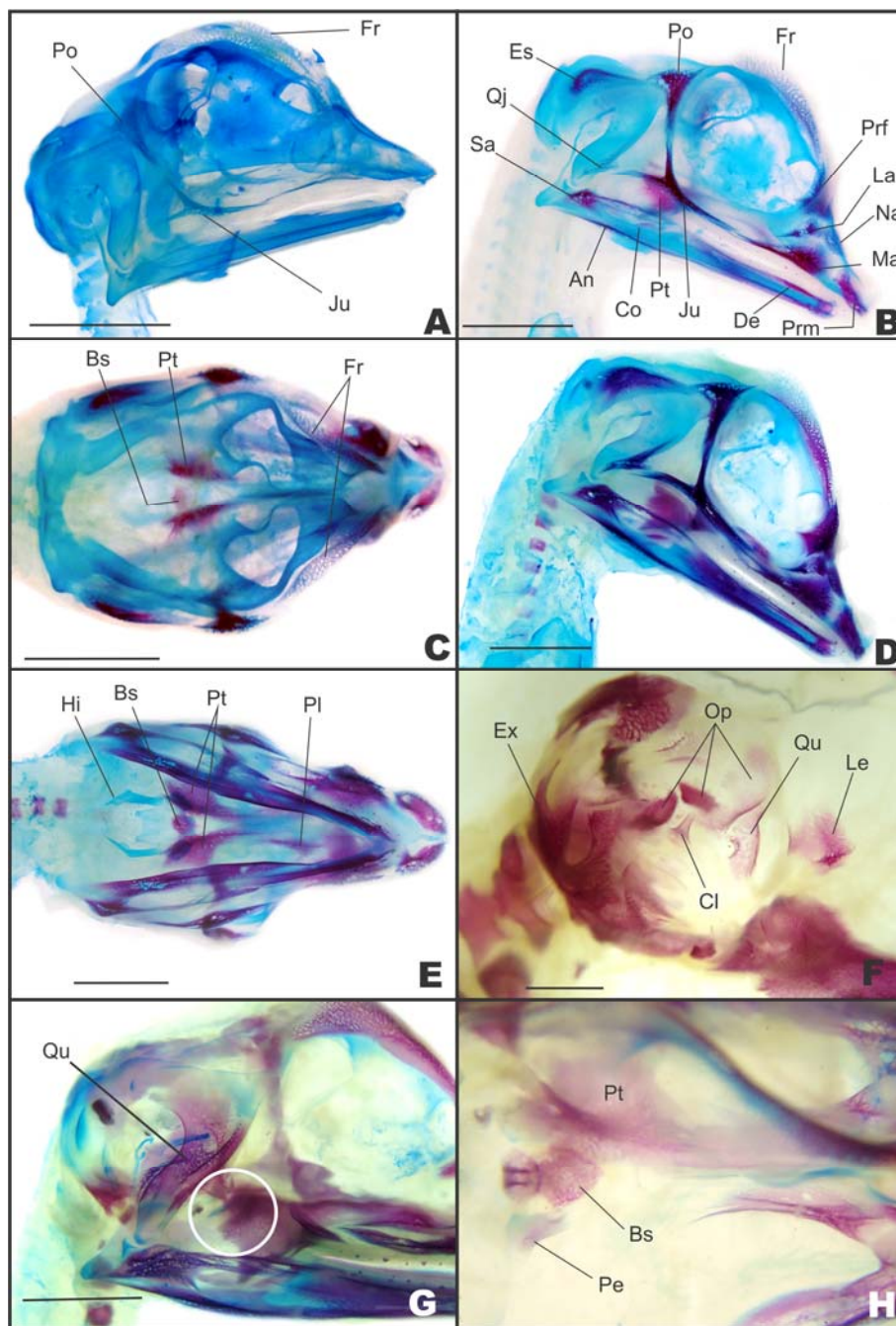


Figura 30: Processo de ossificação de crânio de *Melanosuchus niger*. (A) vista lateral, início estágio 16; (B) vista lateral, fim estágio 16; (C) vista dorsal, fim estágio 16; (D) vista lateral, estágio 18; (E) vista ventral, estágio 18; (F) vista dorsolateral, estágio 24; (G) vista lateral, com detalhes em (E), estágio 21. Abreviaturas: An, angular; Bs, basisfenóide; Co, coronóide; De, dentário; Fr, frontal; Es, esquamosal; Hi, hióide; Ju, jugal; La, lacrimal; Le, lateroesfenóide; Ma, maxilar; Na, nasal; Prf, pré-frontal; Prm, pré-maxilar; Po, pós-orbital; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Sa, supra-angular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 10mm.

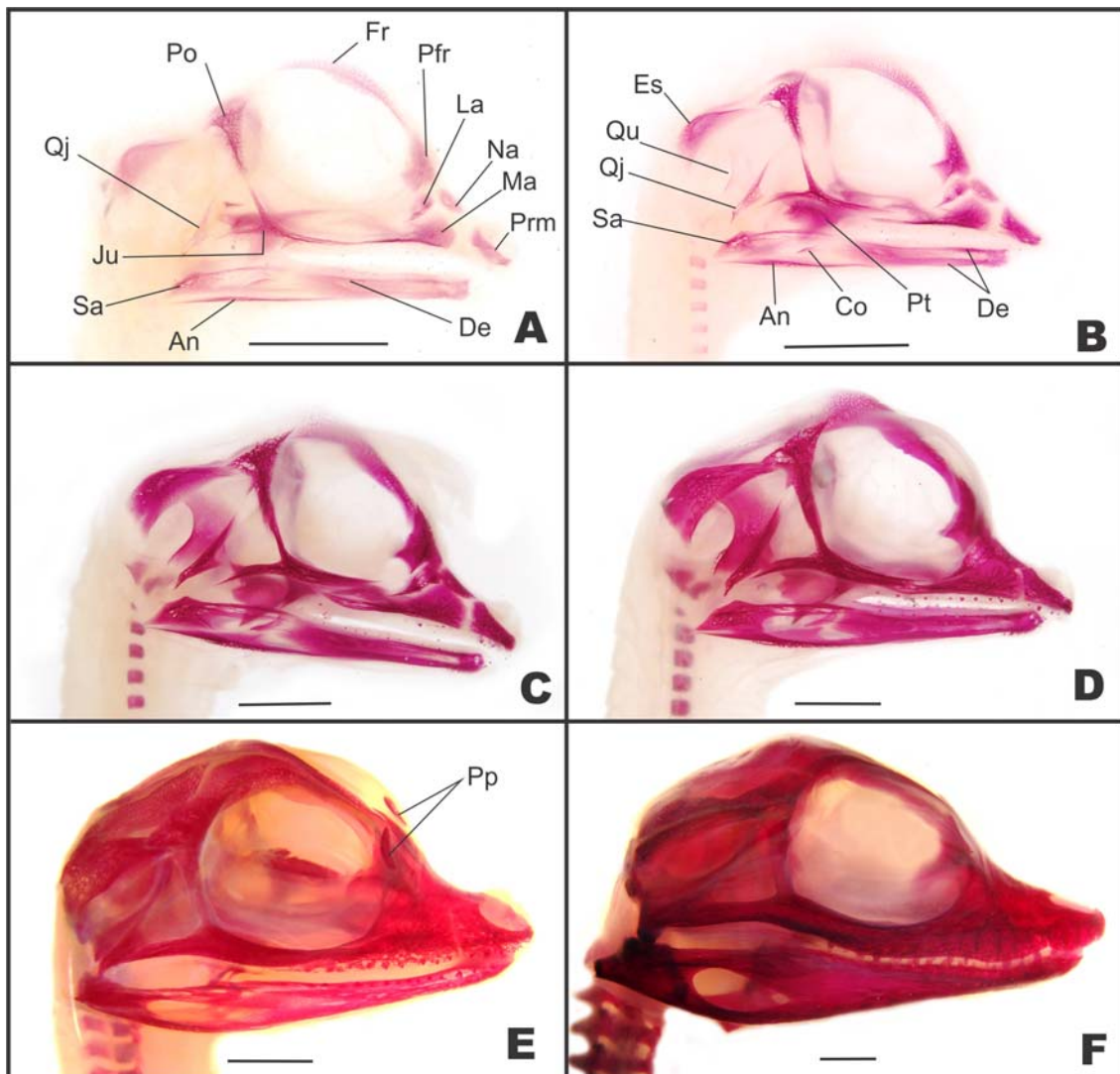


Figura 31: Processo de ossificação do crânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 15; (B) estágio 16; (C) estágio 21; (D) estágio 22; (E) início estágio 24; (F) estágio 28. Vista lateral. Abreviaturas: An, angular; Co, coronóide; De, dentário; Es, esquamosal; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Ma, maxilar; Na, nasal; Po, pós-orbital; Pfr, pré-frontal; Prm pré-maxilar; Pt, pterigóide; Qj, quadrojugal; Qu, quadrado; Sa, suprangular. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina. Escala. 10mm.

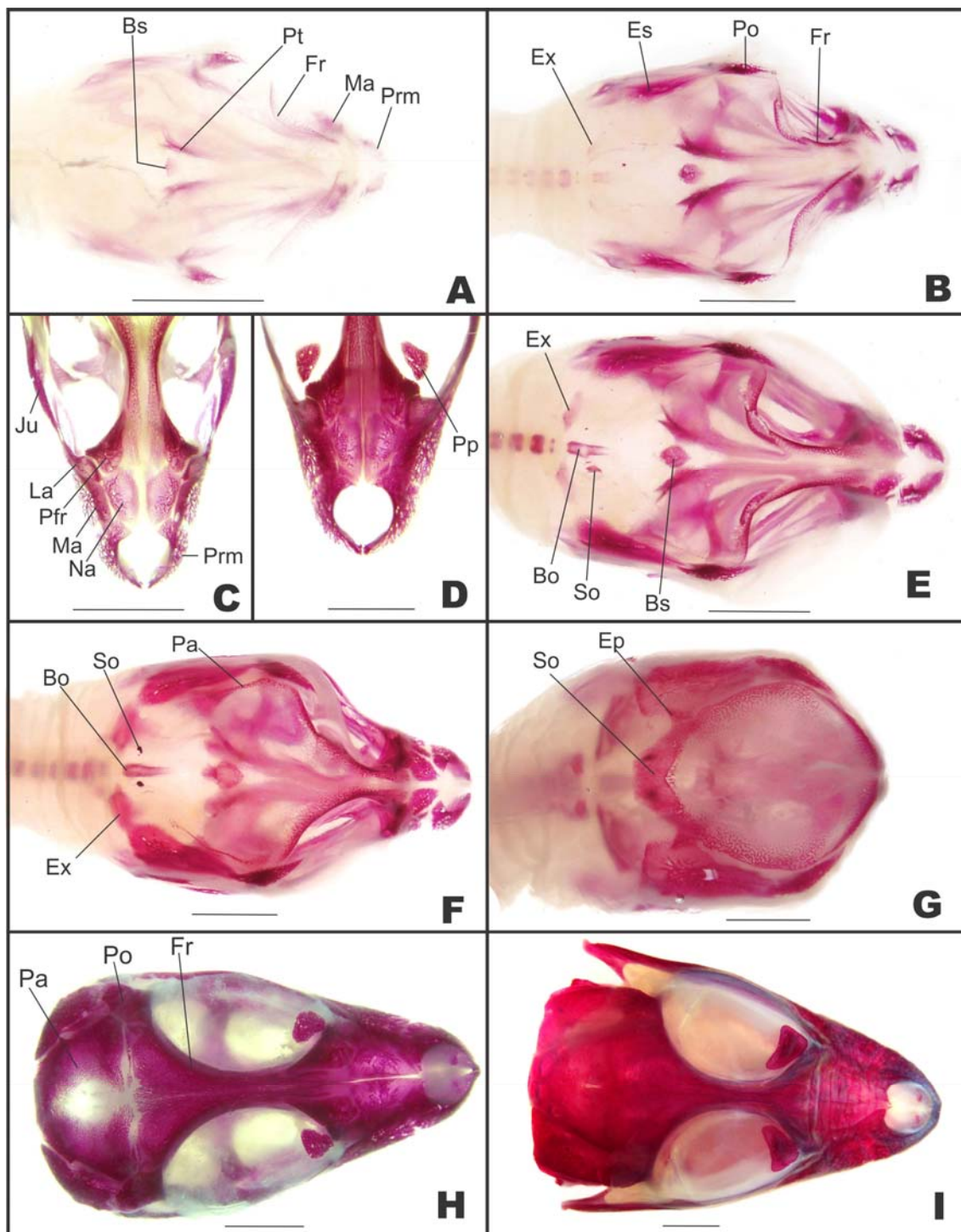


Figura 32: Processo de ossificação de crânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 15; (B) estágio 16; (C) estágio 22; (D) fim estágio 24; (E) estágio 19; (F) estágio 20; (G) estágio 22; (H) estágio 26; (I) 42 dias pós-eclosão. Vista dorsal. Abreviaturas: Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; Ex, exoccipital; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Ma, maxilar; Na, nasal; Pfr, pré-frontal; Prm pré-maxilar; Pt, pterigóide; Pp, palpebral; So, supraoccipital. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina. Escala: A, B, E, F, G e H 10mm; C e D 5mm.

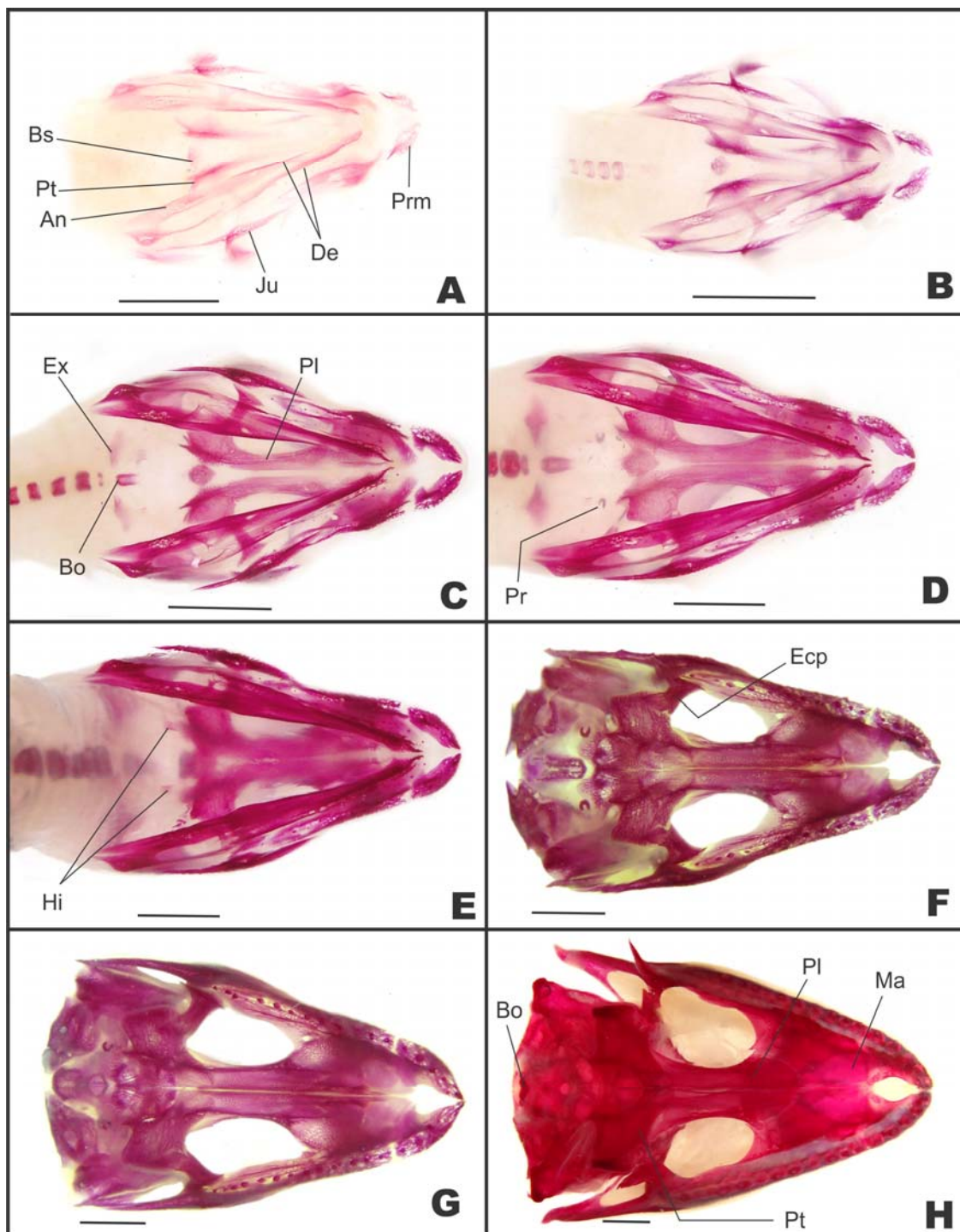


Figura 33: Crânio de *Melanosuchus niger*. (A) estágio 15; (B) estágio 16; (C) início estágio 19; (D) fim estágio 20; (E) início estágio 21; (F) início estágio 25; (G) fim estágio 24 (H) 42 dias pós-eclosão. Vista ventral. Abreviaturas: An, angular; Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; Ecp, ectopterigóide; Ex, exoccipital; De, dentário; Hi, hióide; Ju, jugal; Ma, maxilar; Pl, palatino; Prm, pré-maxilar; Pt, pterigóide; Pr, proótico. Diafanização por KOH e coloração dos ossos com vermelho de alizarina. Escala. 10mm.

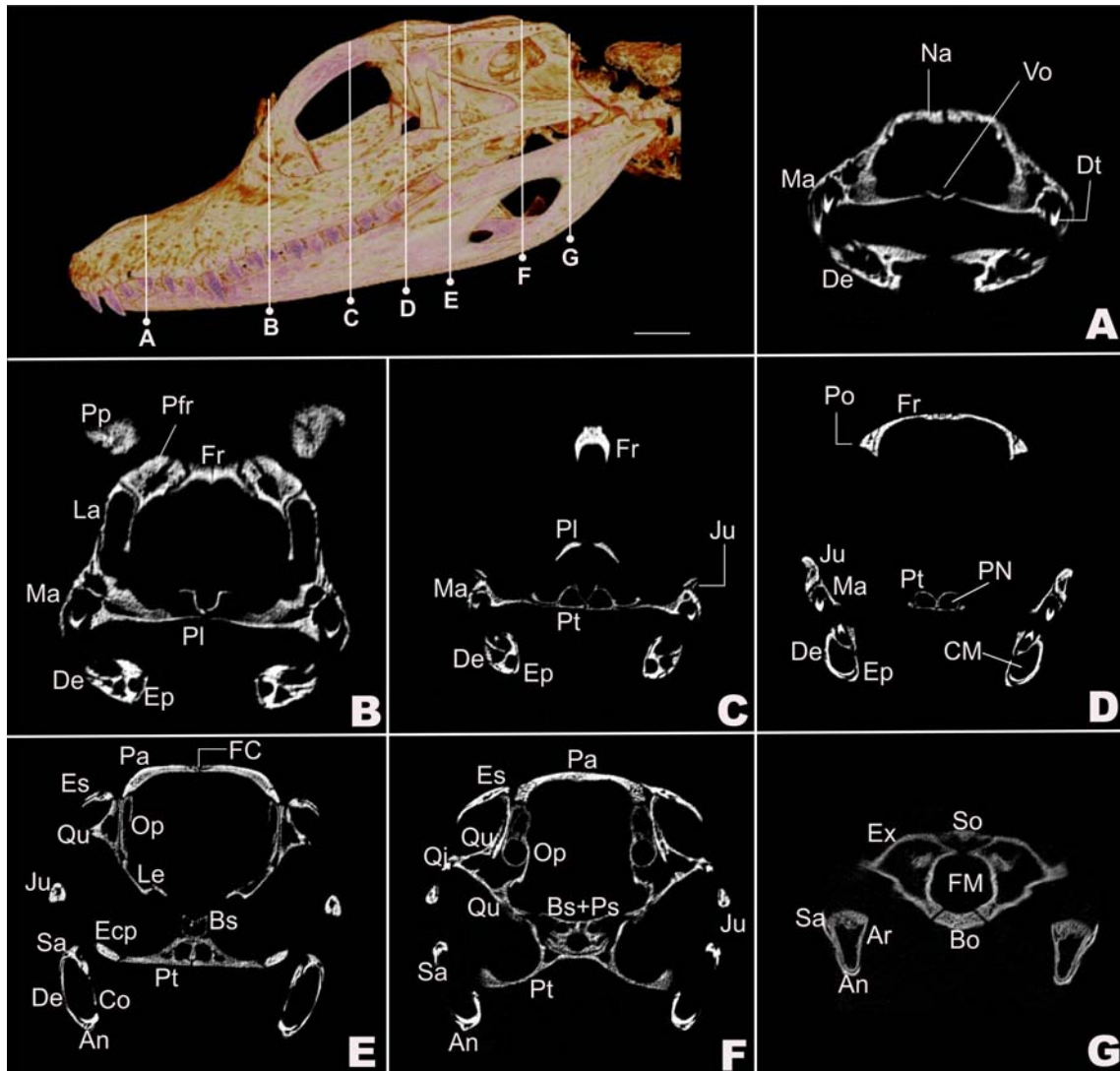


Figura 34: Cortes frontais semi-seriados, do crânio de *Melanosuchus niger*. Estágio 26. Abreviaturas: An, angular; Bo, basioccipital; Bs, basisfenóide; CM, canal mandibular; Co, coronóide; De, dentário; Dt, dente; Ecp, ectopeterigóide; Ep, esplénial; Es, esquamosal; Ex, exoccipital; FC, fontanela craniana; FM, forame magno; Fr, frontal; Ju, jugal; La, lacrimal; Le, lateroesfenóide; Ma, maxila; Na, nasal; Op, opostótico; Pa, parietal; PI, palatino; PN, passagem nasal; Po, pós-orbital; Pp, palpebral; Prf, pré-frontal; Ps, paresfenóide; Pt, pterigóide; Qj, quadradojugal; Qu, quadrado; Sa, supra-angular; So, supraoccipital; Vo, vômer. Microtomografia e reconstrução 3D. Escala: 10mm

4.2.2.2 DISCUSSÃO

Desenvolvimento do condrocânio

A anatomia do condrocânio de *M. niger* é similar a descrição de Bellairs e Kamal (1981) para *Crocodylus*. O crânio cartilágneo dos Crocodylia, geralmente, apresenta grande semelhança aos demais répteis (De Beer, 1937; Iordasny, 1973). Durante seu desenvolvimento, as estruturas formadas podem ser agrupadas em três regiões como a cápsula nasal, a região órbito-temporal e a região ótico-occipital.

À semelhança dos Crocodylia *Alligator* e *Crocodylus* (Bellairs e Kamal, 1981), a cápsula nasal em *M. niger* compreende principalmente na cartilagem parietotectal, lâmina transversa anterior e as conchas nasais que se projetam da parede lateral da cápsula. A região órbito-temporal é composta pelo septo interorbital, as trabéculas, o plano suprasetal, as pilas metóticas e as pilas antóticas. Nesta região existem quatro fenestras: óptica, epióptica, orbitonasal e metótica. A região ótico-occipital corresponde à porção posterior do crânio, onde as cápsulas ópticas são as estruturas mais representativas, assim como a placa basal, o arco occipital e o teto sinótico.

Bellairs e Kamal (1981) relataram que nos estágios iniciais de *Crocodylus*, o dorso da sela e a placa basal são as primeiras partes do condrocânio a iniciar o processo de formação. Pouco depois, pode ser vista a formação das trabéculas como duas estruturas separadas, cada uma em seu antímero. Em *M. niger*, visualizamos claramente que as trabéculas se formam antes da placa basal, assim como a cartilagem quadrada e a cartilagem de Meckel, que no estágio 9, no início do processo de condrogênese, é bem pronunciada. As trabéculas nos lagartos *Ascalabotes*, à semelhança de *Lacerta* (De Beer, 1929), *M. niger* e *Sphenodon punctatus* (Howes e Swinnerton, 1901), aparecem também como elementos separados, contudo, estas são unidas rostralmente em uma trabécula comum, ainda no início do desenvolvimento destes, exceto em *Ascalabotes* onde esse evento ocorre mais tarde durante a ontogenia. Em *S.punctatus* são distintos, além das trabéculas, a cartilagem de Meckel e a placa basal. Em *M. niger* foi observado as mesmas estruturas, embora em estágios e sequência diferentes. Em ambos, as trabéculas são separadas caudalmente e abrigam a fossa hipofisária sendo possível visualizar a placa basal perfurada pela notocorda (Howes e Swinnerton, 1901).

No grupo das aves, Parker (1869) descreveu pela primeira vez a formação do condrocânio em embriões de *Gallus* que, segundo o autor, se inicia aos quatro dias de

incubação, dados posteriormente revistos por outros autores como Parker e Bettany (1877) e Sonies (1907), descreveram a primeira condrificação do condrocânio aos cinco dias, com a formação da cartilagem acrocordal. Estas características foram também observadas em *Anas* (De Beer e Barrington, 1934) e parece ser um padrão para aves, que aparentemente apresenta exceções em *Phalacrocorax* (Slabý, 1951) onde a condrificação dos arcos viscerais precedem a formação da cartilagem acrocordal, e *Struthio* (Frank 1954), onde a cartilagem acrocordal se desenvolve depois da placa basal.

Em *Crocodylus*, o teto e o assoalho da cápsula nasal se desenvolvem e sustentam a alongada e estreita cartilagem paraseptal, com o teto quase completamente formado pela cartilagem parietotectal, que é contínua ventralmente com o septo internasal, exatamente como se desenvolve em *M. niger*. Em ambos, a parede lateral da cápsula nasal é formada pela cartilagem parietotectal em estágios posteriores. A cápsula nasal em *Lacerta* apresenta a cartilagem parietotectal contínua com a porção dorsal do septo internasal, formando a porção rostral e as paredes da cápsula, como nos *Crocodylia* supracitados. A cartilagem paranasal forma a porção caudal da cápsula nasal junto com o plano anterorbital, como visto nos *Crocodylia* (Bellairs e Kamal, 1981).

Em *M. niger*, assim como relatado para *Crocodylus* (Bellairs e Kamal, 1981), a trabécula se funde medialmente na região rostral para formar o septo internasal, e caudalmente o delgado septo interorbital. Adiante deste as trabéculas divergem na fenestra hipófisária e são contínuas à placa basal. Dorsalmente este septo é contínuo com a cartilagem do plano suprasedal.

O septo internasal em *Crocodylus* e *M. niger* estende por meio de um pequeno processo rostral da lâmina transversa anterior sendo a fenestra nasal delimitada caudalmente pela junção com a cartilagem parietotectal e por esta lâmina. Devido ao tamanho desta fenestra, a zona anular é bastante estreita (Bellairs e Kamal, 1981). Durante o desenvolvimento da cápsula nasal nos *Crocodylia*, as conchas nasais se projetam da parede lateral desta cápsula (Shiino, 1914). Dentre os répteis, a presença da concha nasal é relatada também em *Vipera* (Peyer, 1912), *Lacerta* (De Beer, 1930) e *Leptodeira* (Brock, 1929), sendo formada pela expansão da cavidade da cápsula nasal.

As aves, no geral, exceto pelo plano suprasedal e a cartilagem paranasal, que em poucas espécies se desenvolvem como centro cartilagíneo independente, todas as porções da cápsula nasal parecem se desenvolver em continuidade com os processos

condrogênicos oriundos da base do septo internasal (Vorster, 1989). Em *M. niger* não foi possível relatar com precisão a origem e sequência do desenvolvimento dessas estruturas, haja vista a condrificação simultânea de vários elementos que compõe grande parte da cápsula nasal. Depois do desenvolvimento do septo internasal, as aves apresentam o crescimento acelerado dos demais elementos da cápsula nasal, embora a diferenciação e condrificação dessa cápsula seja mais lenta que em outras áreas do condrocânio (Vorster, 1989). Além disso, esta estrutura, como nos demais répteis, não se ossifica em Crocodylia. Em *M. niger*, apenas os ossos pré-maxila, maxila, nasal e vômer se desenvolvem externamente à cápsula nasal.

Quanto à comissura esfenotimóide, em *Crocodylus*, Bellairs e Kamal (1981) relataram que esta é incompleta e não alcança a cápsula nasal, ao contrário de *Alligator* e *M. niger*, onde esta é contínua entre o plano suprasedal e a cápsula nasal, delimitando a fenestra orbitonasal.

As ténias mediais e marginais conectam o plano suprasedal às pilas e metóticas e antóticas, respectivamente. E delimitam as fenestras óptica, metótica e epióptica. Esta é uma característica dos Crocodylia (Bellairs e Kamal, 1981). Ainda segundo esses autores, no lugar do típico processo basipterigóide, os Crocodylia apresentam um par de placas cartilagineas que se desenvolvem caudal a base de cada trabécula, e se posicionam abaixo da placa basal, os processos infrapolares. Em *M. niger* os processos infrapolares se desenvolvem de maneira similar a *Crocodylus*, onde estes são extensões caudais das trabéculas e delimitam a fossa hipofisária.

A pila metótica é similar, em estrutura, entre Crocodylia e aves viventes. Trata-se de uma placa que se desenvolve lateralmente. Foi descrita primeiro em *Anas platyrhynchos* (Sonies, 1907) e posteriormente relatada em outras aves (Müller, 1961; Toerien, 1971). Weber (1990) considerou este elemento uma sinapomorfia das aves. Se desenvolve como um elemento independente (Sonies, 1907; de Beer e Barrington, 1934; May, 1962; Macke, 1969; Toerien, 1971), em *Podiceps cristatus*, onde a pila metótica surge isolada em uma posição lateral a cápsula óptica (Toerien, 1971) ou ventral a esta (Frank, 1954). Em *M. niger* assim como em *Crocodylus* (Bellairs e Kamal, 1981) a pila metótica representa uma projeção rostral da cartilagem acrocordal e em ambos se desenvolve nos primeiros estágios. Já a pila antótica se ossifica e origina o grande osso lateroesfenóide em *A. mississippiensis* (Rieppel, 1993b), *Crocodylus* (Bellairs e Kamal, 1981) e *M. niger*.

Durante a formação do condrocânio em *M. niger*, a fenestra basicranial não é bem evidente, como relatado por Bellairs e Kamal (1981), para *Crocodylus*. Nessa mesma região a notocorda passa através do côndilo occipital e desta fenestra, posicionando-se sobre a placa basal. A fenestra basicranial é delimitada lateralmente pelo arco occipital que se funde dorsalmente ao teto sinótico, assim como descrito por Sonies (1907) em *Gallus*. Segundo De Beer (1937) em *Gallus* existe a condição combinada entre teto sinótico e teto posterior. Para *M. niger* apenas o teto sinótico estava presente na região dorsocaudal, e assim como em *Gallus*, o teto sinótico também contribui para a formação do forame magno no crânio ossificado.

Segundo Bellairs e Kamal (1981), a cápsula óptica de *Crocodylus* apresenta divisões similares a dos demais répteis, em *M. niger*, não foi observado nenhuma subdivisão dessa região, embora compartilhe com os demais Archosauria a conexão desta à porção caudal do condrocânio por meio do teto sinótico.

Padrão e sequência de ossificação

Dentre as descrições existentes para a sequência de formação do crânio em Crocodylia, o início do processo de ossificação em *M. niger* se dá primeiro que *Alligator mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990; Rieppel, 1993b; Klembara, 2005; Vickaryous e Hall, 2008), *Crocodylus niloticus* (Iordansky, 1973) e *Crocodylus porosus* (Mook, 1921; Kalin, 1933). Nos animais em geral a sequência de formação do esqueleto reflete a demanda funcional destes. A ossificação do crânio, por exemplo, em anuros, atende às necessidades dos elementos envolvidos com a respiração, e em peixes teleósteos com a alimentação, incluindo as espécies que apresentam estratégias peculiares de alimentação como *Danio rerio* (Mabee et al., 2000), seguidos por aqueles associados a suporte e depois proteção (Weisel, 1967; Gaudin, 1978; Adriaens e Verraes, 1998). Padrão similar foi averiguado em *M. niger*, que inicia sua ossificação pela maioria dos ossos envolvidos na captura e mastigação do alimento, como os elementos da mandíbula, maxila, pré-maxila, palatino, nasal e jugal.

A ossificação dos elementos da mandíbula ocorre mais cedo em grupos de animais que possuem dentes e mais tardiamente em tetrápodes edentados, e pode exemplificar uma cascata de desenvolvimento compartilhada que controla o início da formação do crânio (Schoch, 2006). Ainda segundo este autor, tal característica foi apresentada durante o processo evolutivo dos vertebrados, possivelmente em resposta a

pressão do desenvolvimento do crânio. Segundo Schlosser e Wagner (2004) estes ossos formam módulos que talvez representem unidades funcionais, como por exemplo, os ossos dérmicos da mandíbula, os palatais, órbita, assoalho e caixa craniana. Em *M. niger*, podemos observar que existe uma tendência que envolve tais grupos, haja vista que os ossos que os compõem se ossificam simultâneos ou em estágios próximos, como os ossos da porção rostral do crânio.

Os ossos palatino, vômer, pterigóide, pré-maxila e maxila formam a estrutura óssea do palato secundário. Sua importância funcional é refletida na ossificação de seu aparato ósseo, que ocorre em estágios iniciais. A formação do pterigóide ocorre cedo também em *A. mississippiensis* (Müller e Alberch, 1990; Rieppel, 1993b; Vickaryous e Hall, 2008), *Crocodylus cataphractus* (Müller, 1967) e *Lacerta agilis exigua* (Rieppel, 1994b). Com exceção do pterigóide, Rieppel (1993b) não relatou em *A. mississippiensis* outro elemento palatal antes do estágio 21. Essa estrutura tem grande importância nesse grupo, devido ao seu habitat, pois atua na separação das cavidades respiratória e oral. Isso permite que eles comam e respirem ao mesmo tempo.

A ossificação do pterigóide parece ser um padrão também para os Crocodylia *A. mississippiensis* (Rieppel, 1993b), *C. cataphractus* (Müller, 1967), *C. yacare* (Lima et al., 2011b) e *M. niger*, para os Testudines *C. serpentina* (Sheil e Grenbaum, 2005), *A. spinifera* (Sheil, 2003) e para os Lepidosauria *Lacerta vivípara* e *Lacerta agilis exigua* (Rieppel 1992, 1994b). Sua formação inicial pode dizer muito a respeito da importância deste elemento entre os répteis basais (Rieppel, 1993a), bem como o seu papel no ponto de fixação para grandes músculos adutores da maxila. Embora a relação seja menos clara, a rara formação inicial do coronóide em *A. mississippiensis* (Rieppel, 1993b) pode também se relacionar com o sistema musculotendinoso, haja vista que este é um ponto de inserção para o tendão mandibular do músculo adutor (Iordansky, 1973).

Em *Crocodylus palustris* centros de ossificação aparecem simultaneamente, nos frontais, parietais, pós-orbitais, esquamosais, pré-fontais, nasais, maxilas, pré-maxilas, palatinos, ectopterigóides, pterigóides, quadradojugais, jugais e vômer (Bellairs e Kamal, 1981). Esta sequência apresenta algumas variações em relação aos demais Crocodylia relatados, dentre elas a ossificação do frontal, nasal, vômer, parietal e ectopterigóide nos estágios iniciais. Particularmente em *A. mississippiensis* (Rieppel, 1993b), em *C. yacare* (Lima et al., 2011b) e em *M. niger*, o parietal se ossifica em estágios mais avançados, porém a maioria dos elementos do crânio apresenta centros de

ossificação entre os estágios 14 e 16, muitos deles simultaneamente. É interessante ressaltar que o parietal se desenvolve com dois centros de ossificação, localizados em ambos os antímeros. Uma fontanela mantém estes elementos separados durante todo o período pré-natal. Somente após eclosão estes elementos se fundem. A presença de um parietal completamente fundido é uma sinapomorfia utilizada em análises de filogenia de Crocodylomorpha.

Entre os répteis *Elaphe obsoleta* (Haluska e Alberch, 1983), *Lacerta vivipara* (Rieppel, 1992), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002), *Chelydra serpentina* (Sheil, 2003; Rieppel 1993c), *Apalone spinifera* (Sheil e Greenbaum, 2005), incluindo *Gallus gallus* (Jollie, 1957; Murray, 1963; Hamilton, 1965), os ossos dérmicos iniciam sua ossificação antes dos endocondrais, padrão também observado em *M. niger*. Similar aos tetrápodos basais, os ossos do dermatocrânio dos Crocodylia se caracterizam pela extensa ornamentação, oriunda de diversas cristas e fossetas na superfície destes ossos.

De acordo com Bellairs e Kamal (1981), assim como ocorre em *M. niger* e *A. mississippiensis* (Klembara, 1991), o basisfenóide se ossifica na porção anterior da placa basal, que se projeta rostralmente entre os lateroesfenóides. Abaixo da fossa hipofisária uma placa surge em contato com cada pterigóide, o paraesfenóide, que se funde dorsalmente com o basisfenóide e forma o parabasisfenóide. Em *Crocodylus porosus* o paraesfenóide se ossifica por meio de três centros de ossificação (Bellairs e Kamal, 1981) e apenas um em *M. niger*. A fusão do basisfenóide com o paraesfenóide é uma característica dos Crocodylia (Iordasny, 1973). Müller (1967) relatou que estas placas são ossificações da porção infrapolar e não elementos dérmicos, assim como observado para *M. niger*, onde essas placas se desenvolveram por meio de ossificação endocondral.

Segundo Andrade et al. (2006), à semelhança de *M. niger*, o desenvolvimento do palato secundário nos Crocodylia viventes segue paralelo à evolução desta estrutura nas formas basais como em *Geosaurus* (Crocodyliforme) e *Notosuchus* (Mesoeucrocodylia), os quais possuem coanas totalmente encerradas nos pterigóides fusionados, esta é uma das características presente no crânio que define o clado Mesoeucrocodylia. Em observações durante o desenvolvimento de *M. niger*, notou-se que a coana apresentou gradual migração no pterigóide, até atingir sua porção caudal, onde se mantém totalmente limitada por esse osso durante a vida adulta. Informações

semelhantes já haviam sido relatadas por Kälin (1933), Langston (1973), Ferguson (1985) e Monteiro e Soares (1997).

De acordo com Andrade et al. (2006) a morfologia do palato e narinas internas, dentre os Crocodylomorpha, é importante para definição das características evolutivas, sendo sua classificação atual baseada em diversos estudos acerca das características gerais e do desenvolvimento destas estruturas (Romer, 1956; Iordansky, 1973; Benton e Clark, 1988; Carroll, 1988; Brochu, 2003; Pough et al., 2003; Hutchinson, 2006). Na maxila de *Alligator* e *Osteolaemus* existe um pequeno processo pré-nasal ascendente que se encontra com a extensão anterior dos ossos nasais e separa a abertura nasal (Bellairs e Kamal, 1981). Em *M. niger* não foi averiguada tal característica, visto que sua abertura nasal é única, e não septada como nas espécies onde este processo foi relatado.

Segundo Iordansky (1973), o crescimento dos Crocodylia é contínuo ao longo de toda vida. Tal observação poderia explicar a tendência de alongamento dos ossos do focinho de *M. niger*, que é mais pronunciada pós-eclosão. Para Monteiro e Soares (1997), os processos morfogênicos que envolvem o alongamento do crânio são, provavelmente uma característica plesiomórfica. Iordansky (1973) relata ainda que algumas variações no crânio de *C. paulistris*, *C. porosus* e *C. niloticus*, principalmente na porção rostral, ocorrem devido a funcionalidades relacionadas à alimentação e à ação de músculos mandibulares, além da presença de dimorfismo sexual, mas estes ainda não detalhados. Serão necessários dados que forneçam subsídios sobre o processo de formação dos músculos mandibulares, bem como suas relações funcionais com o arcabouço ósseo da região rostral do crânio para confirmar em plenitude esta hipótese.

Grande parte dos elementos ósseos da porção caudal do crânio se desenvolvem a partir da substituição de elementos cartilágeos do condrocânio, padrão apresentado pelos demais vertebrados. Estes se ossificam relativamente mais tarde que os demais elementos do dermatocrânio. Em *A. mississippiensis* o basioccipital é o primeiro a se ossificar, seguido pelo basisfenóide, exoccipital, opstótico e pela porção dorsal do epiótico, que se funde durante com o parietal (Rieppel, 1993b). Em *M. niger* o centro de ossificação do basisfenóide é evidente no estágio 15, portanto, antes do basioccipital e exoccipital, no estágio 16, enquanto somente no estágio 21 o supraoccipital é relatado. Na morfologia adulta de ambos, os ossos epiótico e proótico são indiferenciáveis estando fundidos respectivamente com o parietal e lateresfenóide, embora estes últimos

se ossifiquem de forma independente. Segundo Iordansky (1973), o osso opstótico está fundido com o exoccipital, talvez por este motivo seja de difícil identificação durante a ontogenia. Mas em *M. niger* este se forma a partir de três centros de ossificação. Juntos, o esquamosal e opstótico formam o recesso para a cavidade timpânica e também a cavidade externa do meato, que em vida é fechada por uma membrana timpânica aderida na margem do osso esquamosal.

A existência de placas ósseas posicionadas nas pálpebras, denominadas como ossos palpebrais ou supra-orbitais (Bellairs e Kamal, 1981), não foram tratados como um elemento do crânio propriamente dito em *M. niger*, uma vez que este não é uma ossificação da derme acima dos olhos, em concordância com Romer (1956) e Vickaryous e Hall (2008), consideramos este elemento como um osteodermo profundamente inserido, assim como ocorre em muitos Squamata. A presença desses ossos palpebrais é bastante distribuída entre o Crocodylomorpha, podendo haver uma ou duas peças. Em *M. niger* e demais formas viventes este osso apresenta-se como uma pequena placa na margem dorsal rostral das órbitas. Nas formas viventes e em algumas formas fósseis, como *Mariliasuchus amarali* (Carvalho e Bertini, 1999) e *Sebecus icaeorhinus* (Colbert, 1946), este elemento é frouxamente aderido ao crânio. Em outras formas, entretanto, esta cobertura supra-orbital pode desenvolver-se de modo a formar uma sólida placa firmemente aderida aos ossos cranianos circundantes, tal como ocorre em *Stratiotosuchus* e em *Lomasuchus palpebrosus* (Gasparini et al. 1991).

4.2.3 ESQUELETO AXIAL PÓS-CRANIAL

4.2.3.1 Resultados

Descrição anatômica do esqueleto adulto

Costelas cervicais

Em *M. niger* há oito pares de costelas cervicais distintas entre si e cada par se articula com uma vértebra cervical. O primeiro e segundo pares, que se articulam com o atlas e eixo, respectivamente, são facilmente distinguíveis das demais costelas cervicais (Fig. 35).

As costelas do atlas possuem apenas uma superfície de contato, na extremidade cranial. Essa superfície encaixa-se na face caudal do intercentro do atlas. São costelas em forma de lâmina de espada, longas crânio-caudalmente, estreitas látero-medialmente e achatadas dorsoventralmente. A costela do eixo também possui forma de lâmina de espada, sendo semelhante na forma à costela do atlas, com exceção da área capitular (Fig. 35).

As costelas possuem geralmente duas áreas de contato com as vértebras: uma mais dorsal, chamada tubérculo, e outra mais ventral, chamada capitulo, estas duas áreas são separadas pela incisura capitulo-tubercular. As costelas do eixo possuem estruturas intermediárias entre o par de costelas do atlas e as demais cervicais pós-axiais. Possuem uma área tubercular, mais curta, e outra capitular que mantém articulação com a vértebra. Nas demais costelas tanto o capitulo quanto o tubérculo articulam-se com suas respectivas vértebras.

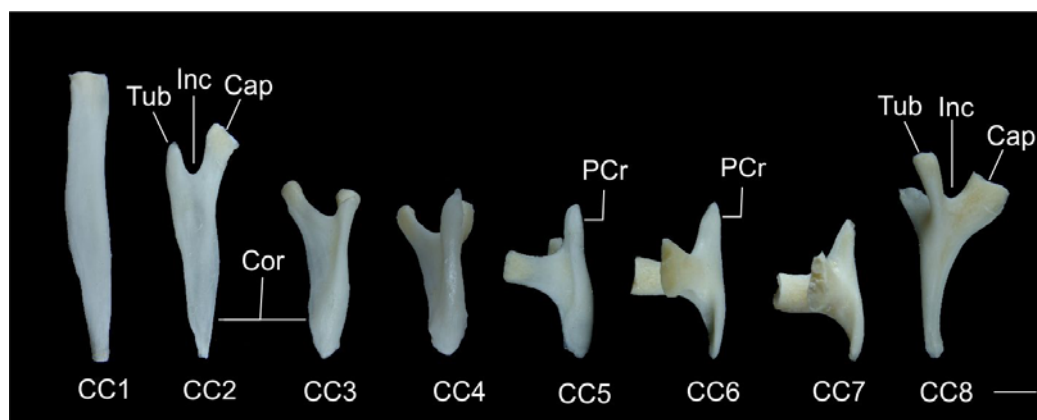


Figura 35: Costelas cervicais de *Melanosuchus niger*, desarticuladas em vista ventral. Abreviaturas: Cap, capitulo; CC1-8, costelas cervicais 1-8; Cor, corpo da costela; Inc, incisura capitulo-tubercular; PCr, processo cranial; Tub, tubérculo. Escala: 5 mm.

Os pares de costelas cervicais III a VIII são muito semelhantes entre si, diferindo apenas em alguns aspectos. Cada costela consiste de um eixo que estende horizontalmente, paralelo a coluna vertebral por meio de uma projeção cranial, o processo cranial costal e uma projeção caudal, o corpo com face medial côncava (Figs. 36C, D). Nestas costelas, o tubérculo é ligeiramente mais longo que o capítulo. O tubérculo é orientado dorsalmente e o capítulo direcionado medialmente, de modo que cada costela se articula com sua vértebra correspondente, e forma um canal por onde passam vasos sanguíneos paralelo a coluna vertebral (Fig. 36). Além disso, o corpo da costela sobrepõe a projeção cranial da costela seguinte (Fig. 36C).

O corpo da oitava costela alonga-se ventrolateralmente, enquanto o processo cranial costal apresenta-se mais curto em relação às demais costelas (Fig. 35).

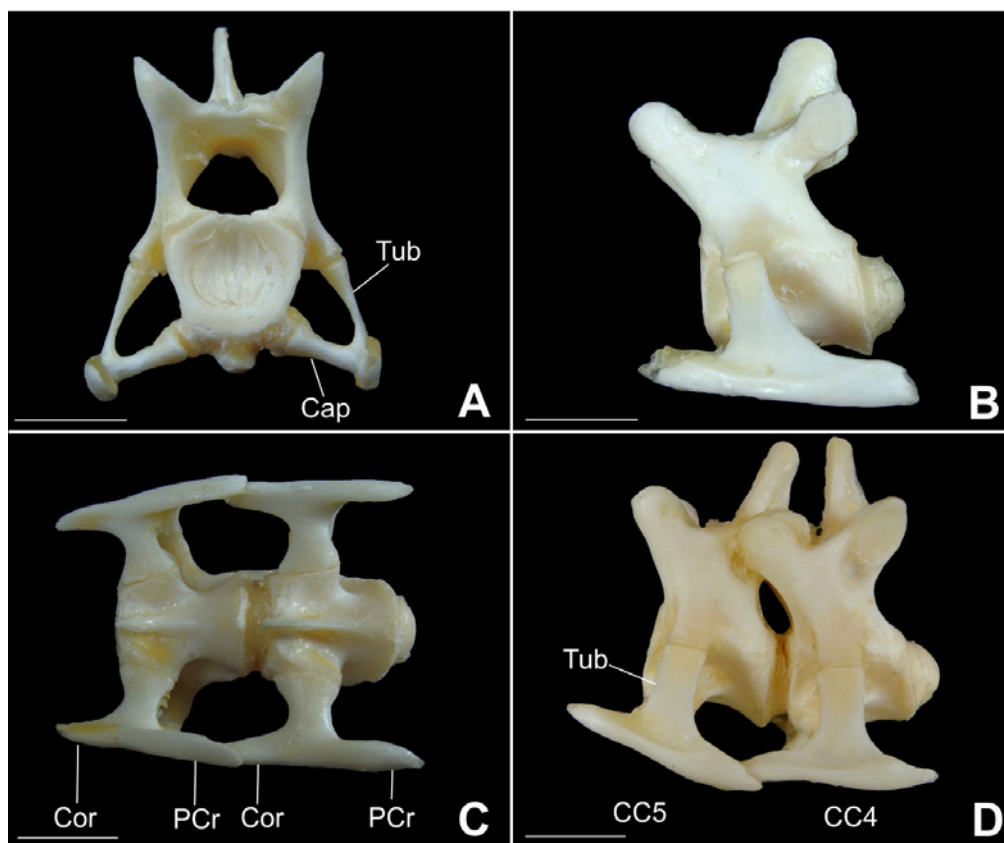


Figura 36: Costelas cervicais de *Melanosuchus niger*. Vista caudal (A) e lateral (B) da sexta costela articulada com sua respectiva vértebra. Vista ventral (C) e lateral (D) da quarta e quinta costelas articuladas com suas respectivas vértebras. Abreviaturas: Cap, capítulo; CC5-4, costelas cervicais 5-4; Cor, corpo da costela; PCr, processo cranial costal; Tub, tubérculo. Escala: 10 mm.

Costelas dorsais

No *M. niger* há 13 pares de costelas dorsais, a primeira e as três últimas possuem extremidades completamente livres (Fig. 38B), enquanto as outras se conectam diretamente ao esterno (Figs. 37, 38). Durante a preparação do esqueleto os dois últimos pares foram perdidos, sendo portanto, visíveis apenas na figura 50G.

As costelas dorsais são longas, robustas e arqueadas. Esta curvatura aumenta gradativamente ao longo da coluna vertebral no sentido craniocaudal. Estas estruturas nada mais são do que o corpo da costela, enquanto o processo cranial costal diminui drasticamente e desaparece a partir da sexta costela dorsal (Fig. 38B). A extremidade articular voltada para a vértebra possui distinta área tubercular e capitular e as superfícies laterais de todas as costelas dorsais são lisas e achatadas (Figs. 37, 38).

O capítulo e tubérculo dos três primeiros pares de costelas dorsais possuem área capitular e tubercular para articulação com a vértebra, semelhante às costelas cervicais pós-axiais (Fig. 37B). Nas demais costelas, com a expansão gradual das parapófises, ao longo das vértebras dorsais, o capítulo das costelas, se posiciona cada vez mais dorsal. O tubérculo regride e a incisura capítulo-tubercular deixa de existir. Os últimos três pares de costelas dorsais possuem apenas uma pequena superfície articular, com área capitular extremamente reduzida (Fig. 37).

Nas extremidades distais das costelas dorsais está presente o processo uncinado. São elementos cartilagíneos pouco ossificados, planos e longos, que conectam entre si por meio de cartilagem com formato de ‘L’. Se estendem até o esterno com quem fazem forte conexão. Esta estrutura confere grande flexibilidade durante a respiração. Na costela dorsal 1, o processo uncinado é reduzido a uma minúscula barra estreita, pouco ossificada, que não se conecta com o esterno. Nas últimas três costelas este processo é ausente (Fig. 38).

Esterno

O esterno se resume a uma interclavícula completamente ossificada na porção ventral e mediana e uma cartilagem esternal e abdominal pouco ossificada, nas quais as costelas dorsais estão conectadas por meio do processo uncinado (Fig. 38).

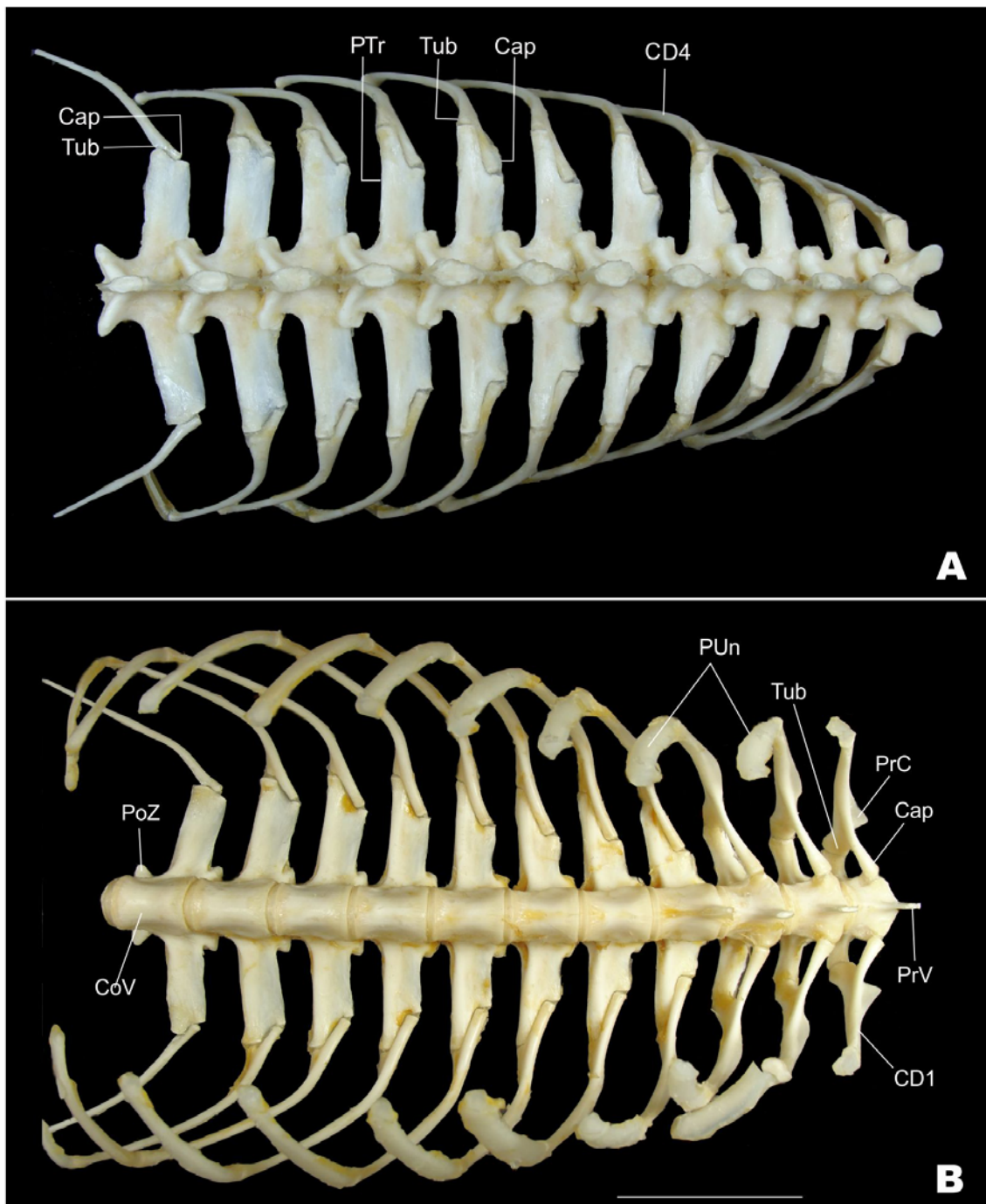


Figura 37: Costelas e vértebras dorsais de *Melanosuchus niger*. Vista dorsal (**A**) e vista ventral (**B**). Abreviaturas: Cap, capitulo; CD1, costela dorsal 1; CD4, costela dorsal 4; CoV, corpo vertebral; PoZ, pós-zigapófise; PrC, processo cranial; PTr, processo transversus; PrV, processo ventral; Tub, tubérculo; PUn, processo uncinado. Escala: 50 mm.

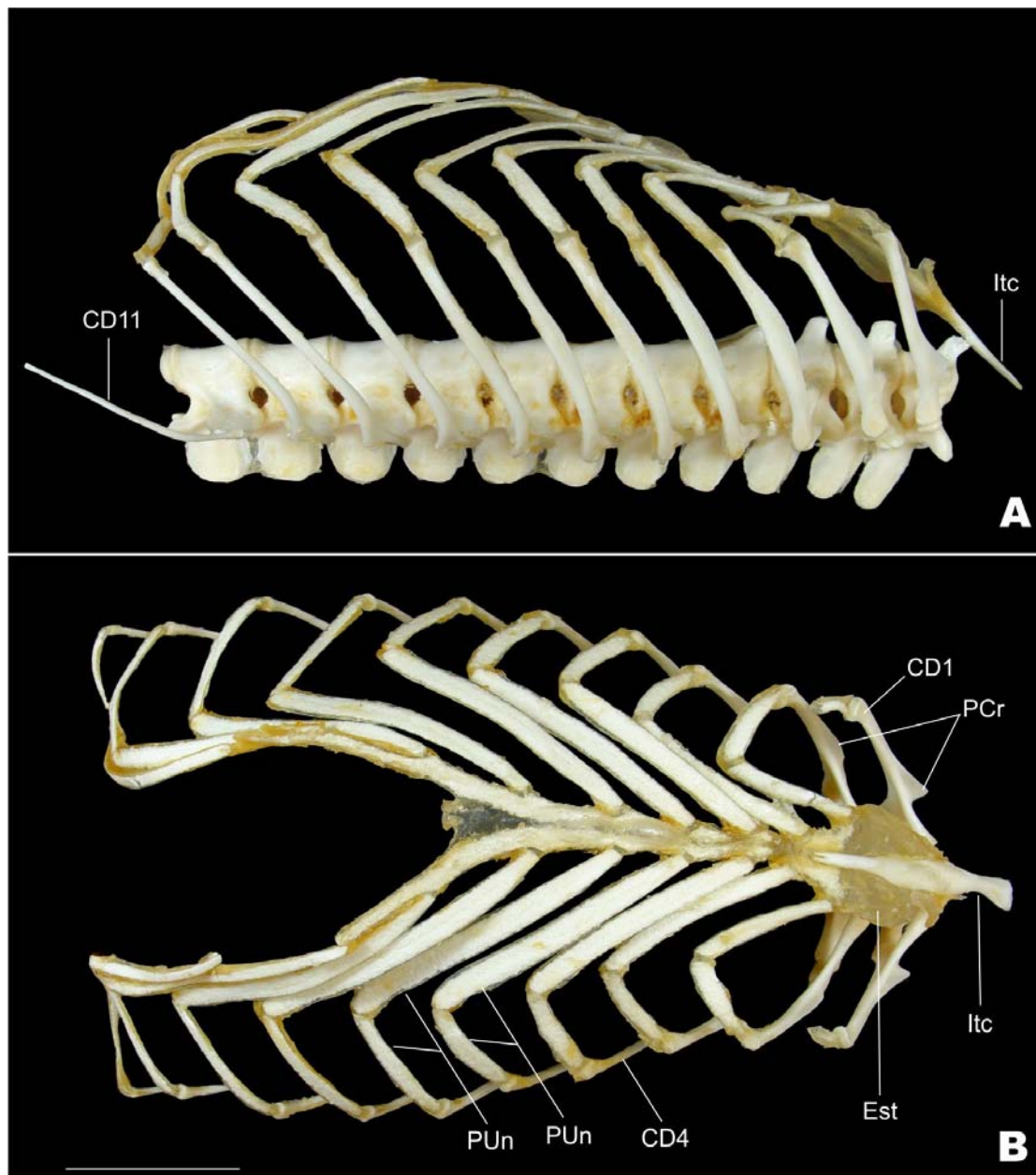


Figura 38: Costelas, processo uncinado e esterno de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A) e vista ventral (B). Abreviaturas: CD1, costela dorsal 1; CD4, costela dorsal 4; CD11, costela dorsal 11; Est, esterno; Itc, interclavícula; PrC, processo cranial; PUn, processo uncinado. Escala: 50 mm.

Gastrália

É formada por um conjunto de ossos finos localizados entre o púbis e a região caudal do esterno. Organizam-se em sete fileiras de ossos em forma de “V” com o ápice direcionado cranialmente. Cada estrutura é formada por quatro ossos. No entanto,

apresentam um padrão alongado e bastante afilado. Estas estruturas não se articulam com nenhum outro elemento ósseo (Fig.39).



Figura 39: Gastrália de *Melanosuchus niger* em vista ventral. Escala: 20 mm.

Coluna vertebral

A coluna vertebral possui cerca de 63 vértebras ligadas umas as outras por meio de articulações. Pode ser dividida em quatro regiões: cervical, dorsal, lombar, sacral e caudal.

Vértebras cervicais

Esse segmento constitui-se de oito vértebras, sendo as vértebras III-VIII de forma similar. O atlas e áxis são as primeiras vértebras deste segmento da coluna vertebral (Figs. 40, 41). São modificadas morfológicamente, o que permite articulação da coluna com o crânio e a passagem de vasos e nervos. O proatlas, juntamente com o processo odontóide do áxis, sustentam a articulação com o côndilo occipital.

Atlas: Sua forma diferenciada pode ser demonstrada nos elementos que o constitui, na ausência de um processo espinhoso e de um corpo vertebral distinto. O atlas é composto por quatro elementos interligados entre si, são eles: proatlas, um par de arco neural e o intercentro (Fig. 40).

O intercentro localiza-se na porção ventral. Sua região cranial é côncava e forma uma superfície de articulação com o côndilo occipital. Lateralmente possui um pequeno contato com o par de arcos neurais. Na face dorsocaudal articula-se amplamente com o eixo. O proatlas forma um arco convexo a semelhança de um “V” invertido. Articula-se com a porção do exoccipital que forma a borda dorsal do forame magno. Ventralmente contata-se com o processo articular cranial dos arcos neurais (Fi. 40).

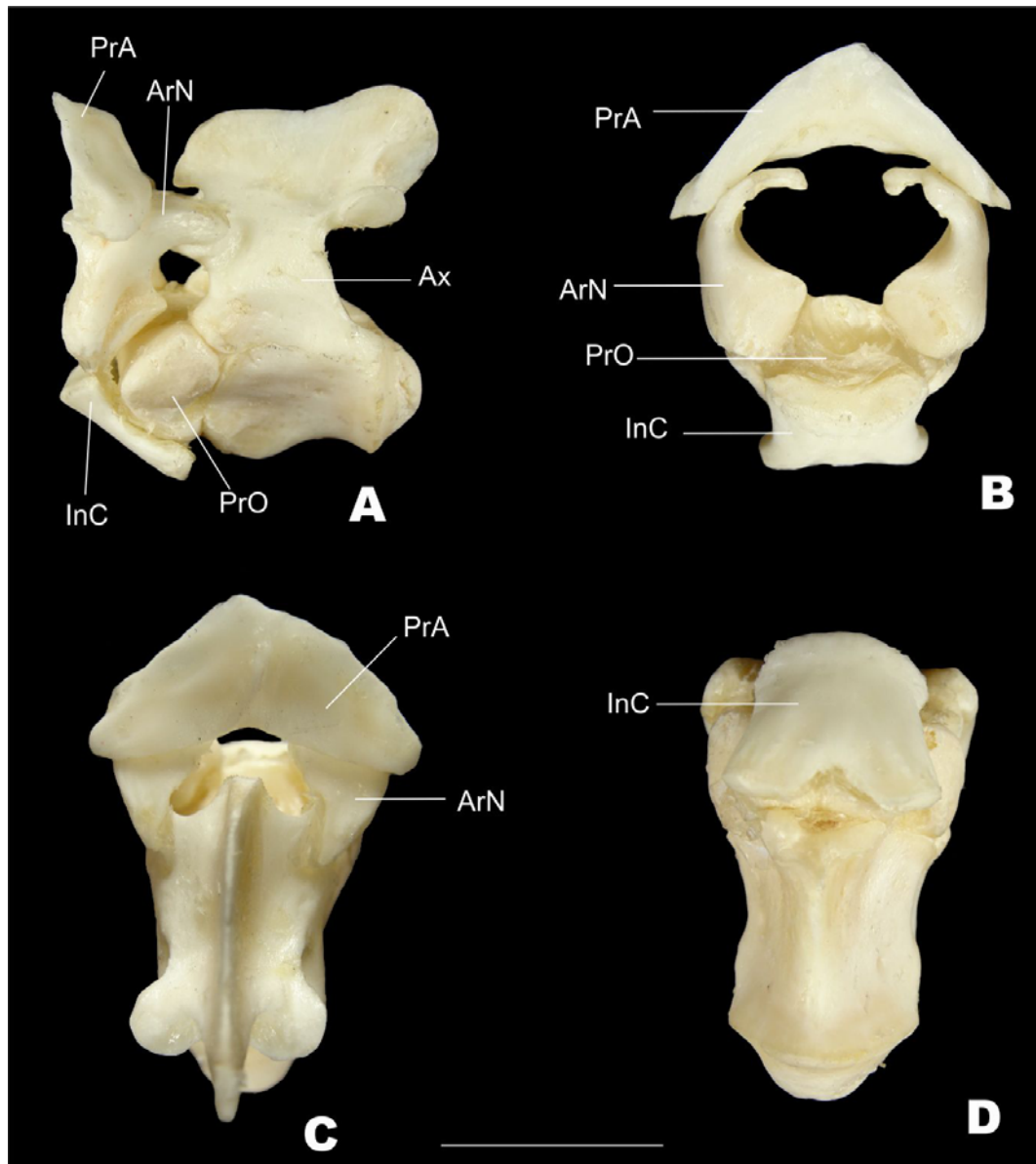


Figura 40: Atlas articulado com o eixo de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista cranial (B), vista dorsal (C) e vista ventral (D). Abreviaturas: PrA, proatlas; ArN, arco neural; InC, intercentro; PrO, processo odontóide; Ax, eixo. Escala: 20mm.

O par de arco neural é bem visível lateralmente e possui formato irregular. A porção ventral, mais robusta, articula-se com o processo odontóide do eixo e a extremidade dorsal, laminar, contata com o processo articular cranial do eixo. Dorsalmente os arcos neurais não se articulam com o seu contralateral. Dorso-caudalmente os arcos neurais curvam-se medialmente e formam duas pós-zigapofises para articulação com a pré-zigapofise do eixo (Fig. 40).

Áxis: Trata-se de uma vértebra característica, exceto pela particularidade da existência de um processo odontóide (Figs. 40A, B, 41). Contata com a borda ventral de cada um dos arcos neurais e com a face dorsal do intercentro. Caudalmente possui uma pequena fovea para articulação com o capítulo da segunda costela cervical. O processo espinhoso, que parte do arco neural, mostra-se curto e alongado craniocaudalmente. Projeta-se além da pós-zigapofise do eixo caudalmente e além do limite dos arcos neurais cranialmente. A superfície pré-zigapofise do eixo, onde há a articulação com o atlas, possui formato muito peculiar. A pós-zigapofise apresenta-se bem definida, como nas demais vértebras, onde sua face articular é voltada ventralmente de encontro com a superfície articular pré-zigapofise da terceira vértebra cervical.

O arco neural apresenta-se levemente alongado, tanto vertical como horizontalmente e contribui com a formação das paredes látero-dorsal do canal vertebral. Ventralmente, por meio da sutura neurocentral, articula-se com o corpo vertebral e cranialmente com o processo odontóide (Fig.41A). A faceta de articulação do capítulo da segunda costela cervical articula-se em parte com o processo odontóide e com a superfície cranial do corpo vertebral do eixo (Fig. 41).

Vértebras cervicais C3 a C8: Nas vértebras cervicais C3 a C8, apesar da semelhança em seu aspecto geral, algumas diferenças ocorrem (Fig. 42). Ao longo da série, elas são caracterizadas pela largura e altura do processo espinhoso. Nas vértebras C3 a C5, este processo é mais largo que as demais. Particularmente, o processo espinhoso da C3 é mais curto dorsoventralmente e mais largo craniocaudalmente do que a de qualquer outra vértebra cervical. O processo espinhoso da C8 é mais alto, o que a torna, também, distinta das demais (Fig. 42).

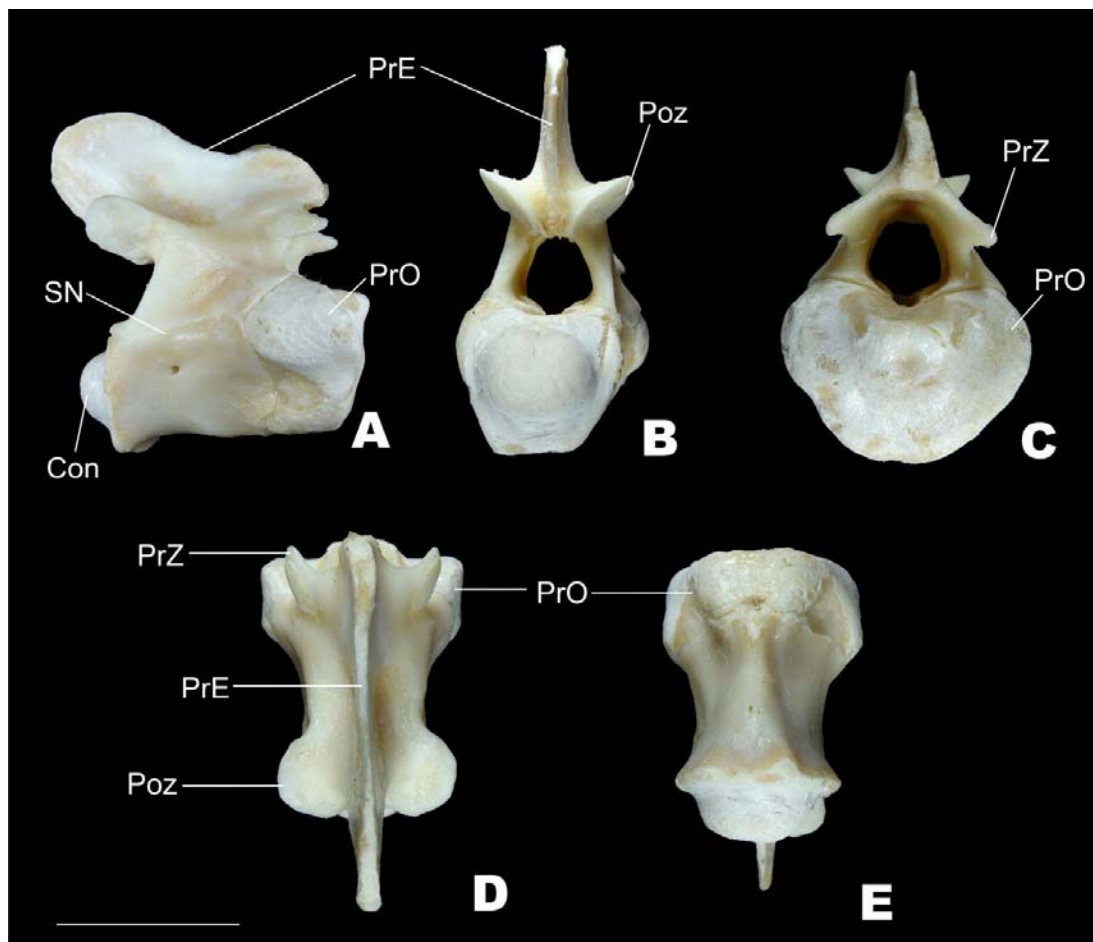


Figura 41: Áxis de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista caudal (B), vista cranial (C), vista dorsal (D) e vista ventral (E). Abreviaturas: Con, côndilo vertebral; PrE, processo espinhoso; PrO, processo odontóide; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; SN, sutura neurocentral. Escala: 20mm.

Os processos articulares craniais, pré-zigapófise, estão bem definidos e dirigem-se cranialmente, com sua face articular voltada dorsalmente de encontro com a superfície articular caudal. A pós-zigapófise, cuja superfície articular está voltada ventralmente e orientado caudalmente, proporcionando um encaixe perfeito entre as vértebras (Fig. 42). No arco neural, junto à sutura neurocentral, existe uma pequena protuberância, cuja superfície é chamada de diapófise. É onde se encaixa a porção tubercular da costela cervical. Mais ventralmente, no corpo vertebral, localiza-se outra protuberância, cuja superfície é chamada de parapófise. É o local de encaixe da porção capitular da costela. Essas superfícies de articulação se alargam gradativamente no sentido craniocaudal. Ventralmente, o corpo vertebral possui uma protuberância em forma de quilha situada no plano sagital, o processo ventral. Este processo é curto nas vértebras C2 a C5, mas torna-se robusto nas vértebras C6 a C8 (Fig. 42).

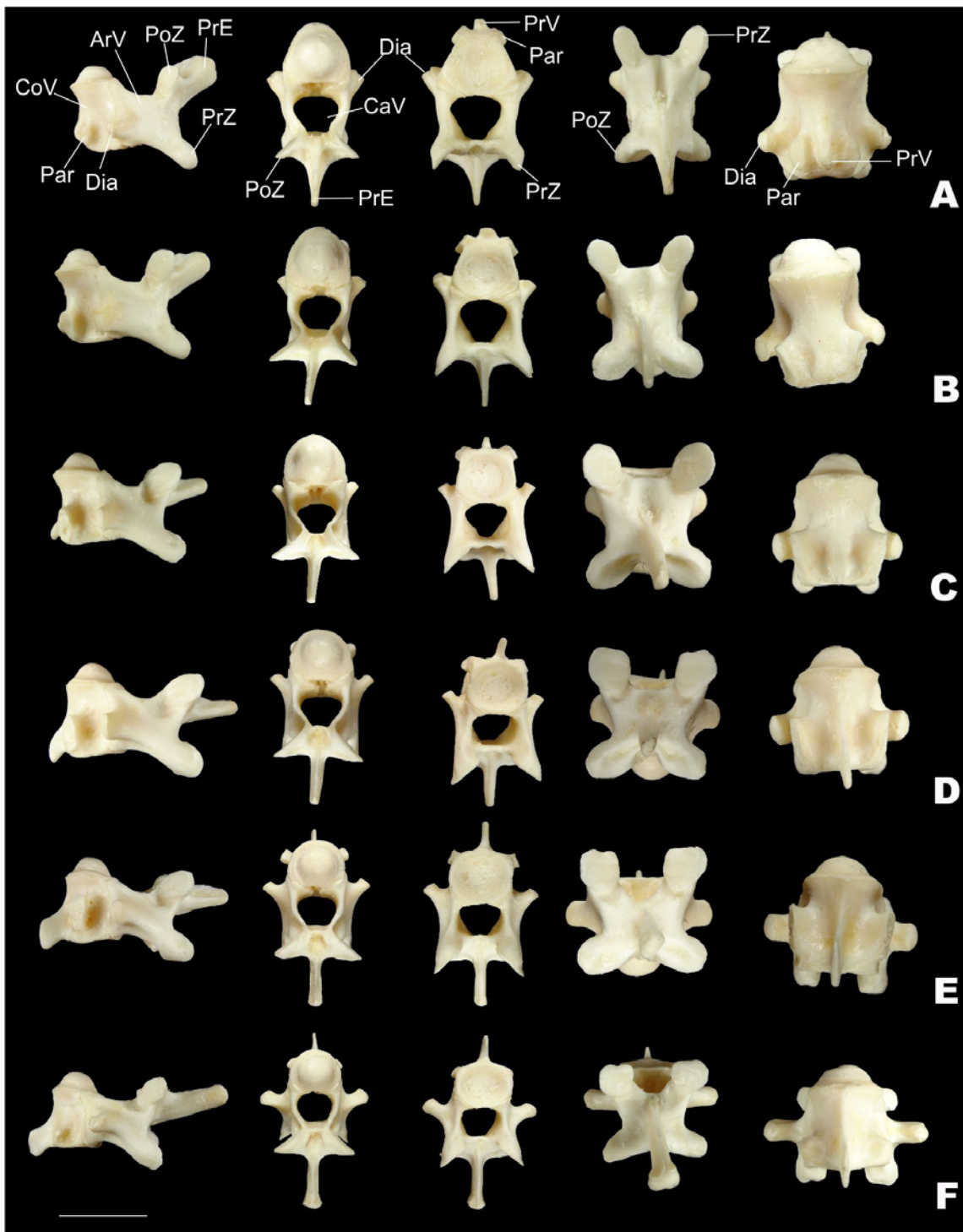


Figura 42: Vértex cervicais de *Melanosuchus niger*, em vista, da esquerda para direita lateral, caudal, cranial, dorsal e ventral. Vértex cervical III (A), Vértex cervical IV (B), Vértex cervical V (C), Vértex cervical VI (D), Vértex cervical VII (E) e Vértex cervical VIII. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; PrE, processo espinhoso; CoV, corpo vertebral; Par, parapófise, Dia, diapófise; Cav, canal vertebral; PrV, processo ventral. Escala: 20 mm.

Vértebras dorsais

Esse segmento da coluna é composto por 13 vértebras articuladas com as costelas dorsais (Figs. 37, 43).

A primeira vértebra dorsal é muito semelhante à última cervical. O processo espinhoso equivale a mais da metade da altura dorso-ventral da vértebra. Esta é mais estreita craniocaudalmente que as demais vértebras dorsais. As diapófises são mais robustas e longas que nas vértebras cervicais e forma um ângulo de 90° com o arco neural. As parapófises também são bem reduzidas, assim como na oitava vértebra cervical, e o processo espinho mais inclinado caudalmente (Fig, 37, 38A).

As vértebras dorsais D2 e D3 são também muito parecidas com a primeira vértebra dorsal; difere apenas em proporção, onde o processo espinho e processo ventral são mais largos. O processo ventral apresenta angulação de 90°. É válido ainda ressaltar que este processo regrediu na quarta vértebra dorsal e nas demais desaparece completamente (Figs. 37, 38A). A partir da quinta vértebra dorsal, o corpo vertebral apresenta-se com uma estrutura semelhante a um carretel e não mais se observa o processo ventral. Estas características são importantes na identificação dessas vértebras (Figs. 37B, 38A). A diapófise é mais longa e a parapófise ainda existe, porém bastante reduzida (Fig. 37).

Os processos espinhosos são mais largos craniocaudalmente, ao longo deste segmento da coluna (Figs. 38A, 43A). As superfícies de articulação das pré e pós-zigapófises nas vértebras dorsais obedecem a um plano praticamente horizontal (Fig. 37).

A diapófise e parapófise migraram gradualmente para uma posição mais dorsal no decorrer da coluna vertebral. A diapófise, localizada mais dorsalmente nas vértebras cervicais migrou até ficar aproximadamente na mesma linha dorso-ventral das zigapofises. Já a parapófise saiu da posição média do centro vertebral e migra até ficar posicionado imediatamente cranial à diapófise. Ambas, diapófise e parapófise formaram os processos transversos das vértebras dorsais na maior parte da extensão da coluna dorsal (Fig. 37).

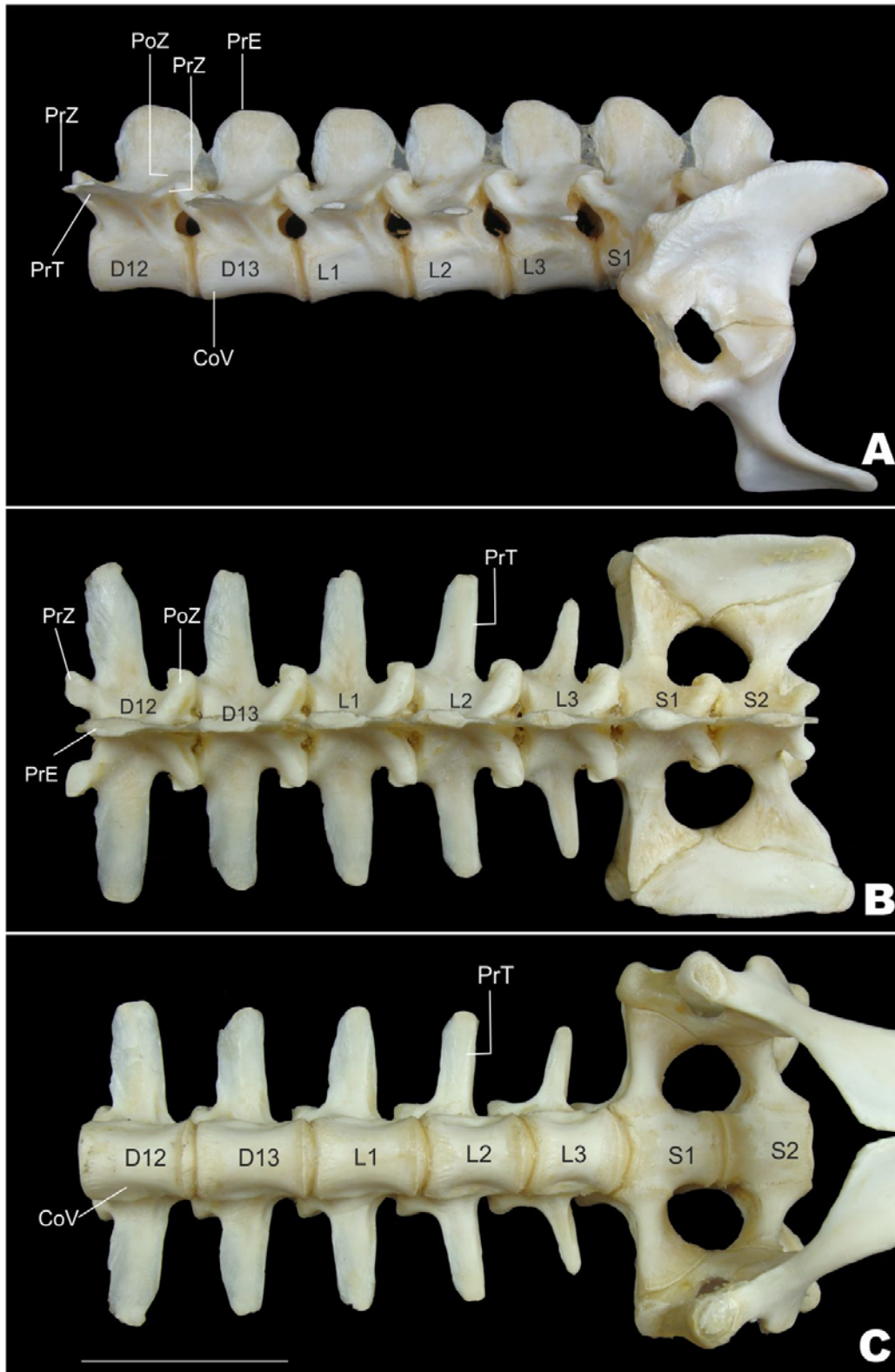


Figura 43: Vértex lombares e sacrais de *Melanosuchus niger* em vista lateral (A), vista dorsal (B) e vista ventral (C). Abreviaturas: PrE, processo espinhoso; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; PrT, processo transversal, CoV, corpo vertebral; L1-5, vértebras lombares 1-5; S1-2, vértebra sacral 1-2; D12-D13, vértebra dorsais D12-D13. Escala: 40 mm.

Vértebras lombares

As três vértebras lombares assemelham-se com as últimas vértebras dorsais, exceto que neste segmento da coluna não se observa mais facetas articulares para as costelas. Seus processos transversos tornam-se mais estreitos e diminui o comprimento gradualmente (Fig. 43).

A borda caudo-lateral do corpo vertebral da última vértebra lombar possui uma pequena superfície de articulação para borda cranio-medial da primeira costela sacral. O corpo vertebral é considerável, também apresenta-se comprimido na região mediana, dando à estrutura um formato de carretel, mas o seu comprimento diminui gradualmente (Fig. 43).

Vértebras sacrais

Essa região é formada por apenas duas vértebras. O corpo vertebral apresenta-se ainda mais comprimido do que as vértebras dorsais, com a superfície ventral aproximadamente plana. O arco neural e o corpo vertebral situam-se medialmente ao ílio. O processo espinhoso e as zigapófises são como na região lombar (Figs. 43B, C).

Possuem costelas sacrais muito robustas e fundidas com suas respectivas vértebras. A costela sacral possui formato de pirâmide truncada, com extremidades triangulares orientadas látero-dorsalmente, fortemente suturada à porção cranial e caudal da asa do ílio (Figs. 43B, C).

Vértebras caudais

A primeira vértebra caudal é biconvexa, apenas esta é anficélica, as demais são procélicas (Fig. 44). Além desta peculiaridade, as vértebras caudais são também caracterizadas pela presença de processos hemais. Estes elementos estão posicionados ventralmente, e articulam-se com a extremidade caudal da primeira vértebra e com a extremidade cranial da segunda vértebra. Os processos hemais, ao longo da cauda do animal, diminuem de comprimento gradativamente a medida que se aproxima da extremidade distal da cauda (Fig. 45).

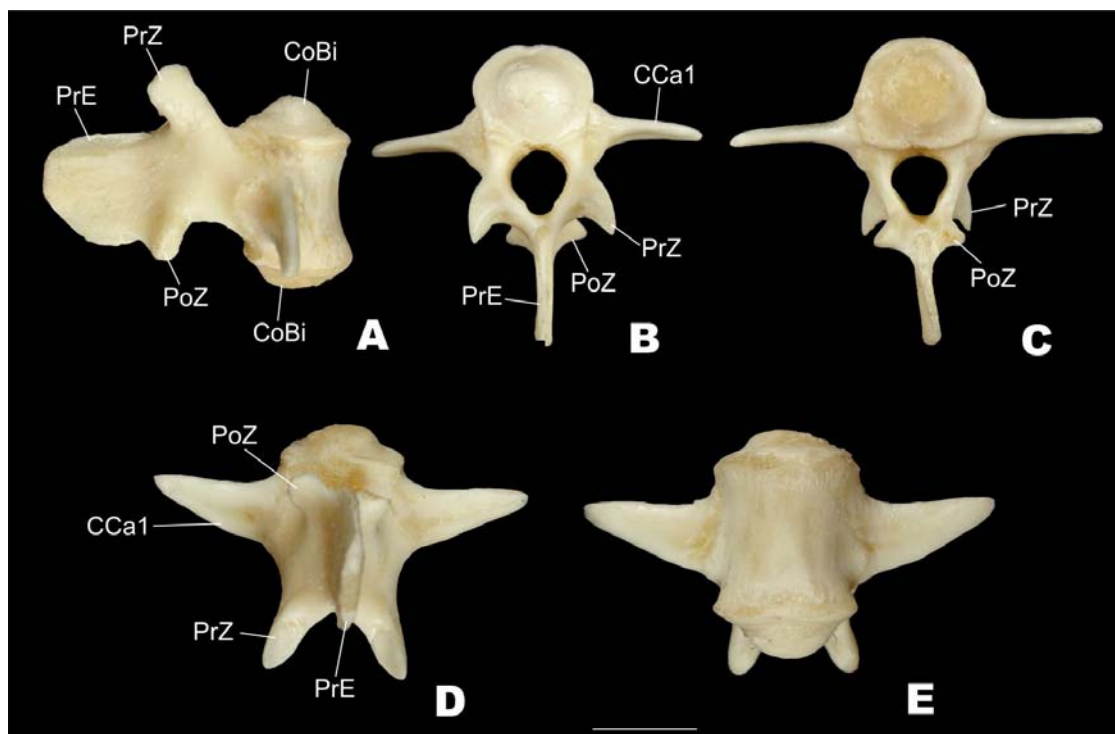


Figura 44: Primeira vértebra caudal de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista cranial (B), vista caudal (C), vista dorsal (D), vista ventral (E). Abreviaturas: CCa1, costela caudal 1; CoBi, côndilo biconvexo; PoZ, pós-zigapófise; PrZ, pré-zigapófise; PrE, processo espinhoso. Escala: 20mm.

As seis primeiras costelas caudais são amplas e fortemente unidas nas suas respectivas vértebras. Caudalmente a esse ponto, eles se tornam menores em comprimento lateral. A partir da décima nona vértebra caudal as costelas tornam-se completamente ausentes (Figs. 45B, C). Na altura da articulação neurocentral, é possível observar os sinais das suturas entre a costela e vértebra caudal, enquanto as demais sofrem sinostose completa.

As zigapófises das primeiras cinco vértebras caudais são longas e estreitas. Elas diminuem gradualmente de comprimento ao longo da cauda, especialmente as pós-zigapofises. Devido a essa alteração, a partir da décima oitava vértebra caudal, as pós-zigapofises situam-se entre as pré-zigapófises e não acima destas (Fig. 45).

Os processos espinhosos mais craniais, são largos e altos até a nona vértebra caudal. A partir desta, eles se tornam bastante estreitos, porém, ainda se mantêm altos. A partir da vigésima oitava vértebra, esse elemento começa a regredir seu comprimento e torna-se diminuto nas últimas vértebras caudais (Fig. 45A). O corpo vertebral, naturalmente, torna-se comprimido lateralmente ao longo da cauda do animal (Fig. 45).

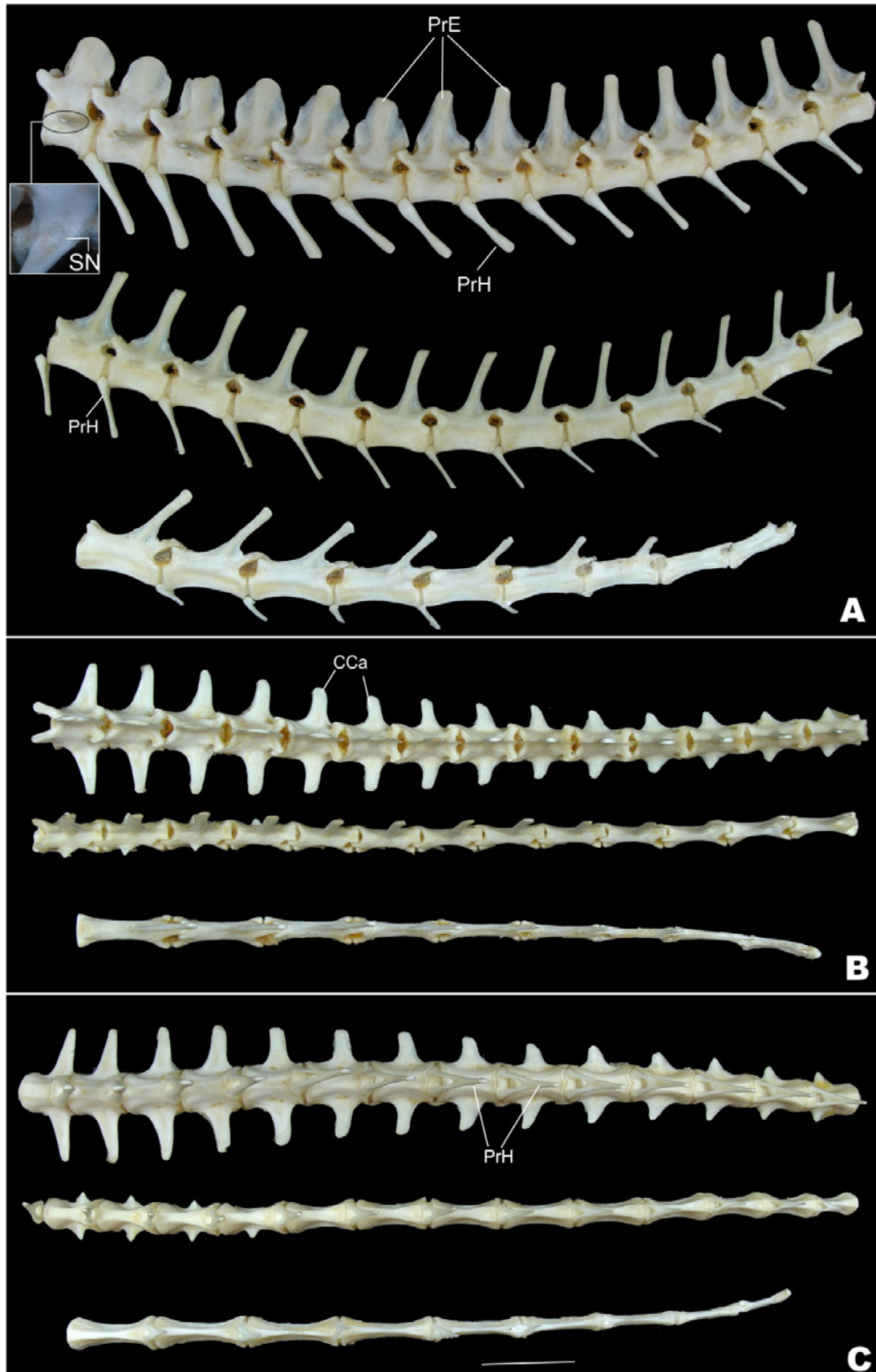


Figura 45: Vértèbras caudais de *Melanosuchus niger*. Vista lateral (A), vista dorsal (B) e vista ventral (C). Abreviaturas: CCa, costela caudal; PrE, processo espinhoso; PrH, processo hemal; SU, sutura neurocentral. Escala: 40mm.

Padrão de formação condrogênica

Durante o estágio 7, centros de formação cartilaginosa aparecem em algumas vértebras. A princípio fica difícil definir quais vértebras iniciaram seu desenvolvimento, mas é possível observar que a progressão dessa condensação segue no sentido crânio-caudal. Esta condensação se dá, primeiramente, nos arcos vertebrais e é visivelmente mais forte nas regiões cervicais e dorsal, seguindo pelas regiões lombar, sacral e, por último, a região caudal. Estes elementos da coluna surgem como estruturas pareadas que crescem em direção à linha mediana dorsal (Figs. 46A,B,C). Nos estágios subsequentes a formação cartilaginosa aumenta gradativamente, porém até o início do estágio 11 os arcos vertebrais ainda permanecem sem fusão na sua extremidade dorsal.

No estágio 12, os elementos pareados dos arcos vertebrais das regiões cervical, dorsal e lombar da coluna, apresentam-se fusionados acima da medula espinhal para formar o arco da vértebra. Logo em seguida, os processos espinhoso e transversos desenvolvem-se a partir de extensões do arco vertebral (Figs. 47A,B,C e 53). A condrogênese se espalha até que uma coluna cartilaginosa se forme e se diferencie nestes processos. As costelas sacrais e caudais se desenvolvem por meio de condensação cartilaginosa independente, e em estágios posteriores contata com a vértebra a nível da sutura neurocentral (Figs. 47D,E,F,G e 54). Quanto maior a aproximação da região caudal, menor a condensação, isso indica uma progressão crânio-caudal de desenvolvimento destas estruturas (Fig. 46).

Entretanto, os processos espinhosos apresentam maior retenção de azul de Alcian nas últimas cervicais e nas primeiras dorsais. O desenvolvimento do arco vertebral bem como seus processos se desenvolvem de forma semelhante ao longo da coluna vertebral.

O atlas diverge fortemente na morfologia em comparação com as demais vértebras cervicais, com um intercentro curto, dois arcos neurais e um proatlas. Destes, apenas o par de arco neural e o intercentro mostraram retenção de azul de Alcian como uma pequena condensação cartilaginosa no estágio 12. O proatlas se desenvolve a partir de dois focos condrogênicos distintos em cada antímero no fim do estágio 13 (Fig. 49A). Estes se fundem a partir do estágio 22.

No corpo vertebral a condensação cartilaginosa inicia-se pelo centrum e espalha-se de encontro ao arco neural, com o qual se une em estágios mais avançados, para

formar a vértebra cartilaginosa. Da mesma forma que o arco neural, a progressão de desenvolvimento desta estrutura é crânio-caudal (Fig. 46).

Ventral ao corpo das primeiras vértebras caudais surgem pequenas condensações cartilagueas que representam os processos hemais em forma de “V”, no fim do estágio 12 e procede caudalmente. Estes processos localizam-se entre cada corpo vertebral e seu desenvolvimento não acompanha o do corpo vertebral, pois este segue mais adiantado (Figs. 46D,E,F,G e 54C,D,E,F,G e H).

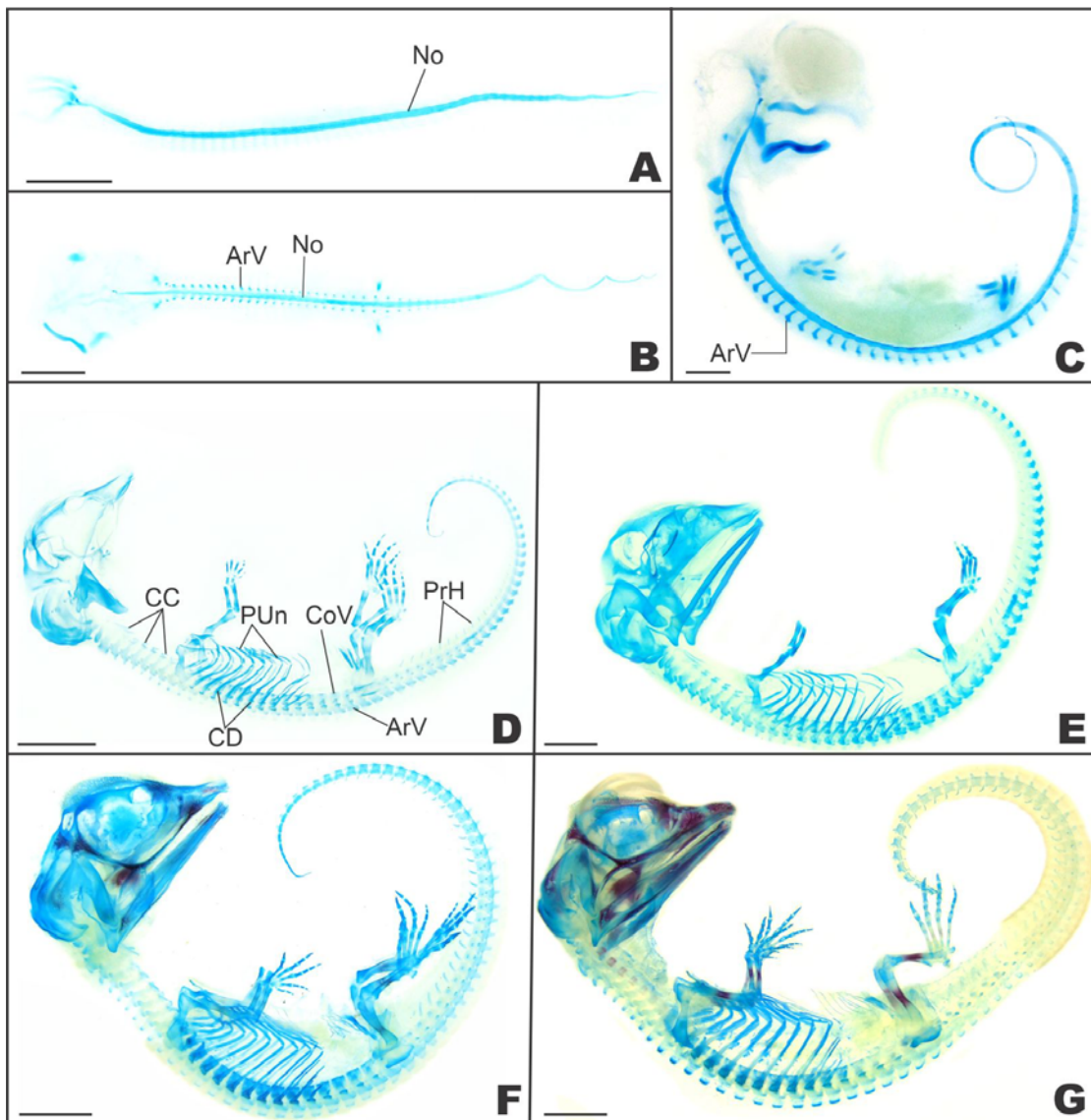


Figura 46: Condogenese do esqueleto axial pós-cranial de *Melanosuchus niger* em vista dorsal (A e B) e vista lateral (C-G). (A) estágio 7, (B) estágio 8, (C) estágio 10, (D) início estágio 13, (E) fim estágio 13, (F) início estágio 16, (G) estágio 19. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CC, costela cervical; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; No, notocorda; PUn, processo uncinado. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: A, B, C 3mm; D, E, F, G 5mm.

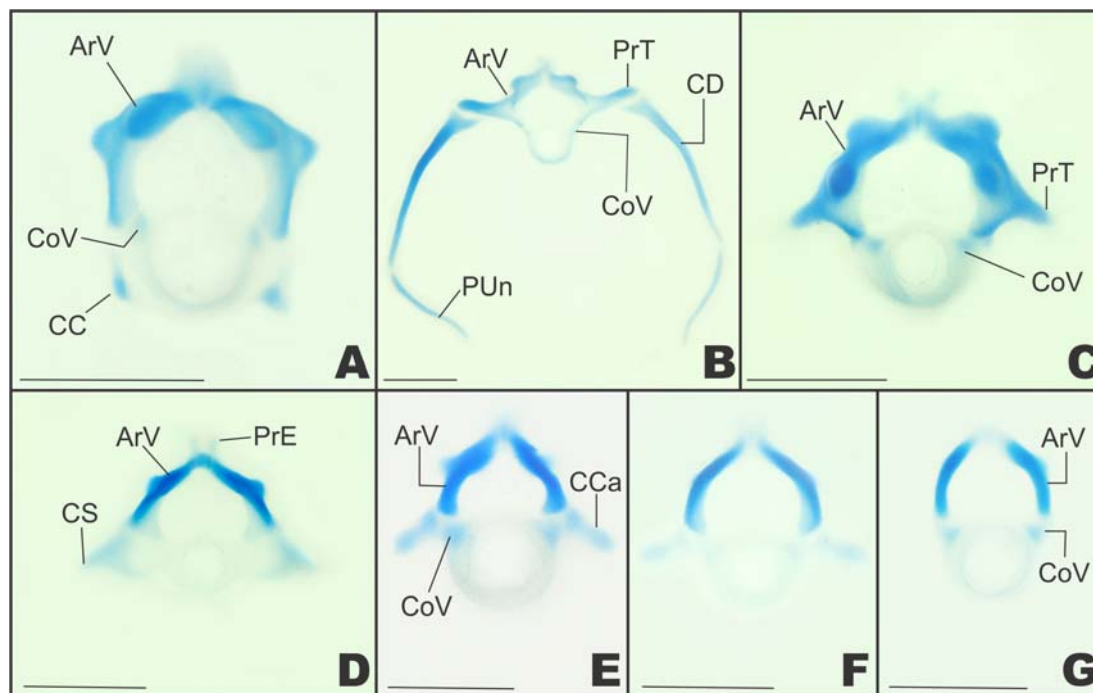


Figura 47: Condrogênese de vértebras de *Melanosuchus niger* no final estágio 12, vista cranial. (A) vértebra cervical, (B) vértebra dorsal, (C) vértebra lombar, (D) vértebra sacral, (E) vértebra caudal cranial, (F) vértebra caudal média, (G) vértebra caudal distal. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CC, costela cervical; CCa, costela caudal; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; CS, costela sacral; PrE, processo espinhoso; PrT, processo transvers; PUn, processo uncinado. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 1mm.

Ainda no fim do estágio 12, tanto as costelas cervicais como as dorsais já apresentam formação condrogênica, sendo as dorsais mais adiantadas (Figs. 46, 49). Notou-se também, o processo uncinado já em desenvolvimento cartilágneo, porém ainda solto na região abdominal (Figs. 46D, E, F,G), sua conexão com o esterno só ocorre no fim do estágio 16, com o desenvolvimento deste no início do estágio 16 (Figs. 50A,C).

No início do estágio 13, observou-se o desenvolvimento de mais cinco processos hemais, porém com condensação cartilágnea bem suave. E no fim deste estágio, o corpo vertebral apresenta-se mais definido, aparece também corpo vertebral nas quatro primeiras vértebras caudais.

No fim do estágio 14, apresenta mais quatro costelas caudais, a partir da décima quinta vértebra caudal. A partir desta vértebra, estas costelas reduzem-se e não

são mais observadas. As vértebras caudais vão se desenvolvendo gradativamente no sentido crânio-caudal. Com a condesação do arco vertebral primeiro, depois o corpo vertebral e logo em seguida os processos espinhosos e costela, esta última quando presente (Fig. 46). O processo de formação cartilágnea está resumido no quadro 7 do apêndice.

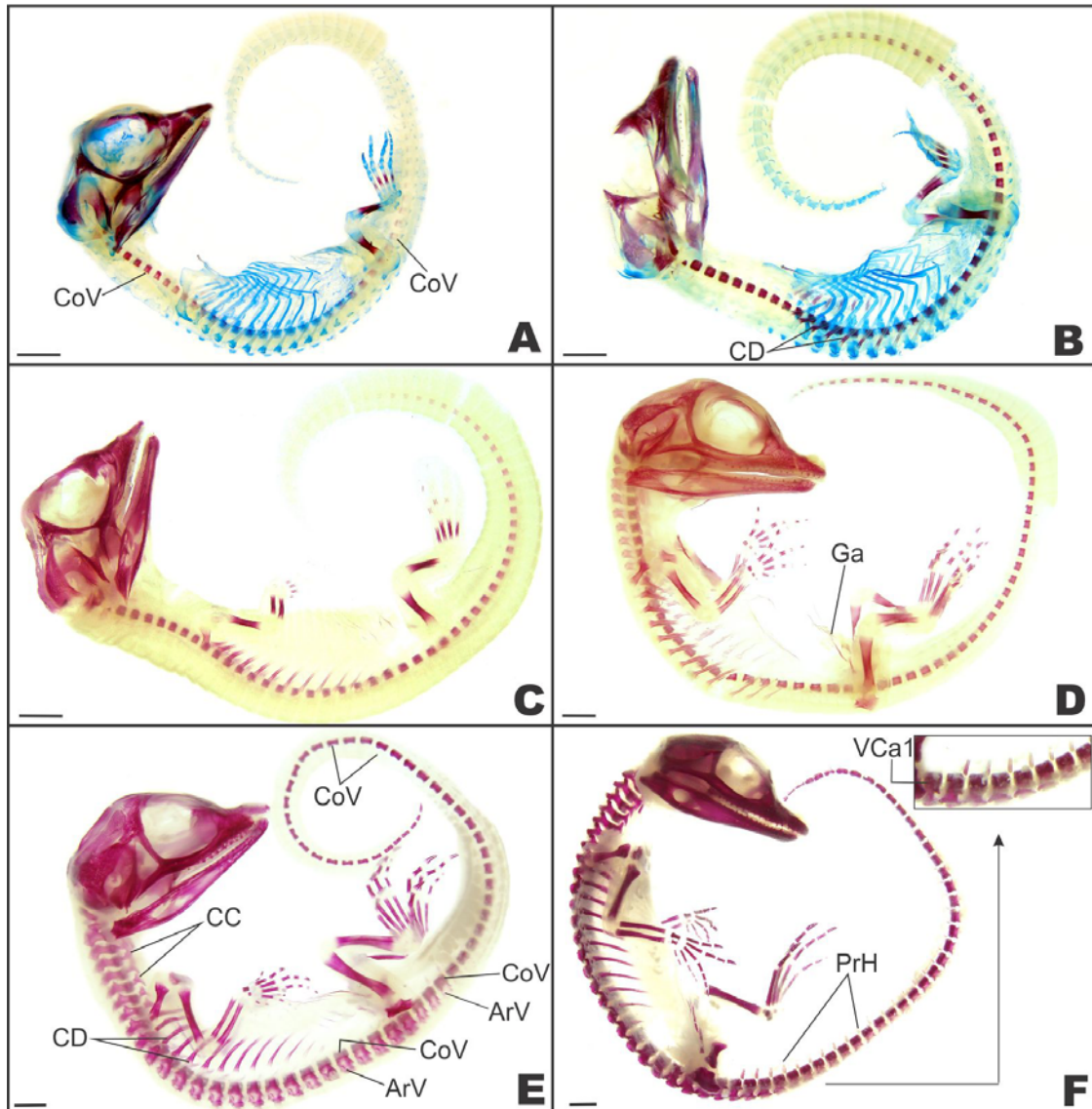


Figura 48: Processo de ossificação do esqueleto axial pós-cranial de *Melanosuchus niger* em vista lateral. (A) início estágio 20, (B) fim estágio 21, (C) estágio 22, (D) início estágio 24, (E) fim estágio 25, (F) estágio 28. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; VCa1, vértebra caudal 1; CC, costela cervical; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; PrH, processo hemal. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5mm.

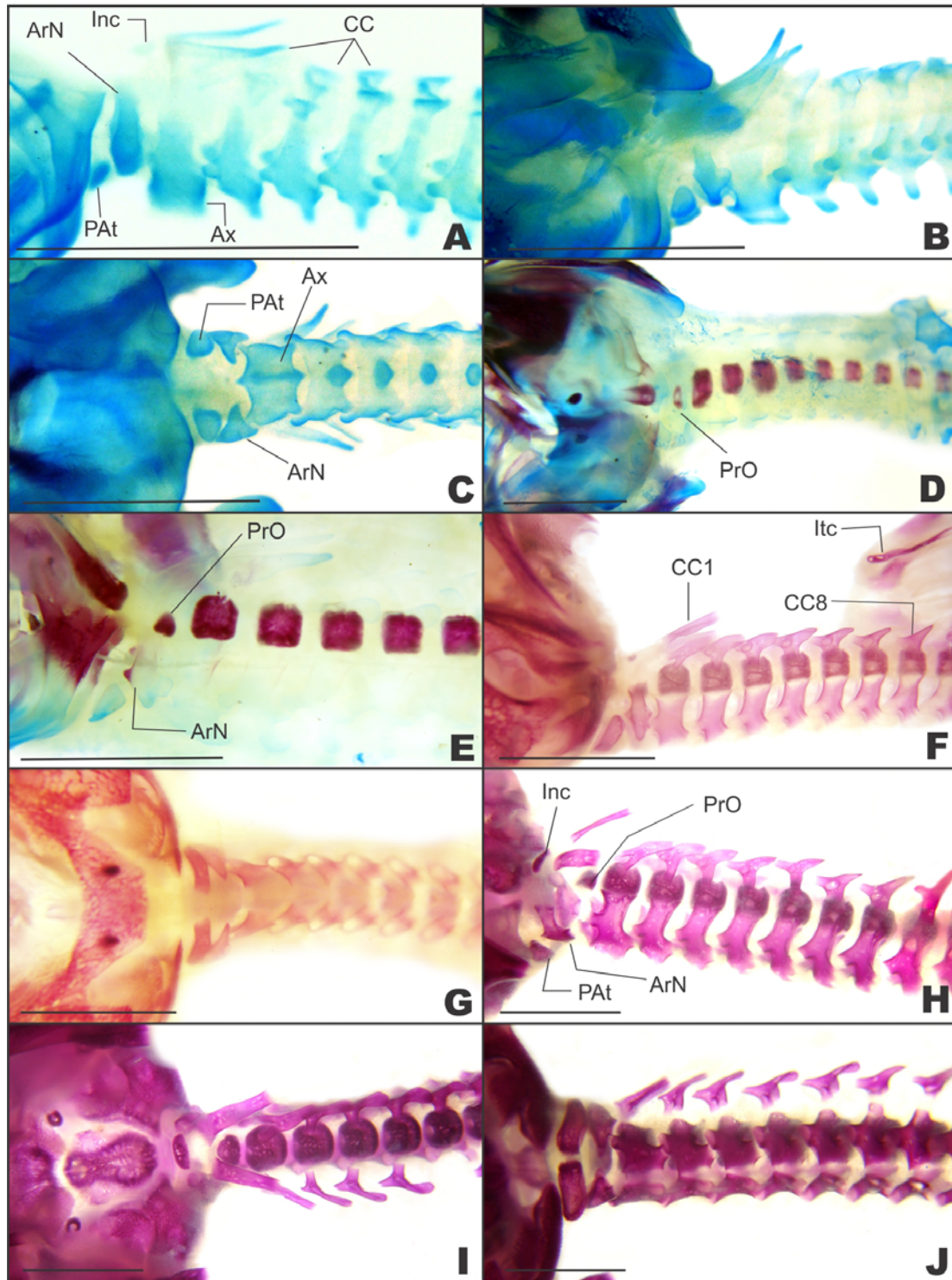


Figura 49: Condrogênese e ossificação de embriões de *Melanosuchus niger* em vista lateral. (A) fim estágio 13, (B) início estágio 16, (C) início estágio 16, (D) início estágio 20, (E) fim estágio 20, (F) início estágio 24, (G) início estágio 24, (H, I e J) fim estágio 25. Abreviaturas: ArN, arco neural; Ax, eixo; CC, costela cervical; CC1, costela cervical; CC8, costela cervical 8; Inc, intercentro; Itc, interclavícula; Pat; proatlas; PrO, processo odontóide. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5mm.

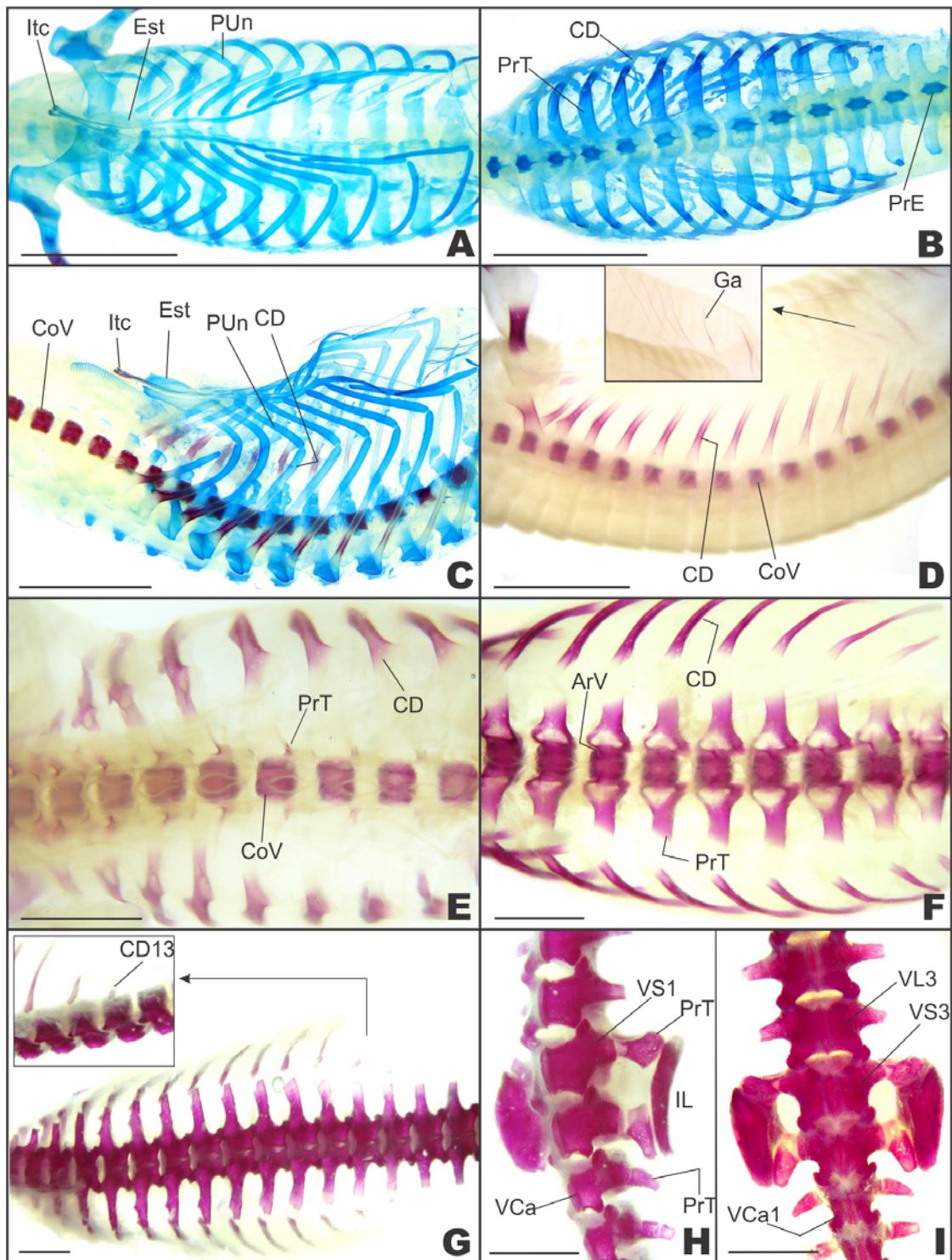


Figura 50: Condrogênese e ossificação de embriões *Melanosuchus niger* em vista lateral. (A e B) estágio 19, (C) início estágio 22, (D) fim estágio 22, (E) início estágio 24, (F) fim estágio 25, (G, H e I) estágio 28. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; Est, esterno; Ga, gastrália; IL, ílio; Itc, interclavicula; PrT, processo transversal; PUn, processo uncinado; VCa1, vértebra caudal 1, VL3, vértebra lombar 3; VS1, vértebra sacral 1. Diafanização por KOH e coloração com vermelho de alizarina e azul de alcian. Escala: 5mm.

Padrão de ossificação

O processo de ossificação inicia-se pelo corpo das vértebras cervicais 3 a 8 no estágio 19 (Figs. 46G, 53B, C). O grau de retenção de alizarina diminui nas últimas, o que indica um sentido crânio-caudal de desenvolvimento ósseo, assim como visto no desenvolvimento cartilágneo. Ainda no estágio 19 observa-se um pequeno centro de ossificação na extremidade cranial da interclavícula (Figs. 50A, C). No início do estágio 20, o processo odontóide apresenta centro de ossificação e no fim desse estágio o par de arcos neurais do atlas começa seu desenvolvimento por meio de dois centros de ossificação, sendo um em cada antímero (Figs. 49D, E). As demais estruturas permaneceram, temporariamente, cartilágneas.

Logo no início do estágio 21 todas as vértebras dorsais, lombares, sacrais e as 10 primeiras caudais apresentaram centros de ossificação no corpo vertebral. Além disso, as sete primeiras costelas dorsais iniciaram seu desenvolvimento ósseo, enquanto as costelas cervicais permaneceram cartilágneas (Fig. 48B).

No estágio 22, o proatlas apresenta dois centros de ossificação, um em cada antímero e no estágio 26 eles se fundem, formado o proatlas como no adulto. O processo de ossificação dos arcos vertebrais foi observado, pela primeira vez, nas vértebras cervicais 2 e 3, também no estágio 22, a partir de dois centros de ossificação, um em cada antímero (Fig. 48C).

A partir do estágio 23, o desenvolvimento ósseo dos arcos vertebrais continua em sentido crânio-caudal nas vértebras cervicais, seguido pelas vértebras dorsais e lombares nos estágio 25 a 28 (Fig. 48D,E,F e 53F, H). Dos componentes do atlas, o intercentro é o último a apresentar centros de ossificação, isso ocorre no estágio 24 (Fig.49F).

No início do estágio 26, os arcos vertebrais da maioria das vértebras caudais apresentaram centros de ossificação. Ainda neste estágio, na região cervical, iniciou-se fusão destes elementos com formação dos primeiros processos espinhosos, estes se desenvolvem em continuidade com o arco vertebral. Progride também em um sentido crânio-caudal.

Nos cortes histológicos da gastrália e interclavícula de *M. niger*, em vários estágios de desenvolvimento, foi possível observar que estes elementos se desenvolvem de forma intramembranosa (Fig. 51). Os elementos ósseos que formam a gastrália são de número variável, alongados e bastante afilados, e começam a se ossificar no estágio

22 (Fig. 50D). Cada elemento da gastrália se forma a partir de um único centro de ossificação. Até o final do período embrionário se organizam em fileiras e se unem na linha mediana com formato de “V” com ápice direcionado cranialmente.

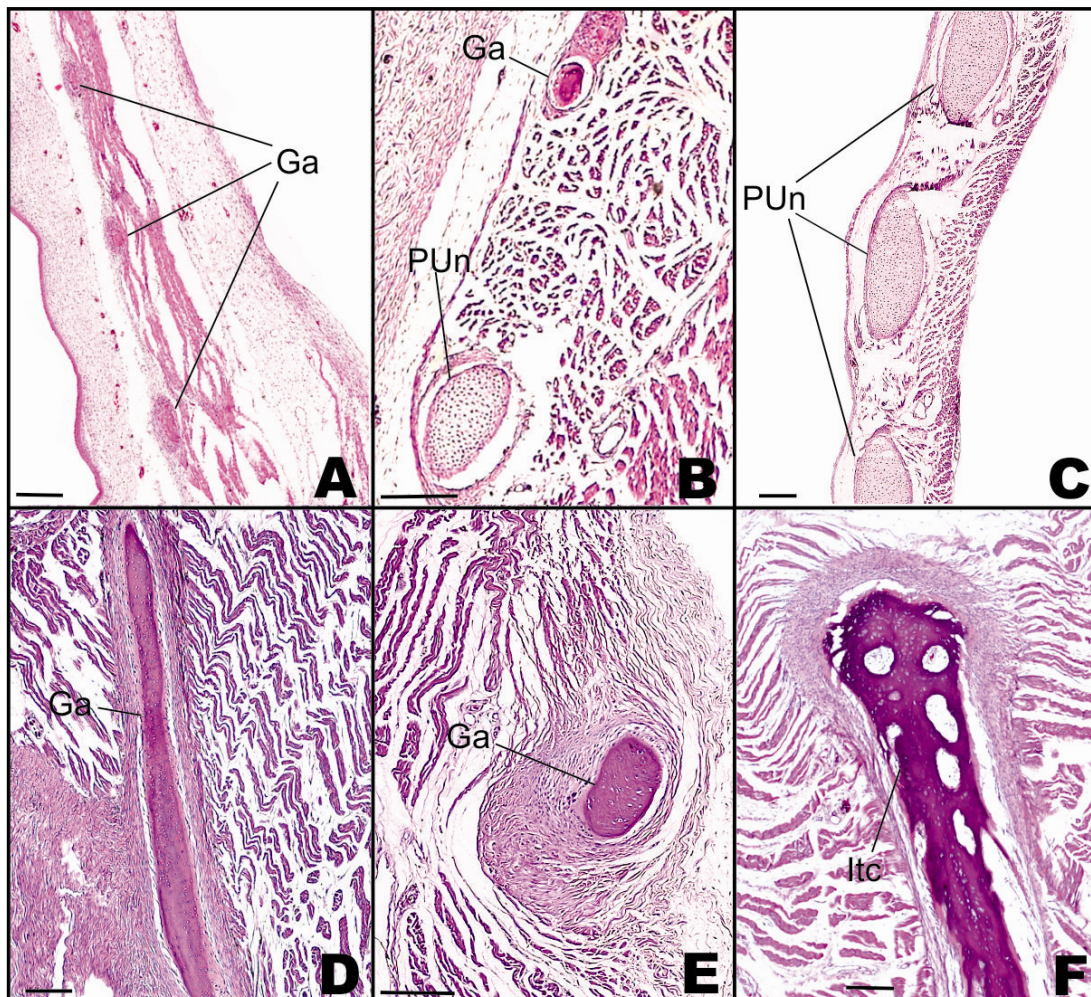


Figura 51: Cortes histológicos da gastrália e processo uncinado de *M. niger*. (A) fim estágio 16, (B e C) fim estágio 24, (D e E) início estágio 27, (F) início estágio 25. Abreviaturas: Ga, gastrália; Itc, interclavícula; PUn, processo uncinado. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barra 200µm.

Ao final do estágio 23 todas as costelas cervicais e dorsais apresentaram centros de ossificação bem como o corpo vertebral da maioria das vértebras caudais. As costelas cervicais são mostradas com maiores detalhes nas figuras 49 F, H, I, J e 53A, B, C. Também nestas imagens as pré e pós-zigapófises já podem ser distinguidas nas vértebras cervicais. Os primeiros processos hemais apresentam centros de ossificação no fim estágio 25 (Fig. 48E).

No estágio 24, os processos transversos das vértebras dorsais já apresentam centros de ossificação bem discretos, também em continuidade com o arco vertebral (Fig.50E, F e 53 F). Nas vértebras lombares os processos transversos surgem a partir do estágio 25, também em continuidade com o arco e em sentido crânio-caudal (Fig.53H). Ainda no estágio 25, há presença de centros de ossificação nas costelas sacrais e caudais (Fig. 48E e 54B). Nas figuras 50H, I e na figura 52, é possível observar um pequeno espaço entre a costela e vértebra, nas regiões sacral e caudal. Isto indica que a sinostose não ocorre no período pré-natal.

No fim do período pré-natal, no estágio 27, nota-se o início de fusão dos arcos vertebrais em todas as vértebras dorsais, com formação do processo espinhoso. E no início do estágio 28 já é possível observar o desenvolvimento da maioria dos processos hemais (Fig. 54D,F,H). O processo de ossificação está resumido no quadro 8 do apêndice.

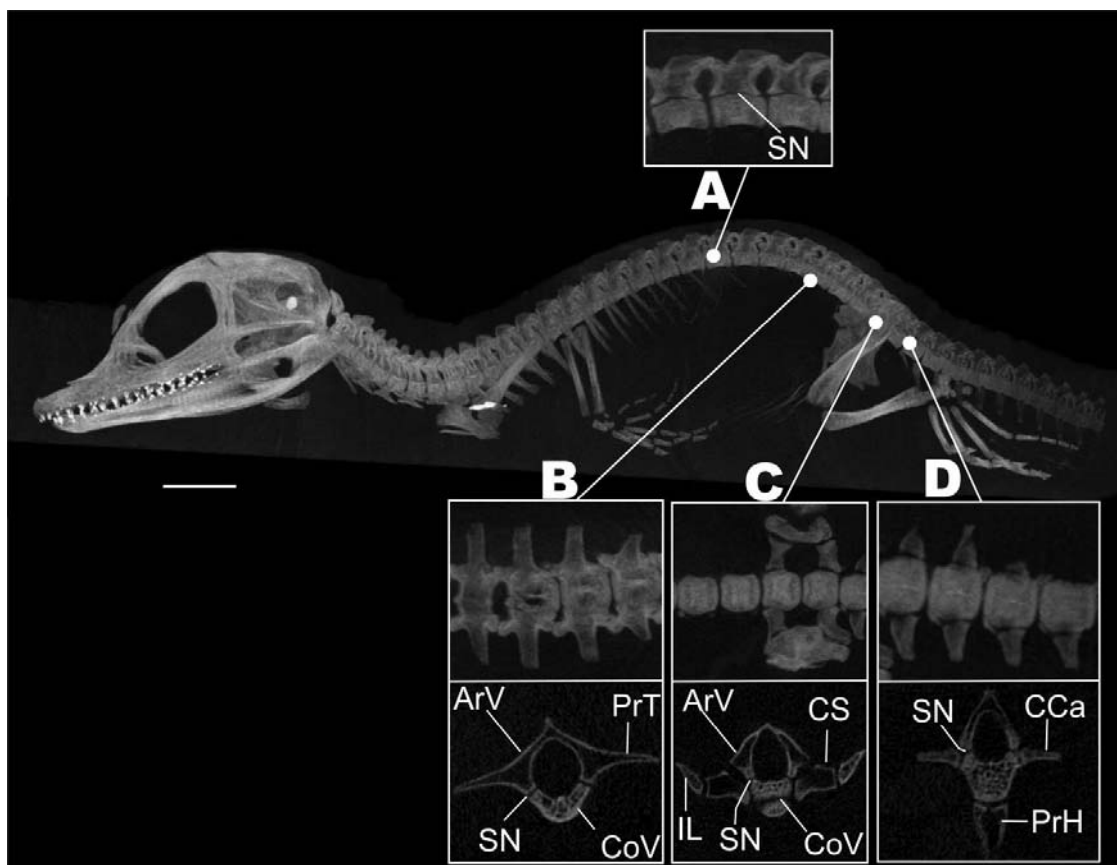


Figura 52: Embrião de *Melanosuchus niger* no estágio 28, vista lateral. (A) segmento da coluna dorsal, (B) segmento da coluna lombar, (C) segmento da coluna sacral, (D) segmento da coluna caudal. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CCa, costela caudal; CoV, corpo vertebral; CS, costela sacral; IL, ílio; SN, sutura neurocentral; PrT, processo transversal. Microtomografia e reconstrução 3D. Escala 10mm.

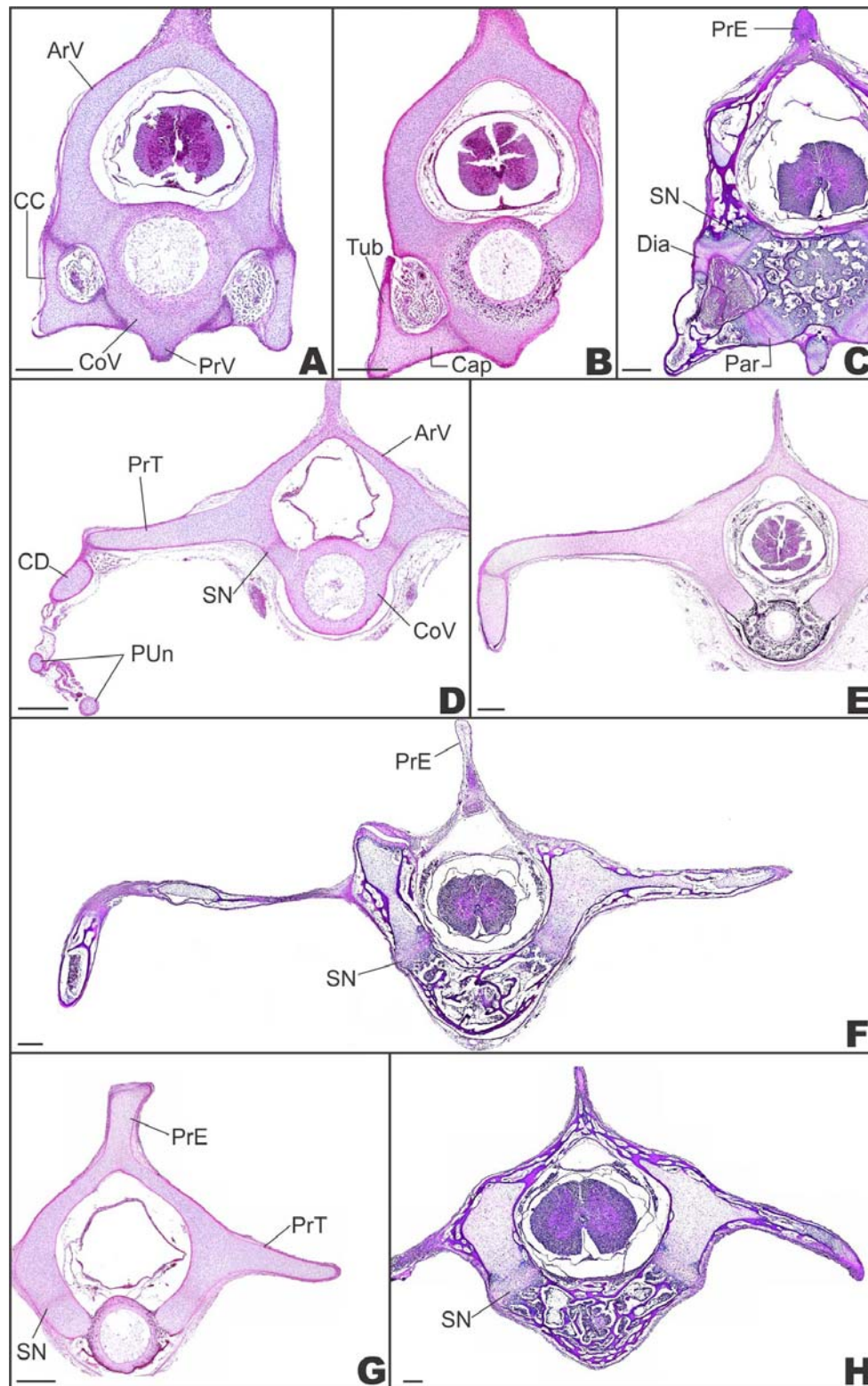


Figura 53: Cortes histológicas de segmentos da coluna cervical (A, B,C), dorsal (D, E, F) e lombar (G, H) de *M. niger*. (A e D) estágio 14, (B e G) estágio 19, (C e F) início estágio 25, (E) fim estágio 24, (H) início estágio 27. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; Cap, capítulo; CC, costela cervical; CD, costela dorsal; CoV, corpo vertebral; Dia, diapófise; SN, sutura neurocentral; Par, parapófise; PrE, processo espinhoso; PrT, processo transversus; PUn, processo uncinado; PrV, processo ventral; SN, sutura neurocentral; Tub, tubérculo. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barra 400µm.

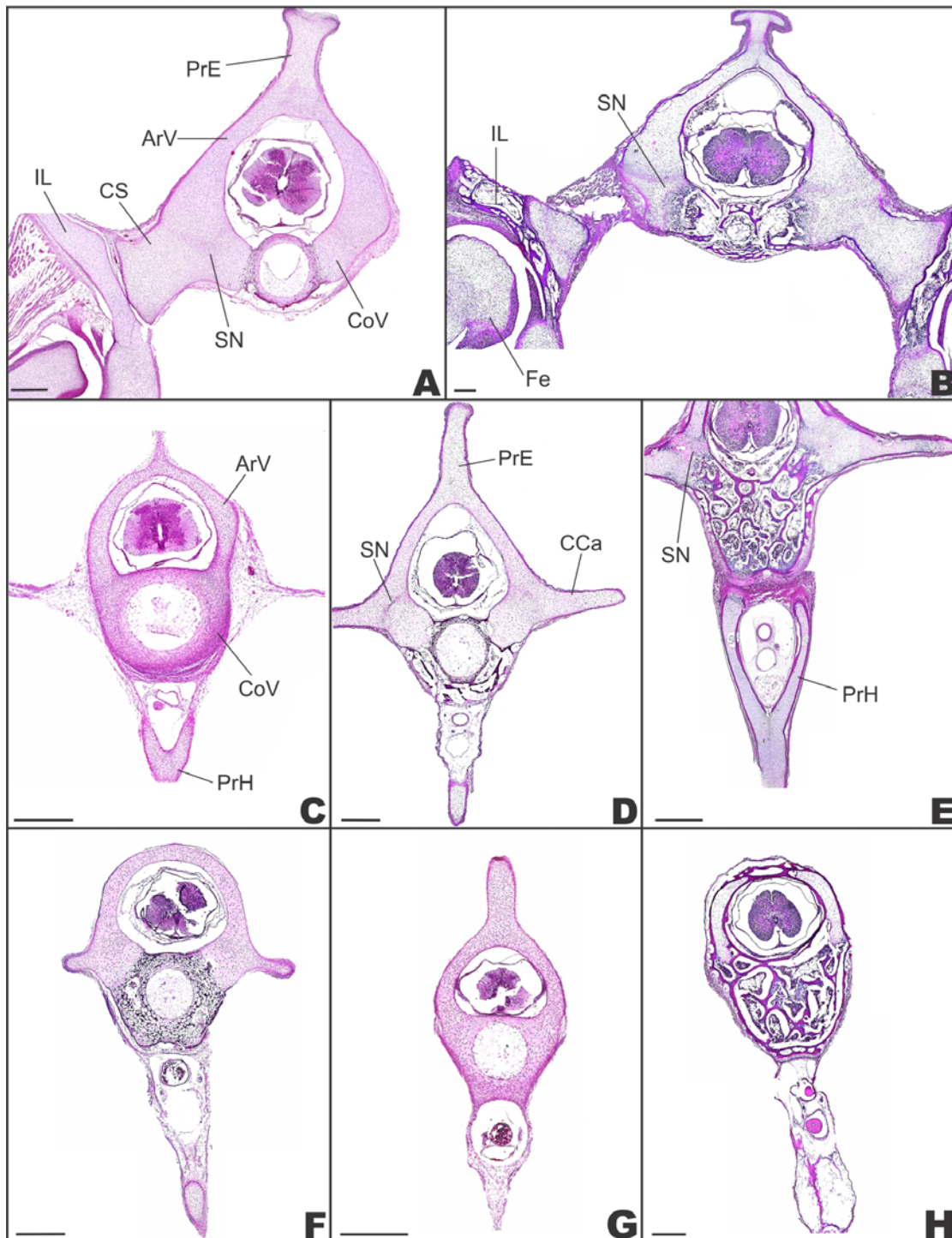


Figura 54: Cortes histológicas de segmentos da coluna sacral (A, B), caudal (C-H) de *M. niger*. (A e G) estágio 19, (B e E) início estágio 25, (C) estágio 14, (D e F) fim estágio 24, (H) início estágio 27. Abreviaturas: ArV, arco vertebral; CCa, costela caudal; CS, costela sacral; CoV, corpo vertebral; Fe, fêmur; PrH, processo hemial; PrE, processo espinhoso; SN, sutura neurocentral. Coloração: Hematoxilina e eosina. Barra 400 μ m.

4.2.3.2 DISCUSSÃO

Vértebras e costelas

A coluna vertebral dos répteis apresenta diferenciações regionais que levam a distinção das vértebras em regiões pré-sacral, sacral e caudal (Romer, 1956). Segundo Krause (1978), a região pré-sacral ainda pode ser subdividida em cervical, dorsal ou torácica e lombar. A coluna vertebral de *M. niger* segue as divisões propostas por Romer (1956), e a região pré-sacral, mais especificamente, as subdivisões propostas por Krause (1978). Estas informações coincidem com as descrições de Lima et al. (2011c) para *C. yacare*, de Rieppel (1993b) para *A. mississippiensis* e de Silva e Verrastro (2007) para *Liolaemus arambarensis*, com exceção da região lombar, não informado nestas duas últimas espécies.

Em *M. niger*, nos estágios iniciais de desenvolvimento, foi difícil discernir em quais vértebras se deu o início da formação cartilágnea, mas foi possível notar que a progressão desses focos condrogênico ocorreu, predominantemente, no sentido crânio-caudal. Esta condensação inicia-se em cada metade dos arcos vertebrais, é visivelmente mais forte nas regiões cervical e dorsal, seguido pelas regiões lombar, sacral e por último a região caudal. Rieppel (1993b), em estudos com *A. mississippiensis*, observou o mesmo padrão. De acordo com Starck (1996), a coluna vertebral de aves e outros amniotas segue o mesmo sentido observado em *M. niger* e *A. mississippiensis*. Maxwell e Larsson (2009) confirmaram esse padrão de formação em estudos com aves das espécies *Dromaius novaehollandiae*, *Struthio camelus*, *Rhea americana* e *Eudromia elegans*.

No segmento cervical, os elementos do atlas no *M. niger*, começam a formação cartilágnea pelo o par de arcos neurais e o intercentro, seguido pelo proatlas. Durante o período de ossificação o proatlas também é o último. As duas primeiras vértebras cervicais, o atlas e áxis são grandemente modificados, e consideravelmente diferentes das vértebras subseqüentes. Estas distinções são bem pontuadas na espécie em questão. É uma característica que se estende aos demais vertebrados terrestres, devido a importância da movimentação independente da cabeça (Souza et al., 2000; Hildebrand e Goslow, 2006; Vieira, 2008). Desta maneira, modificações nas vértebras mais craniais e em sua articulação com o crânio permitem considerável liberdade de movimentos (Romer, 1956). O mesmo ocorre em *C. yacare* (Lima et al., 2011c), *C. serpentina* (Sheil

e Greenbaum, 2005), *A. spinifera* (Sheil, 2003) e *L. arambarensis* (Silva e Verrastro, 2007).

Ainda, a respeito do atlas, é interessante ressaltar que se pode encontrar dois tipos morfológicos de intercentro em *Crocodylia*. O primeiro tipo, encontrado em *M. niger*, apresenta um intercentro tão longo quanto largo, e possui uma extremidade caudal bifurcada onde se articulam o primeiro par de costelas cervical, este formato também é visto nos caimans, como por exemplo, *Caiman latirostris*, *Caiman Crocodylus* (Mook, 1921) e *Caiman yacare* (Lima et al., 2011c). No segundo tipo, sua largura predomina em relação ao comprimento, este é o tipo de intercentro encontrado em *Crocodylus americanus* e em *Gavialis gangeticus* (Mook, 1921). Esta característica pode contribuir para auxiliar na elucidação de algumas relações filogenéticas com outras espécies da ordem *Crocodylia* viventes, bem como entre espécies já extintas.

É válido salientar que no *M. niger* bem como em *C. yacare* (Lima et al., 2011c), cranialmente ao corpo vertebral do eixo destaca-se o processo odontóide com centro de ossificação bem distinto e separado do corpo do eixo. Nos esqueletos preparados de *M. niger* é possível observar claramente a sutura entre estes elementos do eixo. Isto é resultado do desenvolvimento individual do processo odontóide, tanto na formação cartilágnea quanto no processo de ossificação (Fig. 49). Este elemento juntamente com o atlas compõe a articulação com o único côndilo occipital presente nos *Crocodylia*. Para Hildebrand e Goslow (2006) esta é uma característica presente nos demais répteis. Segundo Romer (1956), o processo odontóide é um elemento complexo, resultado da fusão do corpo vertebral do atlas com o intercentro do eixo, e ligado ao corpo vertebral do eixo por uma sutura visível no adulto. Mook (1921) ressalta a presença desta sutura em *Crocodylia* atuais.

Apesar da semelhança existente nas demais vértebras cervicais, algumas diferenças peculiares ocorrem e são importantes na distinção entre elas. Por exemplo, largura e altura do processo espinhoso, onde nas vértebras C3 a C5, este processo é mais largo que as demais, já na C8 este processo é mais alto. Quanto ao seu desenvolvimento, o processo cartilágneo inicia-se pelos arcos vertebrais seguido pelos corpos vertebrais; já no processo de ossificação, isso se inverte; os centros de ossificação aparecem primeiro nos corpos vertebrais e depois nos arcos. Porém, o sentido de desenvolvimento, tanto cartilágneo como de ossificação é o mesmo, crânio-caudal (Figs. 46, 48). Esse padrão de desenvolvimento cartilágneo e ossificação se

estendem nos demais segmentos da coluna vertebral. Observações semelhantes foram feitas por Rieppel (1993b) e Lima et al. (2011c) para *A. mississippiensis* e *C. yacare*. Nesta última espécie o autor só abordou o padrão de formação óssea.

A primeira vértebra dorsal de *M. niger*, assim como em *Crocodylus americanus* (Mook, 1921), *A. Mississippiensis* (Rieppel, 1993b) e *C. yacare* (Lima et al., 2011c) é muito semelhante à última cervical. No entanto, algumas mudanças particulares como aparecimento de facetas articulares para as costelas e presença de processos transversos são critérios utilizados para determinar a divisão das regiões da coluna cervical e dorsal. Treze vértebras dorsais estão presentes na coluna vertebral de *M. niger*. Cada uma articulada à suas respectivas costelas dorsais. O desenvolvimento cartilágneo inicia-se pelos arcos vertebrais, processos transversos e espinhosos, seguido pelo corpo da vértebra. A condensação cartilágnea das vértebras dorsais mais craniais forma-se simultaneamente com as vértebras cervicais mais caudais. Conforme observado em *M. niger* e nos estudos realizados por Lima et al. (2011c) e Rieppel (2003b) para *C. yacare* e *A. mississippiensis*, no processo de ossificação, o corpo de todas as vértebras dorsais começa cedo e simultâneo com as vértebras cervicais.

O grau de retenção do corante alizarina ao longo das vértebras dessa região dorsal nos permite afirmar, que existe um gradiente de desenvolvimento crânio-caudal, tal como ocorre na formação cartilágnea. Muitos autores também assumem esta seqüência (Rieppel, 1994a,b; Starck, 1996; Hugi et al., 2010), embora exceções possam existir, como relatado por Strong (1925), Rieppel (1993a), Sheil (2003) Blom e Lilja (2004) e Maxwell (2008).

Em *M. niger*, os processos transversos das vértebras dorsais e lombares e espinhosos de todas as vértebras se desenvolvem a partir de extensões do arco vertebral (Figs. 47, 53, 54). A partir deste modelo cartilágneo, os centros de ossificação surgem no arco, expandem-se e delimitam tais processos, sem aparecimento de novos centros de ossificação. Segundo Lima et al. (2011c), os processos transversos de *C. yacare* são formados a partir de centros de ossificação distintos do corpo vertebral. Porém, este autor não detalhou a relação da formação dos processos transversos com o arco vertebral.

A parapófise e diapófise das vértebras dorsais de *M. niger* migram dorsalmente até ficarem aproximadamente na mesma linha dorso-ventral das zigapófises e formam os processos transversos das vértebras dorsais. De acordo com Hofstetter e Gasc (1969),

essa é uma característica dos Crocodylia viventes. Ainda segundo estes autores, em *Crocodylus niloticus* a fusão da parapófise à diapófise ocorre na quarta vértebra dorsal, à semelhança de *M. niger*. Para Romer (1956) é uma característica típica de Archosauria ter as duas áreas de articulação com as costelas presentes no processo transversal.

Três vértebras lombares foram identificadas no *M. niger*, interpostas entre as vértebras dorsais e sacrais. Esse segmento da coluna não possui costelas e seus processos transversos tornam-se gradativamente mais estreitos e curtos. O desenvolvimento destas vértebras segue o mesmo padrão já descrito acima para as vértebras. Lima et al. (2011c) e Rieppel (1993b), não informaram nada a respeito das vértebras lombares para *C. yacare* e *A. mississippiensis*, respectivamente. Segundo Romer (1956), a ausência de costelas livres pode caracterizar esta região lombar; este critério foi utilizado na espécie em questão. Também de acordo com esse raciocínio, Nascimento (2008) identificou três vértebras lombares em um Baurusuchidae do grupo Mesoeucrocodylia do cretáceo superior e Mook (1921) também observou três lombares em um estudo com várias espécies de Crocodylia. Em outras espécies de répteis esse número pode ser reduzido a uma única vértebra lombar, como em teídeos (Veronese e Krause, 1997) ou estar completamente ausente, como em *L. arambarensis* (Silva e Verrastro, 2007) e *Trachemys dorbignyi* (Souza et al., 2000).

Em *M. niger*, há duas vértebras sacrais, cada uma articula com sua costela sacral correspondente. Pode-se, todavia, afirmar que nos Crocodylia viventes há presença de apenas duas vértebras sacrais, segundo Romer (1956) e Hutchinson (2001) este é o número primitivo para Archosauromorpha. Em *C. yacare* e *A. mississippiensis* este número se confirma (Lima et al., 2011c; Rieppel, 1993b). Segundo Riff (2007) em *Stratiosuchus maxhechti* do cretáceo superior, o alongamento pós-acetabular do ílio sugeriu a presença de três vértebras sacrais que advém da incorporação de uma vértebra caudal. Nascimento (2008) também informou a presença de três vértebras sacrais para Baurusuchidae.

Quanto ao desenvolvimento deste segmento da coluna, a condensação cartilaginosa da costela é individual e se junta posteriormente com a vértebra a nível da futura articulação neurocentral, diferente das costelas cervicais e dorsais, onde os pontos de conexão se dão no capítulo e tubérculo da vértebra deixando um espaço para passagem de nervos e vasos e diretamente no processo transversal da vértebra, respectivamente.

O desenvolvimento das vértebras caudais são semelhantes ao das sacrais; no lugar do processo transversal está a costela caudal, cuja formação é por condensação cartilaginosa independente e sua ligação com a vértebra correspondente se dá a nível da sutura neurocentral (Fig. 47). Higgins (1923) e Emelianov (1937), ao realizarem estudos embriológicos em crocodilos e squamatas, confirmaram estas observações.

Quanto a formação óssea, em *M. niger* observamos centros de ossificação independentes tanto nas costelas sacrais quanto nas costelas caudais (Figs. 50H, I e 52). Rieppel (1993b) já havia observado este acontecimento em *A. mississippiensis*, no entanto este autor se referiu as costelas caudais como processo transversal. Rieppel (1993b) ainda relatou que os processos transversos das vértebras dorsais também se ossificam com centros independentes, e que os processos transversos dorsais fundem-se com o arco neural logo no início do desenvolvimento embrionário e enquanto as costelas sacrais e caudais fundem-se mais tarde durante o crescimento pós-eclosão. Para *M. niger* isso não se confirma, uma vez que os processos transversos dorsais se desenvolvem em continuidade com o arco vertebral, sem formação de centros de ossificação individualizados (Figs. 52 e 53F).

Rieppel (1993b), chegou a reconhecer que o aparecimento de centros de ossificação independentes nos processos transversos dorsais não foi mencionado em outros répteis. Segundo o autor, isto pode estar relacionado com o alongamento dos processos transversos que é uma sinapomorfia dos Archosauromorpha (Benton, 1985). Concordamos em relação a sinapomorfia dos processos transversos, mas em nenhum dos espécimes analisados foi visto desenvolvimento independente deste processo.

Em *M. niger*, as costelas, tanto dorsais quanto sacrais e caudais possuem desenvolvimento semelhante, uma vez que se formam por focos condrogênicos e centros de ossificação independentes e só mais tarde contatam com sua vértebra correspondente. A maneira como estas estruturas são chamadas, apóia a homologia em série das costelas dorsais, costelas sacrais e costelas caudais. Isso apoia o uso do termo costela no lugar de processo transversal nos segmentos sacral e caudal de Crocodylia.

No geral concordamos com Rieppel (1993b) que esta situação é complexa, pois estas mudanças envolvem fusão de elementos condrogênicos e ossificados durante a embriogênese. A homologia das costelas dorsais, sacrais e caudais tem sido motivo de debate. Gegenbaur (1871) foi primeiro a levantar tal questão. Claus (1876) *apud* Rieppel (1993b) encontrou processo transversal caudal apenas com suturas em

crocodilos juvenis, bem como em *Testudines juvenis* e *Sphenodon*, e considerou essa série homóloga com a série das costelas dorsais. Mook (1921) também reconheceu a homologia das costelas sacrais e processos transversos caudais dos crocodilos com as costelas dorsais, uma conclusão apoiada por Higgins (1923) com base em seu trabalho embriológico.

Segundo Gauthier et al (1988), a ossificação das costelas sacrais e processos transversos caudais (costelas caudais) a partir de centros de ossificação distintos representa o estado plesiomórfico dos Lepidosauromorphos e os Archosauromorphos.

Com isso, Mook (1921) e Rieppel (1993b) concluíram que os processos transversos em vértebras caudais nada mais são do que costelas fundidas ao corpo vertebral. Segundo Hoffstetter e Gasc (1969), filhotes de *Crocodylia* viventes possuem estes elementos ainda separados das vértebras, fusionando-se com o tempo. Em *M. niger* notamos a presença destas suturas nas costelas sacrais e caudais nos filhotes recém-eclodidos bem como nos esqueletos dos espécimes adultos; nestes últimos apenas nas vértebras mais craniais (Fig. 45A). Na região mais caudal as suturas já não são mais distinguidas. Além disso, outras modificações podem ser observadas no esqueleto adulto, por exemplo, os processos transversos originam-se ventralmente em relação às zigapófises, no nível da sutura neurocentral. Já no segmento dorsal os processos transversos saem diretamente do arco neural.

Nos filhotes e nos espécimes adultos de *M. niger* distinguimos-se três grupos de vértebras caudais. O primeiro tipo corresponde à primeira vértebra, que é biconvexa, todas as demais são do tipo procélicas (Fig. 44); o segundo corresponde aquelas que possuem costelas caudais; e o terceiro corresponde ao final da cauda, com vértebras fortemente comprimidas lateralmente, com processos espinhosos altos e um corpo vertebral delgado (Fig. 45). Segundo Hoffstetter e Gasc (1969) essa característica se estende aos demais *Crocodylia* viventes. Nascimento (2008) relatou em *Crocodylifformes* um tipo diferenciando, onde todas as vértebras caudais são anficélicas, sendo esta a condição primitiva.

Em *M. niger* bem como nos demais *Crocodylia* (Hoffstetter e Gasc, 1969), as costelas caudais, assim como os processos hemais, vão diminuindo de tamanho gradativamente ao longo da cauda do animal, até atingir uma forma vestigial, e ausente. Sendo assim, as vértebras caudais mais distais não apresentam costelas, seguindo o padrão visto em *Crocodylifformes* (Nascimento, 2008). Rieppel (1993b) relatou o

desenvolvimento ósseo de 9-10 processos hemais associados às primeiras vértebras caudais, ao longo de um gradiente crânio-caudal. Lima et al. (2011c), também observou os centros de ossificação nos primeiros processos hemais de *C. yacare*, e enfatizou sua ocorrência em um mesmo sentido.

Os processos hemais de *M. niger* são ossos na região caudal, localizados ventralmente às vértebras, segundo Romer (1956), estes elementos derivaram do intercentro, uma peça diminuta localizada entre os centros vertebrais, que é perdida em Archosauria (Benton e Clark, 1988), restando apenas no atlas e na forma de processos hemais, como pode ser visto em *M. niger*, *C. yacare* (Lima et al., 2011c) e *A. mississippiensis* (Rieppel, 1993b). Romer (1956) relatou que normalmente estão ausentes nas primeiras vértebras caudais, devido à presença nessa região da passagem pélvica. Em Crocodylia viventes, a presença ou ausência de processos hemais na segunda vértebra caudal costuma ser usada como caráter de dimorfismo sexual, pois a fêmea perde o segundo processo hemal para acomodar melhor os órgãos reprodutores (Romer 1956). Ao analisar a localização do primeiro processo hemal nos embriões que já apresentavam ossificação desta estrutura bem como nos filhotes de *M. niger*, notamos que todos eles estavam articulados entre a segunda e terceira vértebra caudal. Desse modo, todas as espécies analisados tratar-se-iam de indivíduos machos. Isso nos leva a discordar de Romer (1956) no que diz respeito a apenas nessa informação de referência ao dimorfismo sexual.

Gastrália

Em alguns vertebrados, caudal ao esterno está um conjunto derivado de maneira separada de elementos esqueléticos, a gastrália. No *M. niger*, este conjunto é formado por ossos delgados, posicionados em linhas metaméricas na porção ventral da parede abdominal, entre o púbis e esterno. Possui sete linhas e cada linha é composta por quatro ossos. Segundo Claessens (2004b), o número de linhas varia consideravelmente, nos prossaurópode e terópode o sistema gastralial consiste de 8 a 21 linhas. Lima et al. (2011c) em *C. yacare* afirma que são de número variável, e se formam a partir de um centro de ossificação único, mas em pares tangentes e ipsilaterais, e se unem em forma de V com ápice direcionado cranialmente.

Em *A. mississippiensis*, Rieppel (1993b) apenas informou o momento que os elementos da gastrália começaram a ossificar-se. Já Vickaryous e Hall (2008) descreveram o desenvolvimento da gastrália em *A. mississippiensis* com maiores detalhes, segundos estes autores os elementos da gastrália possuem um desenvolvimento sequencial. Apesar destes autores terem afirmado a presença de oito pares de linhas, só conseguiram mostrar sete linhas, coincidindo com o número de linhas de *M. niger*.

Em *M. niger*, a gastrália foi fortemente positiva para o corante alizarina, isso demonstra que estes elementos possuem origem dérmica. Romer (1956) relatou essa origem e ainda enfatizou que, apesar de a gastrália ser, muitas vezes, referida como costelas abdominais, ou costelas ventrais, este nome, contudo, é inadequado, pois a gastrália possui uma origem totalmente dérmica, ao contrário das costelas verdadeiras, sendo, portanto, mais comparáveis aos osteodermas do que às costelas. Ainda segundo este autor, a gastrália deriva da cobertura ventral de escamas, herança dos crossopterígio basais, sendo Knox (1869), o primeiro a reconhecer sua origem dérmica.

Apesar de Vickaryous e Hall (2008) não terem observado nenhum sinal de cartilagem associada com qualquer um dos elementos da gastrália em *A. mississippiensis*, sendo fracamente positivo para azul de alcian em seus experimentos, tais autores afirmam que a gastrália não é adequadamente compreendida, provavelmente em parte, porque sua ocorrência se limita a poucos vertebrados vivos como em muitos lagartos e Crocodylia (Romer 1956). Além disso, são ossos flutuantes, sem conexão contínua com nenhum outro elemento esquelético, raramente são preservados em associação com esqueletos fósseis e há pouca informação sobre seu desenvolvimento ontogenético.

Processo uncinado, esterno e interclavícula

O processo uncinado de *M. niger* são projeções pouco ossificadas que se estendem caudo-ventralmente a partir da extremidade distal das costelas dorsais. Estas estruturas estão presentes na maioria das aves viventes (Bellairs e Jenkin, 1960), ocorre também em alguns anfíbios (Kent e Miller, 1996), alguns dinossauros terópodes (Paul, 2002) e em *Sphenodon sp* (Romer, 1956).

Em *M. niger*, o processo uncinado é fortemente positivo para o corante azul de alcian, o que pode ser visto no estágio 13. O processo de ossificação nestas estruturas

não foi observado durante o desenvolvimento pré-natal, tampouco nos recém-eclodidos. Isso indica que estas estruturas se ossificam tardiamente, após o nascimento. Esta estrutura não tem sido muito discutida entre os Crocodylia, mas apesar de poucas informações a respeito, sua presença já foi relada por Hofstetter e Gasc (1969) e Romer (1956), seja ela cartilaginosa ou ossificada. Estudos que abordam o desenvolvimento ontogenético do processo uncinado em espécies de Crocodylia não foi encontrado na literatura consultada. Entretanto, isso sugere a necessidade da continuidade e ampliação dos trabalhos de anatomia descritiva e ontogenética neste táxon.

Quase todas as espécies de aves existentes possuem processo uncinado. Estendendo-se a partir do ponto médio das costelas vertebrais, estes processos são essenciais para a mecânica da ventilação em aves, por meio de inserção muscular que estão envolvidos tanto com a inspiração como a expiração, mas também possuem importância durante a locomoção (Codd et al., 2005; Codd et al., 2008; Codd, 2010). Apesar da grande variação morfológica observada nas aves viventes, o processo uncinado tem a mesma função, sempre age para aumentar a vantagem mecânica dos movimentos das costelas e esterno (Tickle et al., 2007). Devido a sua localização e semelhança com as aves, estas estruturas em *M. niger* podem ter a mesma função na respiração. Uma vez que, com a expansão do processo uncinado, há um aumento da capacidade respiratória e isto lhe permite maior tempo submerso.

A presença de um elemento mediano na cintura peitoral é um carácter plesiomórfico. Em Crocodylia, incluindo *M. niger*, Lepidosauria e Monotremados estes elementos são identificados como interclavícula (Rieppel, 1993b; Vickaryous e Hall, 2010); em Testudines como endoplastrão (Lane, 1910); e em aves como fúrcula (Russell e Joffe, 1985). Nos cortes histológicos da interclavícula de *M. niger*, em vários estágios de desenvolvimento, foi possível observar que este elemento se desenvolve de forma intramembranosa (Fig. 51F). Esta estrutura se mantém envolvida pela cartilagem esternal em *M. niger*, *A. Mississippiensis* (Vickaryous e Hall, 2010; Rieppel, 1993b) e *C. yacare* (Lima et al., 2011c). Semelhante aos estudos de Rieppel (1993b) e Vickaryous e Hall (2010), nossos dados demonstraram que a ossificação começa na extremidade cranial da interclavícula e segue caudalmente no plano mediano.

De acordo com observações quanto ao desenvolvimento da interclavícula de *M. niger*, e dados da literatura (Vickaryous e Hall, 2010; Bryant e Russell, 1993), pode-se afirmar que a fúrcula presente nas aves e a interclavícula são homólogas. Esta afirmação

está apoiada nos seguintes critérios: estes elementos compartilham a mesma posição anatômica; nunca coexistem em um mesmo indivíduo; compartilham um ancestral comum, ambos, Crocodylia e aves, pertencem a superordem Archosauria; e se desenvolvem por ossificação intramembranosa. Embora o formato em V da fúrcula seja diferente do formato da interclavícula dos Crocodylia viventes, a morfologia sozinha é inadequada para afirmar evidência de homologia, como já discutido por Bock (1989) anteriormente.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- Identificamos 28 estágios embrionários em *Melanosuchus niger*. As poucas diferenças encontradas em relação às outras espécies de *Crocodylia* se relacionam à cronologia;
- Os elementos esqueléticos de *M. niger* são semelhantes aos demais *Crocodylia*;
- Em *M. niger* a redução dos elementos da mão foi conduzida por fusões de três distais do carpo, ausência formação cartilagínea do distal do carpo 1 e ausência de ossificação do central e distal do carpo 2;
- Houve variação intraespecífica na sequência de aparecimento de centros de ossificação nos elementos do carpo em três espécimes;
- No pé não houve fusões, mas ausência de formação cartilagínea dos distais do carpo 1 e 5 e ausência de ossificação do distal do carpo 2;
- O desenvolvimento do crânio de *M. niger* apresentou semelhança aos demais répteis;
- A sequência de formação do esqueleto refletiu a demanda funcional deste. A ossificação teve início nos dos ossos envolvidos na captura e mastigação do alimento, como os elementos da mandíbula, maxila, pré-maxila, palatino, pterigóide, nasal e jugal. Outra característica interessante é a formação do osso parietal com dois centros de ossificação que se fundem posteriormente;
- No esqueleto axial pós-cranial foi possível identificar 63 vértebras e 46 costelas, principalmente as das regiões sacral e caudal que são referidas como processos transversos;
- Na coluna vertebral só há processos transversos nos segmentos dorsal e lombar. Isso só pôde ser afirmado baseado na homologia das costelas, o que apóia o uso do termo costela no lugar de processo transversos nos segmentos sacral e caudal de *Crocodylia*.

6 APÊNDICES

Apêndice 1: Localização geográfica dos ninhos de *Melanosuchus niger* na Reserva Extrativista do Lago Cuniã, Rondônia.

Ninho	Coordenadas geográficas	
	Latitude	Longitude
1	08°19'08,8"S	63°28'54,3"W
2	08°18'32,7"S	63°29'09,5"W
3	08°19'13,6"S	63°28'07,3"W
4	08°19'15,3"S	63°28'02,8"W
5	08°19'59,5"S	63°27'29,5"W
6	08°19'12,0"S	63°28'24,1"W

Apêndice 2: Temperatura ambiente e no interior dos ninhos de *Melanosuchus niger* durante o período de incubação.

Ninho	Temperatura (°C)	
	Ambiente	Interior do ninho
1	31	30,8
2	31,7	31,5
3	25,9	29,9
4	31,1	28,7
5	30	28,2
6	25,2	31,1

Quadro 1: Sequência de **formação cartilaginosa** da cintura peitoral e membros torácicos.

Segmento	Estágio		10	-11	+11	12	-13	14	16	18	19	22	24
	Osso												
Cintura peitoral	Escápula												
	Coracóide												
Estilopódio	Úmero												
Zeugopódio	Ulna												
	Rádio												
Autopódio	Ulnar												
	Pisiforme												
	Radial						Radial + intermédio						
	Central												
	Distal do carpo 2												
	Distal do carpo 3										Fusão		
	Distal do carpo 4												
	Distal do carpo 5												
Metapódio	Metacarpo I												
	Metacarpo II												
	Metacarpo III												
	Metacarpo IV												
	Metacarpo V												
Falanges	Dedo I	F1											
		F2											
	Dedo II	F1											
		F2											
		F3											
	Dedo III	F1											
		F2											
		F3											
		F4											
	Dedo IV	F1											
		F2											
		F3											
		F4											
		F5										Fusão	
	Dedo V	F1											
F2													
F3											Fusão		

Quadro 2: Sequência de **ossificação** da cintura peitoral membro torácico.

Segmento	Estágio		18	-21	+21	-22	+22	-24	+24	-25	+25	26
	Osso											
Cintura peitoral	Escápula											
	Coracóide											
Estilopodio	Úmero											
Zeugopodio	Ulna											
	Rádio											
Autopodio	Ulnar											
	Pisiforme											
	Radial + intermedio											
	Distal do carpo 2		Não ossifica									
	Distal do carpo 3+4+5											
Metapodio	Metacarpo I											
	Metacarpo II											
	Metacarpo III											
	Metacarpo IV											
	Metacarpo V											
Falanges	Dedo I	F1										
		F2										
	Dedo II	F1										
		F2										
		F3										
	Dedo III	F1										
		F2										
		F3										
		F4										
	Dedo IV	F1										
		F2										
		F3										
		F4										
		F5	Não ossifica									
	Dedo V	F1										
F2												
F3		Não ossifica										

Quadro 4: Sequência **ossificação** da cintura e membros pelvins.

Segmento do membro	Estágio		18	19	20	21	-22	+22	-24	+24	-25	+25	
	Osso												
Cintura pelvina	Ílio												
	Ísquio												
	Púbis												
Estilopódio	Fêmur												
Zeugopódio	Tíbia												
	Fíbula												
Autopódio	Fibular												
	Intermédio+central												
	Distal do tarso 2		Não ossifica										
	Distal do tarso 3												
	Distal do tarso 4												
Metapódio	Metatarso I												
	Metatarso II												
	Metatarso III												
	Metatarso IV												
	Metatarso V												
Falanges	Dedo I	F1											
		F2											
	Dedo II	F1											
		F2											
		F3											
	Dedo III	F1											
		F2											
		F3											
		F4											
	Dedo IV	F1											
		F2											
		F3											
		F4											
F5		Não ossifica											

Quadro 5: Sequência de formação do **condrocrânio**

Segmento	Estágio					
	Osso	9	10	11	12	14
Crânio	Trabéculas					
	Cartilagem acrocordal					
	Trabéculas comum					
	Pila metótica					
	Cartilagem quadrada					
	Cart. pterigoquadrada					
	Septo internasal					
	Teto nasal					
	Septo interorbital					
	Cart. parietotectal					
	Conchas nasais					
	Cartilagem paranasal					
	Plano suprarseptal					
	Tênias marginais					
	Tênias mediais					
	Pila antótica					
	Pila metótica					
	Comissura esfenortmóide					
	Processo infrapolar					
	Placa basal					
	Arco occipital					
	Processo retroarticular					
	Columela					
Teto sinótico						
Mandíbula	Cartilagem de Meckel					

Quadro 7: Sequência de **formação cartilágnea** do esqueleto axial pós-cranial.

Segmento		Estágio						
		Osso	7	8	-12	+12	13	+16
Costelas		Cervicais						
		Dorsais						
		Sacrais						
		Caudais						
Vértebras	Arco vertebral	Cervicais						
		Dorsais						
		Lombares						
		Sacrais						
		Caudais						
	Corpo vertebral	Cervicais						
		Dorsais						
		Lombares						
		Sacrais						
		Caudais						
Elemento mediano		Gastrália	Ossificação intramembranosa					
		Interclavícula	Ossificação intramembranosa					
		Processos hemais						
		Esterno						
Dorsal		Processo uncinado						

Quadro 8: Sequência de **ossificação** do esqueleto axial pós-cranial.

Segmento		Osso	Estágio								
			19	20	21	22	23	25	26	22	
Costelas		Cervicais									
		Dorsais									
		Sacrais									
		Caudais									
Vértebras	Arco vertebral	Cervicais									
		Dorsais									
		Lombares									
		Sacrais									
		Caudais									
	Corpo vertebral	Cervicais									
		Dorsais									
		Lombares									
		Sacrais									
		Caudais									
Elemento mediano		Gastrália									
		Interclavícula									
		Processos hemais									
		Esterno	Não ossifica								
Dorsal		Processo uncinado	Ossificação pós-eclosão								

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriaens D, Verraes W. 1998. Ontogeny of the Osteocranium in the African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822) (Siluriformes: Clariidae): Ossification sequence as a response to functional demands. *J Morphol* 235:183-237.
- Ainsworth SJ, Stanley RL, Evans DJR. 2010. Developmental stages of the Japanese quail. *J Anat* 216:3-15.
- Andrade MB, Bertini RJ, Pinheiro AEP. 2006. Observations on the palate and choanae structures in Mesoeucrocodylia (Archosauria, Crocodylomorpha): Phylogenetic implications. *Rev Bras Paleo* 9(3): 323-332.
- Arthur W. 2002a. The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology. *Nature* 415: 757–764.
- Arthur W. 2002b. The concept of developmental reprogramming and the quest for an inclusive theory of evolutionary mechanisms. *Evol Dev* 2: 49–60.
- Azevedo IC. 2007. Análise sensorial e composição centesimal de carne de jacaré-do-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em conserva. Dissertação de mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Fluminense, Rio de Janeiro.
- Beggs K, Young J, Georges A, West P. 2000. Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtles, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelyidae), from northern Australia. *Can J Zool* 78:373-392.
- Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Neto AG. 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo: EDART.
- Bellairs, Ad'A, Jenkin CR. 1960. The skeleton of birds. In *Biology and Comparative Physiology of birds*. New York: Academic Press.
- Bellairs Ad'A, Kamal AM. 1981. The chondrochanium and the development of the skull in recent reptiles. In: Gans C, Parsons TS, editors. *Biology of the Reptilia*, Vol. 11 Londres: Academic Press, pp 1-263.
- Benton MJ. 1985. Classification and phylogeny of the diapsid reptiles. *Zool J Linn Soc* 81: 97-164.
- Benton MJ, Clark JM. 1988. Archosaur phylogeny and relationships of the Crocodylia. In: Benton M.J, editor. *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods*, Vol. 1: Amphibians, Reptiles, Birds. Systematics Association Special.

- Oxford: Clarendon Press. pp 295-338
- Blanco MJ, Alberch P. 1992. Caenogenesis, developmental variability and evolution in the carpus and tarsus of the marbled newt *Triturus marmoratus*. *Evolution* 46: 677-687.
- Blom J, Lilja C. 2004. A comparative study of growth, skeletal development and egg shell composition in some species of birds. *J Zool* 262: 361–369.
- Bock WJ. 1989. The homology concept: its philosophical foundation and practical methodology. *Bonn Zool Beitr* 32:327–353.
- Boughner JC, Buchtová M, Fu K, Diewert V, Hallgrímsson B, Richman JM. 2007. Embryonic development of *Python sebae* - I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zool* 110:212–230.
- Brinkman D. 1980. The hindlimb step cycle of *Caiman sclerops* and the mechanics of the crocodile tarsus and metatarsus. *Can J Zool* 58:2187-2200.
- Brochu CA. 2003. Phylogenetic approaches toward crocodylian history. *Ann Rev Earth Plan Scie* 31:357-397.
- Brock GT. 1929. On the development of the skull of *Leptodeira hotamboia*. *Quart Journ Micr Soc* 73: 289-331.
- Bryant HN, Russell AP. 1993. The occurrence of clavicles within Dinosauria: implications of homology of the avian furcula and the utility of negative evidence. *J Vert Paleontol* 13:171–184.
- Burke AC, Alberch P. 1985. The development and homology of the chelonian carpus and tarsus. *J Morphol* 186:119-131.
- Burke AC. 1989. Development of the turtle carapace: implications for the evolution of a novel bauplan. *J Morphol* 199:363-378
- Burke AC, Feduccia A. 1997. Developmental patterns and the identification of homologies in the avian hand. *Science* 278:666–668.
- Buscalioni AD, Ortega F, Rassikin-Gutman D, Pérez-Moreno BP. 1997. Loss of carpal elements in crocodylian limb evolution: Morphogenetic model corroborated by paleobiological data. *Biol J Linn Soc Lond* 62:133-144.
- Carrier DR, Farmer CG. 2000. The evolution of pelvic aspiration in archosaurs. *Paleobiology*, 26:271-293.
- Carroll RL. 1988. *Vertebrate Paleontology and Evolution*. New York: Freeman.

- Carroll SB. 2000. Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* 101:577-580.
- Carvalho IS, Bertini RJ. 1999. *Mariliasuchus*: um novo Crocodylomorpha (Notosuchia) do Cretáceo da Bacia Bauru, Brasil. *Geo Col* 24:83-105.
- Centro de Conservação e Manejo de Répteis e Anfíbios. *Melanosuchus niger*. 2001. disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ran>. Acesso em: 16 out. 2010.
- Claessens LPAM. 2004a. Archosaurian respiration and the pelvic girdle aspiration breathing of crocodyliforms. *Proc R Soc Lond B*, 271:1461-1465.
- Claessens LPAM. 2004b. Dinosaur gastralia; origin, morphology, and function. *J Vertebr Paleontol* 24:89-106.
- Clark JM. 1994. Patterns of evolution in Mesozoic Crocodyliformes. In: Fraser NC, Sues HD, editors. *In the Shadow of the Dinosaurs*. New York: Cambridge University Press. pp 84-97.
- Clark JM, Xu X, Forster CA, Wang Y. 2004. A Middle Jurassic 'sphenosuchian' from China and the origin of the crocodylian skull. *Nature* 430:1021-1024.
- Claus C. 1877. Beiträge zur vergleichenden Osteologie der Vertebraten. I. Rippen und unteres Bogensystem. *K. K. Akademie der Wissenschaften Wien, Sitzungsberichte, mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse* 74:785-818.
- Codd JR, Boggs DF, Perry SF, Carrier DR. 2005. Activity of three muscles associated with the uncinata processes of the giant Canada goose *Branta canadensis* maximus. *J Exp Biology* 208:849-857.
- Codd JR, Manning PL, Norell MA, Perry SF. 2008. Avian-like breathing mechanics in maniraptoran dinosaurs. *Proc R Soc B* 275: 157-161.
- Codd, J. R. 2010. Uncinate processes in birds: Morphology, physiology and function. *Comp Biochem Physiol Part A* 156:303-308.
- Colbert EH. 1946. *Sebecus*, representative of a peculiar suborder of fossil crocodilia from Patagonia. *Bull Am Mus Nat Hist* 87:217-270.
- Colbert EH. 1952. A pseudosuchian reptile from Arizona. *Bull Am Mus Nat Hist* 99: 561-592.
- Colbert EH, Mook CC. 1951. The ancestral crocodylian *Protosuchus*. *Bull Am Mus Nat Hist* 97:143-182.
- Cretekos CJ, Weatherbee SD, Chen C, Badwaik NK, Niswander L, Behringer RR, Rasweirler JJ. 2005. Embryonic staging system for the short-tailed fruit bat.

- Carofilia perspicillata*, a model organism for the mammalian order Chiroptera, based upon timed pregnancies in the captive-bred animals. *Dev Dyn* 233:721-738.
- Crush PJ. 1984. A Late Upper Triassic sphenosuchid crocodylian from Wales. *Palaeontology* 27:131-157.
- Da Silveira R, Magnusson WE, Campos Z. 1997. Monitoring the distribution, abundance and breeding areas of *Caiman crocodilus* and *Melanosuchus niger* in the Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. *J Herpetol* 31:514-520.
- Da Silveira R, Thorbjarnarson J. 1999. Conservation Implications of Commercial Hunting of Black and Spectacled Caiman in the Mamiraua Sustainable Development Reserve, Brazil. *Biol Conserv* 88:103-109.
- Davis DD, Gore UR. 1936. Clearing and staining skeleton of small vertebrates. *Field Mus Nat Hist* 4:3-15.
- De Beer GR. 1929. The development of the skull of the shrew. *Phil Trans Roy Soc B*, 217:411-480.
- De Beer GR. 1930. The early development of the chondrocranium of the lizard. *Quart J Micr Sci* 73:707-739.
- De Beer GR. 1937. The development of the vertebrate skull. Clarendon: Oxford.
- De Beer GR, Barrington EJW. 1934. The segmentation and chondrification of the skull of the duck. *Philos Trans R Soc London (Série B)* 223:411-467.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthr Cartil* 8:309-334.
- Diefenbach COC. 1988. Thermal and feeding relations of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Reptilia). *Comp Biochem Physiol* 89:149-155.
- Dingerkus G, Uhler L. 1977. Differential staining of bone and cartilage in cleared and stained fish using alcian blue to stain cartilage and enzymes for clearing fish. *Stain Technol* 52:229-232.
- Donayo P, Pinã C, Larriera A. 2002. Período de incubación, banda de calcificación, peso de los huevos y desarrollo embrionario de *Caiman latirostris* a três temperaturas diferentes. In: Larriera A, Verdade LM, editors. *La conservación y al manejo de Caimanes y Crocodrilos de América Latina*, Piracicaba: C. N. Editora. pp 79-90.
- Dover G. 2000. How genomic and developmental dynamics affect evolutionary processes. *BioEssay* 22:1153-1159.

- Ernelinnov SW. 1937. Die Morphologie der Tetrapodenrippen. zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere 62: 173-274.
- Etchberger CR, Ewert MA, Phillips JB, Nelson CE, Prange HD. 1992. Physiological responses to carbon dioxide in embryonic red-eared slider turtles, *Trachemys scripta*. J Exp Zool 264:1-10.
- Fabrezi M, Alberch P. 1996. The carpal elements of anurans. Herpetologica 52:188-204.
- Fabrezi M, Barg M. 2001. Patterns of carpal development among anuran amphibians. J Morphol 249:210–220.
- Fabrezi M, Abdala V, Martínez Oliver MI. 2007. Developmental basis of limb homology in lizards. Anat Rec 290: 900–912.
- Fabrezi M, Manzano A, Abdala V, Zaher H. 2009. Developmental basis of limb homology in Pleurodiran turtles, and the identity of the hooked element in the chelonian tarsus. Zool J Linn Soc 155:845–866.
- Farias IP, Silveira R, Thoisy B, Monjeló LA, Thorbjarnarson J, Hrbek, T. 2004. Genetic diversity and population structure of Amazonian crocodylians. Anim Conserv 7:265-272.
- Farmer CG, Carrier DR. 2000. Pelvic aspiration in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). J Exp Biol 203: 1679-1687.
- Ferguson MWJ. 1985. Reproductive biology and embryology of the crocodylians. In: Gans C, Billet F, Maderson PFA, editores. Biology of the reptilian. New York: John Wiley and Sons. pp 329-491.
- Ferguson MWJ. 1987. Post-laying stages of embryonic development in crocodylians: In: Webb GJW, Manolis SC, Whitehead PJ, editores. Wildlife management: Crocodiles and alligators. Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons. pp 427-444.
- Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. 1998. Signalling interactions during facial development. Mech Dev 75:3–28.
- Frank GH. 1954. The development of chondrocranium of the ostrich. Ann Uni Stellenbosch 30A:179-248.
- Gasparini Z, Chiappe LM, Fernandez M. 1991. A new senonian peirosaurid (Crocodylomorpha) from Argentina and a synopsis of the South American Cretaceous crocodylians. J Vert Paleontol 11:316-333.

- Gaudin AJ. 1978. The sequence of cranial ossification in the California Toad, *Bufo boreas* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J Herpetol* 12:309-318.
- Gauthier ER, DeQueiroz K. 1988. A phylogenetic analysis of Lepidosauromorpha. In: Estes R, Pregill G, editors. *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families*. Stanford: Stanford Univ Press.
- Gegenbaur C. 1871. Beitrage zur Kenntnis des Beckens bei Vogeln. *Fenaische Zeitschrift fur Medizin und Naturwissenschaften* 6: 157-220.
- Gilbert SF, Loredó GA, Brukman A, Burke AC. 2001. Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. *Evol Dev* 3: 47-58.
- Gilbert FS. 2006. *Developmental Biology*. Massachusetts: Ed. Sinauer Associates.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ljiri K. 2006. The Control of Chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97:33-44.
- Graham A. 2001. The development and evolution of the pharyngeal arches. *J Anat* 199:133-141.
- Greenbaum EB, Carr JL. 2002. Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifera* (Testudines: Trionychidae). *J Morphol* 254:272-291.
- Haluska F, Alberch P. 1983. The cranial development of *Elaphe obsoleta* (Ophidia, Colubridae). *J Morphol* 178:37-55.
- Hall BK. 1999. *The Neural Crest in Development and Evolution*. New York: Springer.
- Hall BK. 2002. Palaeontology and evolutionary developmental biology: a science of the nineteenth and twenty-first centuries. *Palaeontology* 45: 647-669.
- Hamburger V, Hamilton H. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Hamilton HL. 1965. *Lillie's Development of the Chick; an Introduction to Embryology*. New York: Holt, Rinehart and Winston.
- Harrison RG. 1969. Harrison stages and description of the normal development of the spotted salamander, *Amblystoma punctatum* (Linn). In: Wilens S, editor. *Organization and development of the embryo*. New Haven: Yale University Press. pp 44-66.
- Herron JC, Emmons LH, Cadle JE. 1990. Observations on Reproduction in the Black Caiman, *Melanosuchus niger*. *J Herpetol* 24:314-316.

- Herron JC. 1994. Body size, spatial distribution, and microhabitat use in the Caimans, *Melanosuchus niger* and *Caiman crocodiulus*, in a Peruvian lake. *J Herpetol* 28:508-513.
- Higgin CM. 1923. Development of the primitive reptilian vertebral column, as shown by a study of *Alligator mississippiensis*. *A J Anat* 31: 373-395.
- Hildebrand M, Goslow GE. 2006. Análise da estrutura dos vertebrados. São Paulo: Atheneu.
- Hinchliffe JR, Hecht MK. 1984. Homology of the bird wing skeleton: embryological versus palaeontological evidence. *Evol Biol* 30:21-39.
- Hinchliffe JR, Johnson DR. 1983. Growth of cartilage. In: Hall BK, editor. *Cartilage: development, differentiation and growth*, vol. 2. New York: Academic Press. p 255–296.
- Hinchliffe JR. 1985. One, two, three or two, three, four: An embryologist's view of the homologies of the digits and carpus of modern birds. In: Hecht MK, Ostrom JH, Viohl G, Wellnhofer P, editors. *The beginnings of birds*. Eichstätt: Jura Museums, 141–147.
- Hinchliffe JR. 1991. Developmental approaches to the problem of transformation of limb structure in evolution. In: Hinchliffe RJ, Hurle JM, Summerbell D, editors. *Developmental patterning of the vertebrate limb*. New York and London: Plenum Press 313–323.
- Hofstetter R, Gasc JP. 1969. Vertebrae and ribs of modern reptiles. In: Gans C, Bellairs Ad'A, Parsons TS editors. *Biology of the reptilia. Morphology A*. London: Academic Press. pp. 201–310.
- Holmgren N. 1933. On the origin of the tetrapod limb. *Acta Zool (Stockholm)* 14:185–295.
- Holmgren N. 1955. Studies on the phylogeny of birds. *Acta Zool (Stockholm)* 36:243–328.
- Horna JV, Cintra R, Ruesta PV. 2001. Feeding ecology of Black Caiman *Melanosuchus niger* in a western amazonian forest: the effects of ontogeny and seasonality on diet composition. *Ecotropica* 7:1-13.
- Howes GB, Swinnerton HH. 1901. On the development of the skeleton of the Tuatara, *Sphenodon punctatus*; with remarks on the egg, on the hatching, and on hatched young. *Trans. Zool Soc London*, 16(1)1-86.

- Hugi J, Mitgutsch C, Sánchez-Villagra MR. 2010. Chondrogenic and ossification patterns and sequences in White's skink *Liopholis whitii* (Scincidae, Reptilia). *Zoosyst Evol* 86: 21-32.
- Hutchinson JR. 2001. The evolution of pelvic osteology and soft tissues on the line to extant birds (Neornithes). *Zool J Linn Soc* 131: 123-168.
- Hua S, Buffrenil V. 1996. Bone histology as a clue in the interpretation of functional adaptations in the *Thalattosuchia* (Reptilia, Crocodylia). *J Vertebr Paleontol* 16:703-717
- Hua TM, Wang CL, Chen BH. 2004. Stages of embryonic development for *Alligator sinensis*. *Zool Res* 25:263-271.
- Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, Krane SM. 2004. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci* 101:17192–17197.
- Iordansky NN. 1973. The skull of the crocodylian, In: Gans C, Parsons TS, editors. *Biology of the Reptilia*, Vol. 4. Londres: Academic Press, pp 201-264.
- Iungman J, Piña CI, Siroski P. 2008. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Genesis* 46:401-417.
- Jackson K. 2002. Post-ovipositional development of the monocle cobra. *Naja kaouthia* (Serpentes: Elapidae). *Zool* 105:203-214.
- Jollie MT. 1957. The head skeleton of the chicken and remarks on the anatomy of this region in other birds. *J Morphol* 100:389-436.
- Johnson RL, Tabin CJ. 1997. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90:979-990.
- Kardong KL. 2010. *Vertebrados: Anatomia comparada, função e evolução*. São Paulo: Roca.
- Kälin JA. 1933. Beiträge zur vergleichenden Osteologie des Crocodylienschädels. *Zoologische Jahrbücher* 57:535-714.
- Kamal AM, Hammouda HG. 1965. The development of the skull of *Psammophis sibilans*. I. The development of the chondrocranium. *J Morphol* 116:197-245.
- Kamal AM, Hammouda HG, Mokhtar FM. 1970. The development of the osteocranium of the Egyptian Cobra: I. The embryonic osteocranium. *Acta Zool* 970:1-17.

- Kawakami Y, Rodriguez-León J, Belmonte JCI. 2006. The role of TGFbs and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 18:723-729.
- Kent GC, Miller L. 1996. Vertebrae, ribs and sternum. In *Comparative Anatomy of the Vertebrates*. New York: McGraw-Hill.
- Klembara J. 1991. The cranial anatomy of early ontogenetic stages of *Alligator mississippiensis* (Daudin, 1802) and the significance of some of its cranial structures for the evolution of tetrapods. *Palaeontograph Abteilung A: Paleozoologie, Stratigraphie* 215:103-171.
- Klembara J. 1993. The parasphenoid and associated dermal structures of the parabasisphenoid of *Alligator mississippiensis* (Daudin, 1802). *Palaeontographica A* 228:143–164.
- Klembara J. 2001. Postparietal and prehatching ontogeny of the supraoccipital in *Alligator mississippiensis* (Archosauria: Crocodylia). *J Morphol* 249:147–153.
- Klembara, J. 2005. Ontogeny of the partial secondary wall of the otoccipital region of the endocranium in prehatching *Alligator mississippiensis* (Archosauria. Crocodylia). *J Morphol* 266:319–339.
- Knox FJ. 1869. On the tuatara (*Hatteria punctata*, Gray); or great fringed lizard of New Zealand. *Trans Proc New Zeal Inst* 2:17–20.
- Krause L. 1978. Osteologia pós-craniana de *Tupinambis teguxin* (L., 1758) sensu Boulenger, Parte I: Esqueleto axial (vértebras e costela) (Lacertilia, Scincomorpha, Telidae). *Rev Bras Biol* 46: 481-499.
- Kundrát M. 2009 Primary Chondrification Foci in the Wing Basipodium of *Struthio camelus* With Comments on Interpretation of Autopodial Elements in Crocodilia and Aves. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312:30-41.
- Lane HJ. 1910. A paired entoplastron in *Trionyx* and its significance. *Proc Indiana Acad Sci* 1910:345–350.
- Lang JW, Andrews H, Whitaker R. 1989. Sex determination and sex rations in Crocodilians. *J Exp Zool* 270:28-44.
- Langston W. 1973. The crocodilian skull in historical perspective. In: Gans C, Parsons TS, editors. *Biology of the Reptilia*. Vol. 4. London: Academic Press. pp 265-284.
- Lee MSY. 1996. Correlated progression and the origin of turtles. *Nature* 379: 812-815.
- Li C, Wu X, Rieppel O, Wang L, Zhao L. 2008. An ancestral turtle from the late Triassic of the southwestern China. *Nature* 456: 497-501.

- Lima FC. 2010. Desenvolvimento do esqueleto em embriões de *Caiman yacare* (Daudin 1802) (Crocodylia, Alligatoridae). Dissertação de mestrado em Saúde Animal. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 123pp.
- Lima FC, Vieira LG, Santos ALQ, Pereira HC, De Simone SBS, Hirano LQL, Romão MF, Silva JMM, Coutinho ME. 2011a. Skeletogenesis of the pectoral girdle and forelimbs in embryos of *Caiman yacare* (Daudin, 1802) (Crocodylia, Alligatoridae). *J Morphol Sci* 28:4-10.
- Lima FC, Vieira LG, Santos ALQ, Coutinho ME. 2011b. Sequência de ossificação do sincrânio e hioide em embriões de *Caiman yacare* (Crocodylia, Alligatoridae). *Iheringia Zool*. In press.
- Lima FC, Vieira LG, Santos ALQ, Pereira HC, Alves PHM, Assumpção TI. 2011c. Esqueletogênese dos ossos da coluna vertebral, costelas e esqueleto abdominal em embriões de *Caiman yacare* (Crocodylia:Alligatoridae). *Biosci J* 27:813-825.
- Mabee PM, Trendler TA. 1996. Development of the cranium and paired fins in *Betta splendens* (Teleostei: Percomorpha): Intraspecific variation and interspecific comparisons. *J Morphol* 227:249-287.
- Mabee PM, Otmstead KL, Cubbage CC. 2000. An experimental study of intraspecific variation, developmental, timing, and heterochrony in fishes. *Evol* 45:2091-2106.
- Macke T. 1969. Die Entwicklung des craniums von *Fulica atra* L. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 113:229-294.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. 2008. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40:46-62.
- Magnusson WE, Taylor JA. 1980. A description of developmental stages in *Crocodylus porosus*, for use in adding eggs in the field. *Aust Wildl res* 7:479-485.
- Maisano JA. 2002. The potential utility of postnatal skeletal developmental patterns in squamate phylogenetics. *Zool J Linn Soc* 136:277-313.
- Mathur JK, Goel SC. 1976. Patterns of chondrogenesis and calcification in the developing limb of the lizard, *Calotes verisolor*. *J Morphol* 149:401-420.
- Maxwell EE. 2008. Comparative embryonic development of the skeleton of the domestic turkey (*Meleagris gallopavo*) and other galliform birds. *Zoology* 111: 242-257.

- Maxwell EE. 2009. Comparative ossification and development of the skull in palaeognathous birds (Aves: Palaeognathae). *Zool J Linn Soc* 156: 184-200.
- Maxwell EE, Larsson HCE. 2009. Comparative ossification sequence and skeletal development of the postcranium of palaeognathous birds (Aves: Palaeognathae). *Zool J Linn Soc* 157: 169–196.
- May W. 1962. Die morphologie des Chondrocraniums und Osteocraniums eines Waldkauzembryos (*Strix aluco L.*). *Z Wiss Zool* 166:133-202.
- Mccrady E. 1938. Embryology of the opossum. *Am anat mem* 16:1-233.
- Medem F. 1963. Osteologica craneal, distribucion geografica y ecologia de *Melanosuchus niger* (Spix) (Crocodylia, Alligatoridae). *Rev Acad Colomb Cienc Exac Fis Nat* 12:5-19.
- Medem F. 1983. Los Crocodylia de Sur América. Bogotá: Carrera.
- Miller JD. 1985. Embryology of marine turtles. In: Gans C, Billett F, Maderson PFA, eds. *Biology of the Reptilia*. New York: John Wiley and Sons.
- Miura S, Hanaoka K, Togashi S. 2008. Skelotogenesis in *Xenopus tropicalis*: Characteristic boné development in na anuran amphibian. *Bone* 43:901-999.
- Monteiro LR, Soares M. 1997. Allometric analysis of the ontogenetic variation and evolution of the skull in *Caiman* Spix 1825 (Crocodylia: Alligatoridae). *Herpetol* 53:62-69.
- Monteiro LR, Cavalcanti MJ, Sommer HJS. 1997. Comparative ontogenetic shape changes in the skull of *Caiman* species (Crocodylia, Alligatoridae). *J Morphol* 231:53-62.
- Mook CC. 1921. Notes on the postcranial skeleton in the Crocodilia. *Bull Am Mus Nat Hist* 44:67-100.
- Müller W. 1961. Die morphologie und Chondrocraniums und Osteocraniums eines Waldkauzembryos (*Strix aluxo L.*) *Z. Wiss Zool* 166:133-202.
- Müller F. 1967. Zur embryonalen Kopfentwicklung von *Crocodylus cataphractus* Cuvier. *Rev Suisse de zool* 741: 189-294.
- Müller GB, Alberch P. 1990. Ontogeny of the limb skeleton in *Alligator mississippiensis*: Developmental invariance and change in the evolution of Archosaur limbs. *J Morphol* 203:151-164.
- Müller GB. 1991. Evolutionary transformation of limb pattern: heterochrony and secondary fusion. In: Hinchliffe RJ, Hurle JM, Summerbell D, eds.

Developmental patterning of the vertebrate limb. New York and London: Plenum Press. pp. 395–405.

- Murray PDF. 1963. Adventitious (secondary) cartilage in the chick, and the development of certain bones and articulations in the chick skull. *Aust J Zool* 11:368-430.
- Nascimento, P. M. Descrição morfológica e posicionamento filogenético de um Baurusuchidae (Crocodyliformes, Mesoeucrocodylia) do Cretáceo Superior da Bacia Bauru, região de General Salgado (SP). Dissertação de mestrado em Zoologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo. 215pp.
- Nash DS. 1975. The morphology and relationships of a crocodylian, *Orthosuchus stormbergi*, from the Upper Triassic of Lesotho. *Ann S Afr Mus* 67:227-329.
- Nieuwkoop PD, Faber J. 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). New York: Garland.
- Noro M, Uejima A, Abe G, Manabe M, Tamura K. 2009. Normal Developmental Stages of the Madagascar Ground Gecko *Paroedura pictus* With Special Reference to Limb Morphogenesis. *Dev Dyn* 238:100-109.
- Olsen BR, Reginato AM, Wang W. 2000. Bone development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 16:191-220.
- Packard GC, Packard MJ. 1984. Coupling of physiology of embryonic turtles to the hydric environment. In: Seymour RS, ed. Respiration and metabolism of embryonic vertebrates. Doudrecht: Junk Publishers.
- Parker WK. 1869. On the structure and development of the skull of the common fowl (*Gallus domesticus*). *Philos Trans R Soc London* 159:755-807.
- Parker WK, Bettany GT. 1877. The morphology of the skull. London: Macmillan.
- Parrish JM. 1987. The origin of crocodylian locomotion. *Paleobiology* 13:396-414.
- Paul GS. 2002. Skeletons. In *Dinosaurs of the Air*. Maryland: John Hopkins Press.
- Peng G. 1995. A new Protosuchian from the Late Jurassic of Sichuan, China. In: Sun A, Wang Y, editors. Sixth Symposium on Mesozoic Terrestrial Ecosystems and Biota. Beijing: China Ocean Press
- Peterka M, Yves Sire J, Hovorakova M, Prochazka J, Fougereol L, Peterkova R, Viriot L. 2010. Prenatal development of *Crocodylus niloticus niloticus* Laurenti, 1768. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 314:353-368.

- Peyer B. 1912. Die Entwicklung des Schädelskelettes von *Vipera aspis*. Morph Jahrb 44: 563-621.
- Piña CI, Larriera A, Medina M, Webb GJW. 2007. Effects of incubation temperature on the size of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) at hatching and after one year. J Herpetol 41:209-214.
- Pinheiro MS, Mourão GM, Campos ZM, Coutinho ME. 1997. Influência da temperatura de incubação na determinação do sexo do jacaré (*Caiman crocodilus yacare*). Rev Brasil Biol 57:383-391.
- Pol D. 2005. Postcranial remains of *Notosuchus terrestris* Woodward (Archosauria: Crocodyliformes) from the Upper Cretaceous of Patagonia, Argentina. Ameghiniana 42:21-38.
- Pough FH, Janis CM, Heiser JB. 2003. A vida dos vertebrados. São Paulo: Atheneu.
- Prochel J. 2006. Early skeletal development in *Talpa europaea*, the common European mole. Zoolog Sci 23:427-434.
- Raff EC, Raff RA. 2000. Dissociability, modularity, evolvability. Evol Dev 2:235–238.
- Rebêlo GH, Lugli L. 2001. Distribution and abundance of four caiman species (Crocodylia: Alligatoridae) in Jaú Nacional Park, Amazonas-Brazil. Rev Biol Trop 49:1096-1109.
- Reese AM. 1915. The Alligator and Its Allies. New York: G. P. Putnam's Sons.
- Richardson MK, Gobes SMH, Van Leeuwen AC, Polman AE, Pieau C, Sanchez-Villagra M. 1999. Heterochrony in limb evolution: developmental mechanisms and natural selection. J Exp Zool B Mol Dev Evol 312:1-26.
- Rieppel O. 1992. Studies of formation in reptiles III. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta vivipara*, Jacquin (Reptilia, Squamata). Fieldiana Zool 68:1-25.
- Rieppel O. 1993a. Studies of skeleton formation in reptiles II. *Chamaeleo hoehnelli* (Squamata: Chamaeleoninae), with comments on the Homology of carpal and tarsal bones. Herpetologica 49:66-78.
- Rieppel O. 1993b. Studies on skeleton formation in reptiles. V. patterns of ossification in the skeleton of *Alligator mississippiensis* Daudin (Reptilia, Crocodylia). J Zool 109: 301-351.
- Rieppel O. 1993c. Studies on skeleton formation in reptiles: Patterns of ossification in the skeleton of *Chelydra serpentina* (Reptilia, Testudines). J Zool 231: 487-509.

- Rieppel O. 1994a. Studies on skeleton formation in reptiles - patterns of ossification in the limb skeleton of *Gehyra oceanica* (Lesson) and *Lepidodactylus lugubris* (Dumeril and Bibron). *Ann Sci Nat Zool Biol Anim* 15 :83-91.
- Rieppel O. 1994b. Studies of formation in reptiles. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta agilis exigua*, Eichwald (Reptilia, Squamata). *J Herpetol* 28:145-153.
- Riff D. 2007. Anatomia apendicular de *Stratiotosuchus maxhechti* (Baurusuchidae, Cretáceo Superior do Brasil) e análise filogenética dos Mesoeucrocodylia. Tese de Doutorado em Zoologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Risley PL. 1932. Observations on the natural history of the common musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). *Pap Mich Acad Sci Arts Lett* 17:685-711.
- Romer AS. 1956. *Osteology of the Reptiles*. Chicago: University of Chicago Press.
- Ross JP. 1998. *Crocodiles: status survey and conservation action plan*. Gland: The World Conservation Union.
- Russell AP, Joffe DJ. 1985. The early development of the quail (*Coturnix c. japonica*) furcula reconsidered. *J Zool* 206:69–81.
- Sánchez-Villagra MR. 2002. Comparative patterns of postcranial ontogeny in therian mammals: an analysis of relative timing of ossification events. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 294: 264–273.
- Sanchez-Villagra MR, Mitgutsch C, Nagashima H, Kuratani S. 2007. Autopodial Development in the Sea Turtles *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*. *Zoolog Sci* 24:257–263.
- Sánchez-Villagra MR, Goswami A, Weisbecker V, Mock O, Kuratani S. 2008. Conserved relative timing of cranial ossification patterns in early mammalian evolution. *Evol Dev* 10: 519–530.
- Sanchez-Villagra MR, Ziermann JM, Olsson L. 2008. Limb chondrogenesis in *Graptemys nigrinoda* (Emydidae), with comments on the primary axis and the digital arch in turtles. *Amphib-reptil* 29:85–92.
- Sanchez-Villagra MR, Müller H, Sheil CA, Scheyer TM, Nagashima H, Kuratani S. 2009. Skeletal Development in the Chinese Soft-Shelled Turtle *Pelodiscus sinensis* (Testudines: Trionychidae). *J Morphol* 270:1381-1399.

- Sanger TJ, Losos JB, Gibson-Brown JJ. 2008. A developmental staging series for the lizard genus *Anolis*: a new system for the integration of evolution, development and ecology. *J Morphol* 269:129-137.
- Schlosser G, Wagner G. 2004. *Modules in Development and Evolution*. Chicago: University of Chicago Press.
- Schoch RR. 2006. Skull ontogeny: Developmental patterns of fishes conserved across major tetrapod clades. *Evol Devel* 8:524-536.
- Schreckenberg GM, Jacobson AG. 1975. Normal stages of development of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Dev Biol* 42:391-400.
- Scheyer T, Sander M. 2004. Histology of ankylosaur osteoderms: implications for systematic and function. *J Vertebr Paleontol* 24:874-893.
- Sheil CA. 2003. Osteology and skeletal development of *Apalone spinifera* (Reptilia: Testudines: Trionychidae). *J Morphol* 256:42-78.
- Sheil CA. 2005. Skeletal development of *Macrochelys temminckii* (Reptilia: Testudines: Chelydridae). *J Morphol* 263:71-106.
- Sheil CA, Portik D. 2008. Formation and ossification of limb elements in *Trachemys scripta* and a discussion of autopodial elements in turtles. *Zool Sci* 25:622-641.
- Sheil CA, Greenbaum E. 2005. Reconsideration of skeletal development of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudinata: Chelydridae): evidence for intraspecific variation. *J Zool* 265:235-267.
- Shiino K. 1914. Studien zue Kenntnis des Wirbeltierkopfes. I. Das Chondrocranium von Crocodilus mit Beru" cksichtigung der Gehirnnerven und Kopfgefasse. *Anat Hefte* 50:254-381.
- Shubin NH, Alberch P. 1986. A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. *Evol Biol* 20: 319-387.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S. 1997. Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 388:639-648.
- Shumway W. 1940. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. *Anat Rec* 78:139-147.
- Silva CM, Verrastro L. 2007. Descrição do esqueleto axial de *Liolaemus arambarenses* Verrastro, Veronese, Bujes e Dias Filho (Iguania, Liolaemidae): regiões pré-sacral e sacral. *Rev Bras Zool* 24: 1-11.

- Slabý O. 1951. Le développement du chondrocrâne du cormorant (*Phalacrocorax carbo* L.) au point de vue de l'évolution. *Bull Inter Acad Tchèque Sci* 52:1-47.
- Smith MM, Hall BK. 1990. Developmental and evolutionary origins of vertebrate skeletogenic and odontogenic tissues. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65:277–374.
- Sociedade Brasileira de Herpetologia. Lista brasileira de répteis. 2005. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>. Acesso em: 10 Jan. 2011.
- Sonies F. 1907. Über die Entwicklung des Chondrocraniums und der knorpeligen Wirbelsäule bei den Vögeln. *Petrus Camper* 4:395-486.
- Souza AM, Malvásio A, Lima LAB. 2000. Estudo do esqueleto em *Trachemys dorbigny* (Duméril e Bibron) (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Ver Bras Zool* 17: 1041-1063.
- Starck JM. 1996. Comparative morphology and cytokinetics of skeletal growth in hatchlings of altricial and precocial birds. *Zool Anz* 235: 53–75.
- Steiner H. 1934. Ueber die embryonale Hand- und Fuss- Skelettanlage bei den Crocodiliern, sowie über ihre Beziehungen zur Vogel-Flugelanlage und zur ursprünglichen Tetrapoden-Extremität. *Rev Suisse Zool* 41:383-396.
- Strong RM. 1925. The order, time, and rate of ossification of the albino rat (*Mus norvegicus albinus*) skeleton. *Am J Anat* 36: 313–355.
- Thorbjarnarson JB. 1996. Reproductive characteristics of the order Crocodylia. *Herpetologica* 52:8-24.
- Tickle PG, Ennos AR, Lennox LE, Perry SF, Codd JR. 2007. Functional significance of the uncinat processes in birds. *J Exp Biol* 210: 3955–3961.
- Toerien MJ. 1971. The developmental morphology of the chondrocranium of *Podiceps cristatus*. *Ann Univ Stellenbosch* 3:1-128.
- Tokita M, Kuratani S. 2001. Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoolog Sci* 18:705–715.
- Townsend DS, Stewart MM. 1985. Direct development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia* 423–436.
- Vasconcellos FM, Rocha-Barbosa O, Carvalho IS. 2004. Morfologia de garras de crocodilomorfos fósseis encontradas nas formações Adamantina e Marília da Bacia Bauru (Cretáceo Superior, Brasil). *Anu Inst Geocienc* 27: 55-65.

- Vickaryous MK, Hall BK. 2008. Development of the Dermal Skeleton in *Alligator mississippiensis* (Archosauria, Crocodylia) With Comments on the Homology of Osteoderms. *J Morphol* 269:398–422.
- Vickaryous MK, Hall BK. 2010. Comparative development of the crocodylian interclavicle and avian furcula, with comments on the homology of dermal elements in the pectoral apparatus. *J Exp Zool Mol B Dev Evol* 314:196–207.
- Villela PMS. 2008. Caracterização genética de crocodilianos brasileiros e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Paleosuchus trigonatus*. Tese de doutorado em Ecologia aplicada. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Vieira LG, Santos ALQ. 2007. Sequence of metacarpal and phalangeal bone formation in embryos of *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae) stained with alizarin red s. *Braz J Morphol Sci* 24:104-111.
- Vieira LG. 2008. Ontogenia dos ossos do esqueleto da tartaruga-da-amazônia *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines, Podocnemididae). Dissertação de mestrado em Saúde Animal. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Vieira LG, Santos ALQ, Lima FC, Moura LR. 2010. Chondrogenesis of the limbs and mesopodial ossification of *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812 (Testudines: Podocnemidae). *J Morphol* 272:404-418.
- Veronese LB, Krause L. 1997. Esqueleto pré-sacral e sacral dos lagartos teídeos (Squamata, Teiidae). *Rev Bras Zool* 14:15-34.
- Voeltzkow A. 1979. Beitrage zur entwicklungsgeschichte der reptilien. 1. Biologie und entwicklung der ausseren korperform von *Crocodylus madagascariensis*. *Abhandl Senckenb Naturfges* 26:1-150.
- Vorster W. 1989. The development of the chondrocranium of *Gallus gallus*. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 113:1-75.
- Wagner GP. 2001. What is the promise of developmental evolution? Part II: a causal explanation of evolutionary innovations may be impossible. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 291:305-309.
- Wagner EF, Karsenty G. 2001. Genetic control of skeletal development. *Genet Dev* 11:527–532.
- Warburton SJ, Hastings D, Wang T. 1995. Responses to chronic hypoxia in embryonic alligators. *J Exp Zool* 273:44-50.

- Weisel GF. 1967. Early ossification in the skeleton of the sucker (*Catostomus macrocheilus*) and the guppy (*Poecilia reticulata*). *J Morphol* 121:1-18.
- Wellnhofer PA. 1971. Die Atoposauridae (Crocodylia, Mesosuchia) der Oberjura-Plattenkalke Bayerns. *Palaeontographica* 138:133-165.
- Wellnhofer PA. 1992. A new specimen of *Archaeopteryx* from the Solnhofen Limestone. *Nat Hist Mus Los Angeles County Sci Ser* 36: 3-23.
- Westergaard B, Ferguson MWJ. 1986. Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*. Early embryonic development in the lower jaw. *J Zool* 210:575–597.
- Westergaard B, Ferguson MWJ. 1987. Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*. Later development in the lower jaws of embryos, hatchlings and young juveniles. *J Zool* 212:191–222.
- Westergaard B, Ferguson MWJ. 1990. Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*: Upper jaw dental and craniofacial development in embryos, hatchlings, and young juveniles, with a comparison to lower jaw development. *Am J Anat* 187:393–421.
- Wiebe KL. 2010. A supplemental function of the avian egg tooth. *Condor* 112:1-7.
- Wise PAD, Vickaryous MK, Russell, AP. 2009. An Embryonic Staging Table for In Ovo Development of *Eublepharis macularius*, the Leopard Gecko. *Anat Rec* 292:1198–1212.
- Wu XC, Chatterjee S. 1993. *Dibothrosuchus elaphros*, a crocodylomorph from the Lower Jurassic of China and the phylogeny of the Sphenosuchia. *J Vertebr Paleontol* 13: 58-89.
- Wu XC, Sues HD. 1996. Anatomy and phylogenetic relationships of *Chimaerasuchus paradoxus*, an unusual crocodyliform reptile from the Lower Cretaceous of Hubei, China. *J Vertebr Paleontol* 16:688-702.
- Wu XC, Sues HD, Dong ZM. 1997. *Sichuanosuchus shuhanensis*, a new ? Early Cretaceous protosuchian (Archosauria: Crocodyliformes) from Sichuan (China), and the monophyly of Protosuchia. *J Vertebr Paleontol* 17:89-103.
- Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP. 2001. *Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles*. San Diego: Academic Press.
- Yntema CL. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *J Morphol* 125:219-251.

Description of embryonic stages in *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) (Crocodylia: Alligatoridae)

Vieira, LG.^{1*}, Lima, FC.², Santos, ALQ.², Mendonça, SHST.³,
Moura, LR.², Iasbeck, JR.² and Sebben, A.¹

¹Laboratory of Comparative Anatomy of Vertebrates, University of Brasília – UnB,
Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910-970, Brasília, DF, Brazil

²Wild Animal Teaching and Research Laboratory, Federal University of Uberlândia – UFU,
Av. Amazonas, 2245, Jardim Umarama, CEP 38405-302, Uberlândia, MG, Brazil

³Mendes Institute for Biodiversity Conservation – ICMBio,
National Center for Research and Conservation of Reptiles and Amphibians – RAN,
Rua 229, n° 95, Setor Leste Universitário, CEP 74605-090, Goiânia, GO, Brazil

*E-mail: luceliabio@yahoo.com.br

Abstract

The determination of embryonic stages is very useful in comparative and evolutionary anatomy, experimental research and ecological studies. Although tables of development stages already exist for some crocodylian species, no table has yet been published for *Melanosuchus niger*. Therefore, the aim of this work is to monitor the development of this species of Alligatoridae and characterize its stages based on the main morphological transformations the embryo undergoes during the incubation process. Under natural conditions, two samples were collected daily in the Lake Cuniã Extractive Reserve in Rondônia, Brazil, making a total of 186 eggs. The incubation period was 90 days at an ambient temperature varying from 25.2 to 31.7 °C. We established 24 embryonic stages between the formation of the pharyngeal arch and hatching. Primordia for the sensory organs and somites were observed in the early stages. The buds of the pelvic and thoracic limbs emerged simultaneously, also in the early stages. An analysis of these structures showed evidence of considerable evolutionary modifications when compared with embryos of different species. In stage 12 we observed subtle pigmentation in the region of the head and, in stage 25, the pigmentation and striped pattern were typical of the newly hatched specimen. The eyetooth was visible in stage 18, disappearing within the first few weeks after hatching. The vitellus was completely absorbed in the penultimate stage. Direct comparisons of the table of embryonic stages were made between *M. niger* and other crocodylian taxa, and the main differences identified were chronological variations.

Keywords: black caiman, development, embryology, incubation, reptiles.

1 Introduction

Reptile embryology has long been investigated by different researchers (PARKER, 1879; KAMAL and HAMMOUDA, 1965; KAMAL, HAMMOUDA and MOKHTAR, 1970). Yntema (1968) was among the first to provide a normal pattern of embryonic stages for *Chelydra serpentina*, and since then the stages of development of several other species of Testudines have been determined. There is still a paucity of studies of this nature on the order Crocodylia. Magnusson and Taylor (1980) were pioneers in the characterization of the embryonic stages based on the external morphological traits of *Crocodylus porosus* (Crocodylidae), and were followed by Ferguson (1987) for *Alligator mississippiensis* (Alligatoridae) and Iungman, Piña and Siroski (2008) for *Caiman latirostris* (Alligatoridae). Although earlier studies such as that of Voeltzkow (1899) on *Crocodylus madagascariensis* and that of Reese (1915) on *Alligator mississippiensis* described some embryonic traits, none of them established a complete series.

Prior to the description and standardization of these stages, many researchers used standard body measurements to estimate the approximate age of the embryo (RISLEY, 1933), which to constant errors. In fact, if a series of morphometric dimensions and morphological traits could

be correlated to real or structural age, it could be possible to estimate the egg-laying time, the period of incubation, predict the hatch and or know how long a given embryo should be incubated to reach a given stage. Moreover, classification based solely on chronological age is very faulty, especially in terms of incubation time, which is normally variable since changes in the development rate may occur among embryos of the same age and even in the same nest (DONAYO, PINĂ and LARRIERA, 2002).

The incubation time of *Melanosuchus niger* eggs comprises the period from egg-laying to hatching, and may vary from two to three months (MEDEM, 1963; HERRON, EMMONS and CADLE, 1990). Studies with crocodylians have demonstrated that temperature is an important abiotic factor that influences the duration of embryonic development, although it may also be affected by other variables such as humidity (PACKARD and PACKARD, 1984). The embryonic stages of *M. niger*, as well as for the species of Crocodylia *C. porosus* (MAGNUSSON and TAYLOR, 1980), *A. mississippiensis* (FERGUSON, 1987) and *C. latirostris* (IUNGMAN, PIÑA and SIROSKI, 2008), and for *Apalone spinifera* (GREENBAUM and CARR, 2002), *Python sebae*

(BOUGHNER, BUCHTOVÁ, FU et al., 2007), *Gallus gallus domesticus* (HAMBURGER and HAMILTON, 1992), *Coturnix coturnix japonica* (AINSWORTH, STANLEY and EVANS, 2010), *Eleutherodactylus coqui* (TOWNSEND and STEWART, 1985) and *Carofilia perspicillata* (CRETEKOS, WEATHERBEE, CHEN et al., 2005), were established according to the continual appearance of distinct external morphological traits at a given moment of development. These traits are described in detail and are considered criteria for the differential recognition of each stage.

The black caiman (*M. niger*) is considered a species at low risk of biological extinction in nature (DA SILVEIRA, MAGNUSSON and CAMPOS, 1997). Horna, Zimmermann, Cintra et al. (2003) reported that this reptile may reach a total length of six meters. In fact, it is considered the largest South American predator distributed throughout the Amazon basin including Bolivia, Brazil, Colombia, Ecuador, Peru, Venezuela and some areas of Guyana and French Guiana.

It is extremely important to determine the stages of embryonic development because, in addition to providing information for comparative and evolutionary anatomy, it can contribute to descriptive or experimental research (BEGGS, YOUNG, GEORGES et al., 2000; HAMBURGER and HAMILTON, 1992; HUA, WANG and CHEN, 2004),

in addition to serving as a useful instrument for ecological studies. Therefore, the purpose of the present study was to monitor the embryonic development of *M. niger* and to characterize its embryonic stages based on the main morphological transformations the embryo undergoes during the process of natural incubation.

2 Material and methods

Melanosuchus niger eggs were collected daily from an area of natural incubation in the Lake Cuniã Extractive Reserve located in the state of Rondônia, Brazil. Collections were made between October and December, under ICMBio/IBAMA Permit No. 12243-1/2007. In a monitored area, the nests found after egg-laying were tagged and covered with a sheet of metal grill (Figure 1).

Under conditions of natural incubation, only two eggs were collected daily from the nests, starting on the tenth day of incubation. The other eggs were left in the nest until the next collection, throughout the period of incubation (Figure 1). A total of 186 eggs were collected from six different nests situated in the following geographic locations: nest 1 – 08° 19' 08.8" S and 63° 28' 54.3" W; nest 2 – 08° 18' 32.7" S and 63° 29' 09.5" W; nest 3 – 08° 19' 13.6" S and 63° 28' 07.3" W;



Figure 1. Marking system and control of the nests of *Melanosuchus niger*. a) Observation and counting of eggs found in the nest after laying; b) marking and protection the nest with metal screen; c) manipulation of nest for collection; d) thermometer to record the air temperature and in the nest.

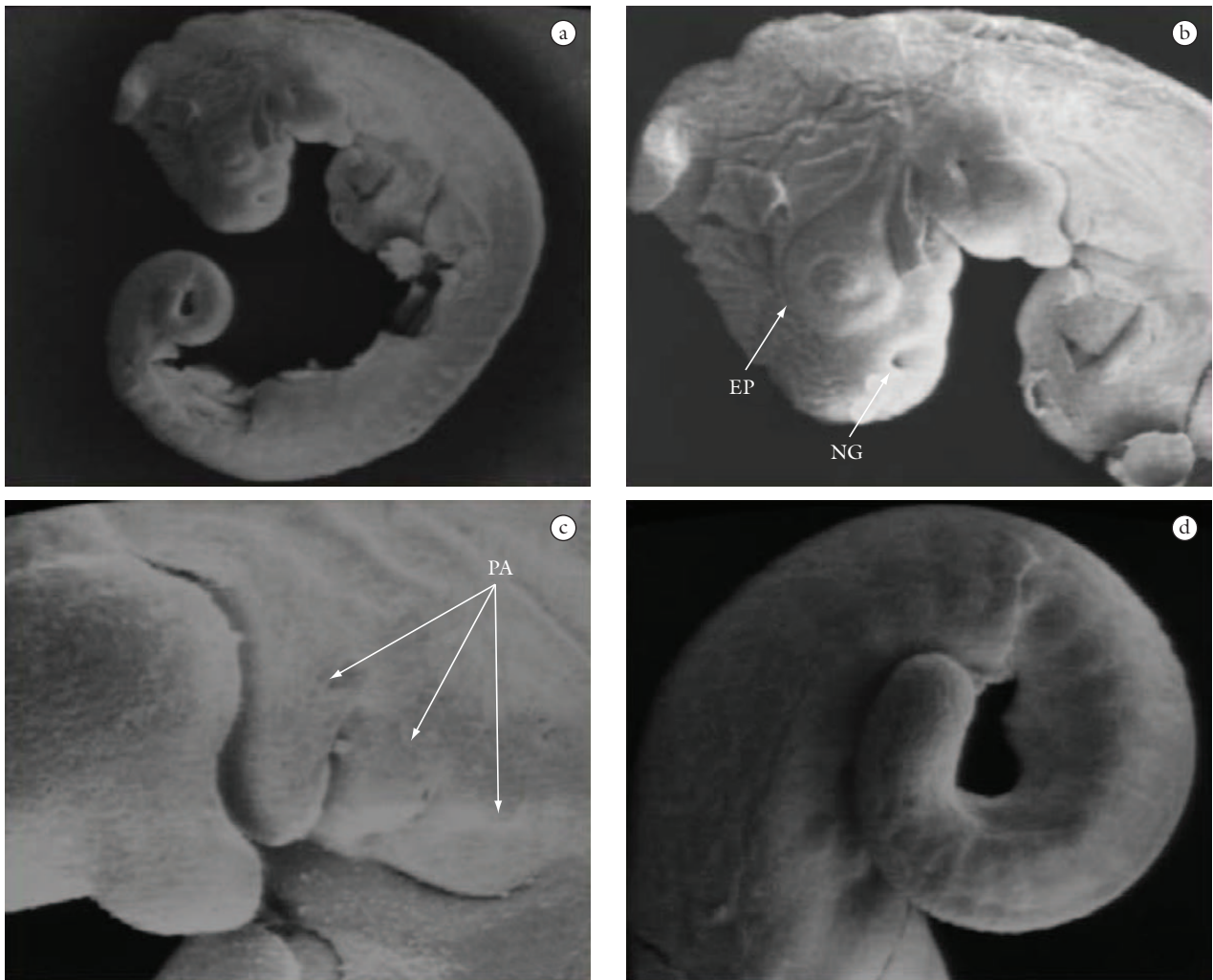


Figure 2. Scanning electron microscopy of stage 4 of *M. niger* in lateral view. a) Panoramic view; b) details of eye primordium and nasal groove; c) pharyngeal arches; d) extremity of the tail. OP, optic placode; NG, nasal groove; EP, eye primordium; PA, pharyngeal arches.

nest 4 – 08° 19' 15.3" S and 63° 28' 02.8" W; nest 5 – 08° 19' 59.5" S and 63° 27' 29.5" W and nest 6 – 08° 19' 12.0" S and 63° 28' 24.1" W. The air temperature varied from 25.2 to 31.7 °C, while the temperature in the nests ranged from 28.2 to 31.5 °C throughout the period of incubation. The embryos were removed from their shells with surgical scissors and the specimens fixed in 10% formalin. At the end of each collection, the specimens were sent to the Laboratory of Comparative Vertebrate Anatomy (LACV) at the University of Brasília – UnB for processing and analysis.

This *M. niger* reproduction area is strictly controlled by the RAN (National Center for Research and Conservation of Reptiles and Amphibians), an agency that conducts scientific research and management actions for the conservation and recovery of endangered species throughout the Brazilian territory. All the procedures involving the animals were described in detail and approved by the Research Ethics Committee of UnB (UnBDOC No. 100271/2009). All specimens were deposited in the LACV at the University of Brasília.

The embryonic stages were determined according to the appearance of different external morphological traits at a given moment of development. The main structures used as parameters were: pharyngeal arches, somites, choroidal fissure, limb buds, fore and hindlimb claws, nasal structures, development of the urogenital papilla, cloaca, nictitating membrane, eyelids, pigmentation, amount of vitellus absorption, and emergence of teeth and eggtooth. The terminology employed here followed that used by Iungman, Piña and Siroski (2008), Ferguson (1985) and Magnusson and Taylor (1980). These structures were examined in detail under a stereoscopic microscope (Leica S6D) and the information was visually recorded with a digital camera (Sony DSC H20 10.1).

The first embryos were also analyzed by scanning electron microscopy (SEM) to reveal some of the principal elements present in the early stages of development. These specimens were fixed in a solution of glutaraldehyde and paraformaldehyde immediately after their removal. After fixation, the material was preserved in sodium cacodylate buffer to await the post-fixation process, when it was

immersed in an osmium tetroxide solution. The material was then subjected to a process of gradual dehydration in baths of aqueous solutions of 30, 50, 70 and 90% of acetone and three 15-minute baths of pure acetone followed by critical point drying with CO₂ and surface metallization in a sputter coater. The material was then photographed in a JEOL JSM 840A scanning electron microscope.

We established 24 stages of embryonic development (stages 4 to 28) between the formation of the pharyngeal arch and hatching. Our description began in stage 4 due to two factors. First, the nonavailability of material during the initial stages of cleavage to neurulation, and second, our youngest embryo presented very similar traits to those described in stage 4 by Jungman, Piña and Siroski (2008).

3 Results

Below is the description of the stages of embryonic development of Alligatoridae *M. niger*, based on the main external morphological traits starting from the tenth day of oviposition.

Stage 4 (10-day old embryo): Approximately 26 pairs of somites are visible on the dorsum of the embryo. The mandibular arch is the largest of the three pharyngeal arches that are present. Two clefts are open laterally, the second cleft covered by the hyoid arch. Five cephalic vesicles are visible in the rostral portion of the embryo. The optic placodes appear conspicuously, while the auditory placodes are present dorsally to the pharyngeal arches on the lateral aspect of the body. There are signs of a nasal placode in the rostral portion (Figures 2, 7a). The heart primordium appears as a prominence on the ventral side and a protuberance immediately caudal to this organ indicates the liver primordium. The notochord extends to the tip of the tail. The curvature of the body begins with flexion of the trunk at the level of the heart, and J-shaped flexion of the tail is already visible.

Stage 5 (11 to 12-day old embryo): There are 28 pairs of somites. The maxillary process extends ventrally to the mandibular process. Thoracic and pelvic limbs are present as small distinct buds. The axis of the limb is caudoventrally oriented. The flexion of the trunk is greater, giving the embryo a U-shape, and the tip of the tail is much more curled (Figure 3a).

Stage 6 (13 to 14-day old embryo): The mandibular process is more conspicuous. Thoracic and pelvic limb buds are larger and show signs of digital plate primordial (Figures 3b, 5a, 6a). The embryo's flexion increases gradually and the tip of the snout lightly touches the tail. The eye has weak pigmentation of the choroid layer. The nasal placode is deeper and extends caudally (Figure 3b).

Stage 7 (15 to 16-day old embryo): The digital plate of the pelvic limb buds is evident, but still lacks digital grooves, and the thoracic limb buds are less developed. Eye pigmentation is stronger, and invagination of the optic vesicles creates the choroid fissure.

Stage 8 (17 to 18-day old embryo): The digital plates of the thoracic and pelvic limbs are wider and show slight signs of digital grooves. Elbows are recognizable in the thoracic limb buds, while the knees of the pelvic limb buds are still imperceptible. The rostral edge of the mandibular process is situated at the level of the caudal edge of the crystalline lens

of the eye. A small protuberance indicates the primordium of the urogenital papilla located on the ventral surface at the root of the tail between the pelvic limbs. The primordium of the external auditory meatus is clearly visible in the rostralateral region of the embryo (Figures 3c, 5b, 6b).

Stage 9 (19 to 20-day old embryo): The digital plates of the pelvic and thoracic limbs are completely developed, but without digital serration. The eyeball is prominent, with clearly visible upper eyelid. The mandibular process extends rostrally, encompassing two thirds of the maxilla.

Stage 10 (21 to 22-day old embryo): The upper eyelid is developed, invagination of the optic vesicles is complete, and the choroidal fissure narrows and closes. The mouth is well developed, extending toward the cardiac prominence. The digital grooves of the pelvic limbs are more pronounced. The horizontal projection of the snout is prominent on the lateral sides (Figures 3d, 6c).

Stage 11 (23 to 25-day old embryo): The periphery of the digital plate of the thoracic limbs shows distinct grooves and a weak demarcation of four digits is visible by serration. The upper eyelid reaches the upper edge of the iris. The abdominal wall is developed, but the ventricles, liver and other organs are still visible and the intestine is visible through the transparent abdominal wall (Figures 5c, 6d).

Stage 12 (26-day old embryo): In this stage, the embryo is notably longer and the outlines of the fore- and hind-limb digits are visible in the expanded discs of the limbs. The presence of the lower eyelid and the nictitating and tympanic membranes is evident. The brain is still visible through the transparent tissues at the top of the head and still presents a median groove. The body's ventral wall musculature is still open in the median line. The tail is clearly bent at the distal end distal. Elbows and knees are recognizable in the limbs and are slightly flexed at the joint. Subtle pigmentation appears first on the head, specifically between the eyes and snout (Figures 3e, 5d, 6e).

Stage 13 (27 to 29-day old embryo): The median groove of the brain is more evident. Fore and hindlimb digits are clearly demarcated around the digital plate and are slightly serrated in both limbs. The eyelids are well formed and cover most of the eye (Figure 7b). The urogenital papilla between the pelvic limbs is now less exposed. The body's pigmentation is stronger, and the dorsal surface and tip of the tail are darker (Figure 3f).

Stage 14 (30 to 31-day old embryo): Interdigital grooves are more distinctly formed, demarcating the digits of fore and hindlimbs. Pigmentation areas are now concentrated in the tail, limbs and dorsal side of the neck. Facial pigmentation is more intense and pigment spots are visible on the mandible. Presence of the cloacal primordium with two small lobes. In this stage, claws begin to develop in the first, second and third digits of the foot and in the first and second digits of the hand (Figures 3g, 5e).

Stage 15 (32-day old embryo): The cloacal orifice now involves the urogenital papilla (Figure 7e). Claws are clearly visible in the digits of both hands and feet and the tip of the claw of the second digit is slightly curved. There is large-scale dorsal and tail pigmentation, giving the embryo a slightly brownish appearance. Another marked characteristic is the emergence of the first rows of nuchal scutes.

Stage 16 (33 to 38-day old embryo): The upper and lower eyelids are separated only by a narrow cleft. There

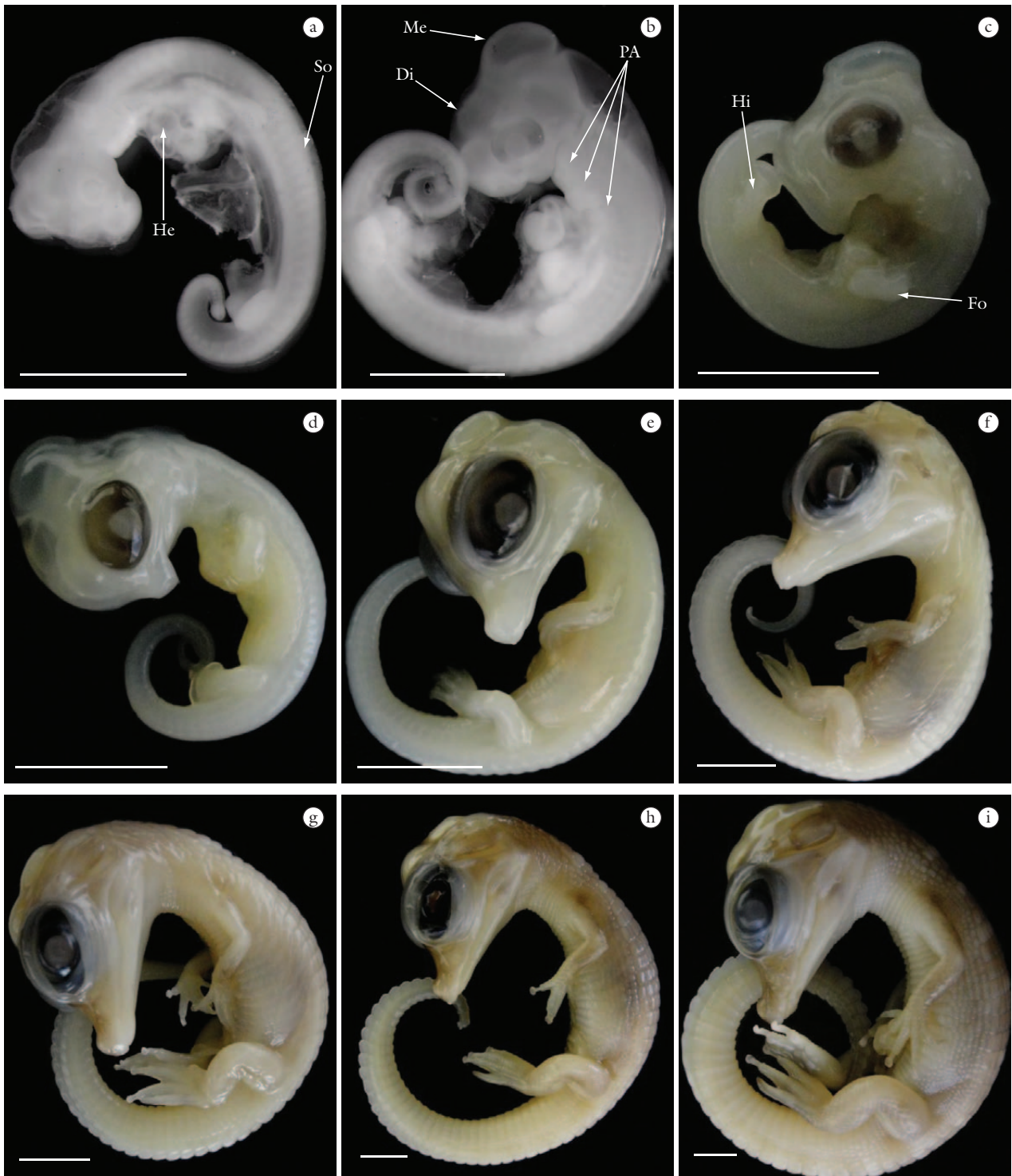


Figure 3. Photographs of the embryonic stages of *M. niger* in lateral view. a) Stage 5; b) stage 6; c) stage 8; d) stage 10; e) stage 12; f) stage 13; g) stage 14; h) stage 16; and i) stage 18. Di, diencephalon; Mi, midbrain; He, heart, Fo, forelimb; Hi, hindlimb. PA, pharyngeal arches; So, somites. Scale bar: 1 cm.

are five rows of nuchal scutes, slightly pigmented. A series of protrusions in the digits mark the beginning of the interphalangeal joints. Pigmentation extends toward the thoracic and pelvic limbs. The claw of the third digit is laterally flattened and ventrally curved, while the other claws are still flat (Figures 3h, 5f, 6f).

Stage 17 (39-day old embryo): The abdominal wall musculature is now completely fused along the median ventral line except in the umbilical region. Thus, the previously exposed intestine is now completely retracted. The outlines of the digits are totally individualized and the differences in their sizes clearly visible.

Stage 18 (40 to 45-day old embryo): Seven rows of nuchal scutes are present on the dorsal side of the embryo. A marked characteristic in this stage is the emergence of a small eggtooth at the tip of the maxilla (Figures 7c, d). The claws of the digits are curved. The entire body of the embryo shows increased pigmentation, changing from pale to dark gray (Figures 3i, 5g, 6g).

Stage 19 (46 to 47-day old embryo): In this stage the pigmentation pattern of the whole body appears as on hatchling, with the typical black dorsal stripes alternating with light brown stripes. The head is brown, but lighter than the hatchling.

Stage 20 (48 to 50-day old embryo): The size of the umbilical opening is now smaller. The surface of the head shows dark brown pigmentation. Cranial ossification is practically complete except for a small oval window, the fontanelle in the center of the dorsal platform of the skull, through which the brain is still visible.

Stage 21 (51 to 52-day old embryo): The cloacal orifice is completely closed and the urogenital papilla no longer visible. The entire body shows more intense pigmentation. Musk glands are barely visible along the caudolateral edges of the interangular floor of the mandible (Figure 4a).

Stage 22 (53 to 55-day old embryo): The tail scutes emerge, showing more intense pigmentation. The pupil presents a vertical cleft. The tympanic membrane covers the entire external auditory meatus (Figure 4b).

Stage 23 (56-day old embryo): The cranially oriented scutes of the tail are bristled, like those of hatchling. The mandible and maxilla begin to show the emergence of protuberances signaling tooth primordia. Pigmentation does not change perceptibly from that found in stage 22 (Figure 4c).

Stage 24 (57 to 66-day old embryo): The eyelid remains open but covers more than half of the eye. Both eyes

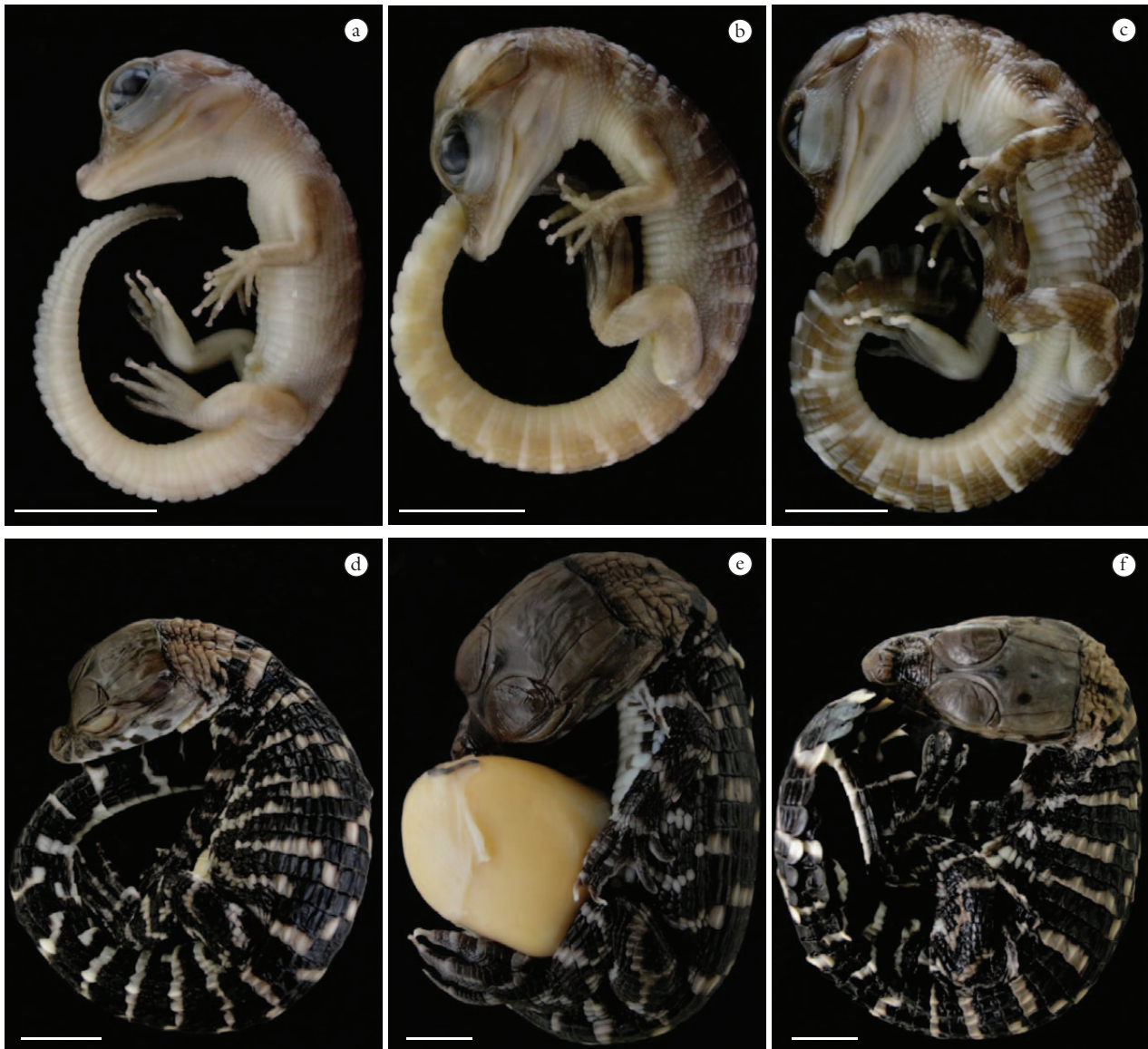


Figure 4. Photographs of the embryonic stages of *M. niger* in lateral view. a) Stage 21; b) stage 22; c) stage 23; d) stage 24; e) stage 27; and f) stage 28. Scale bar: 2 cm.

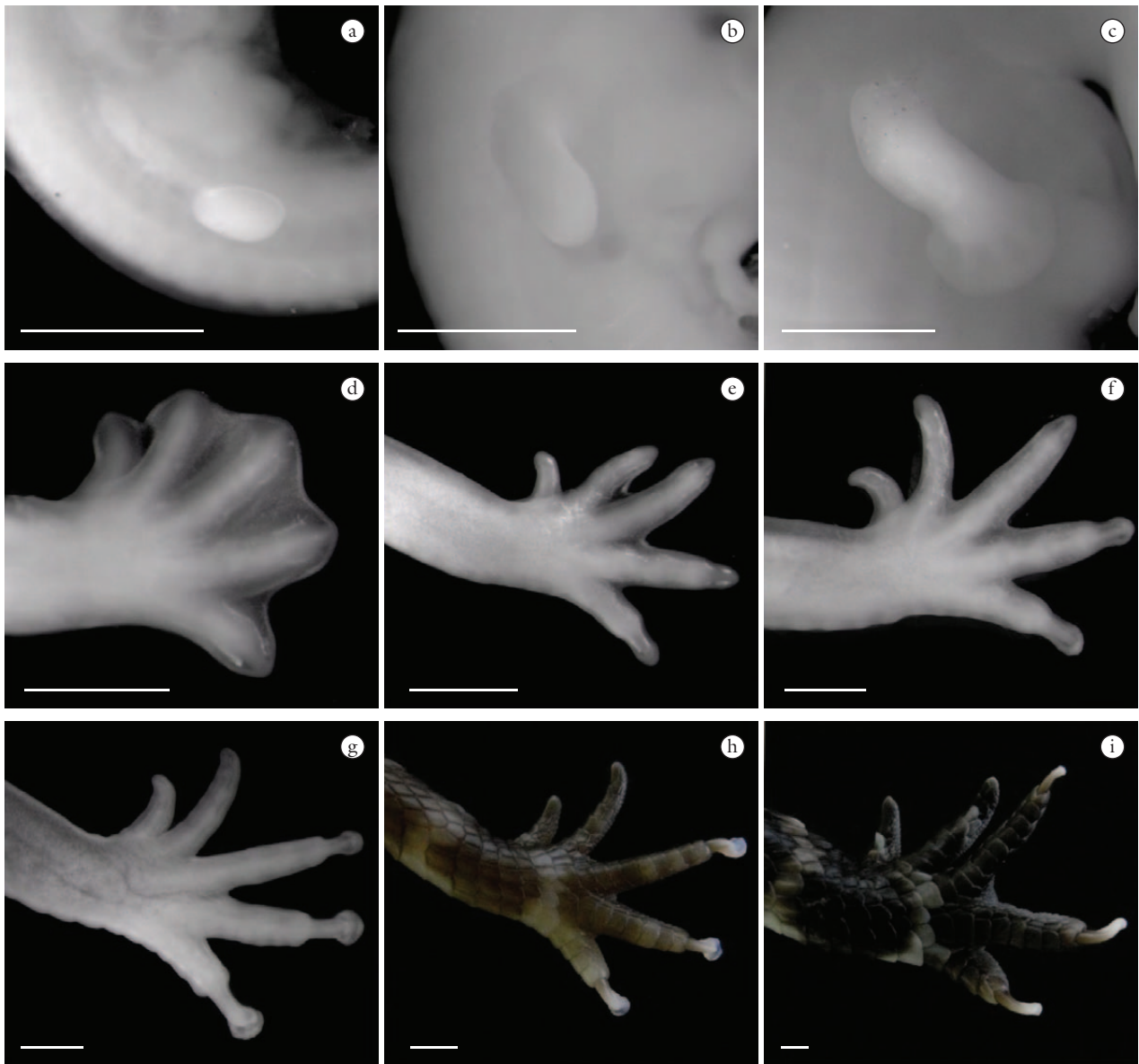


Figure 5. Photographs of the development of the forelimb of *M. niger*. a-c) Lateral view of right forelimb in stages 6, 8 and 11, respectively; d-i) dorsal view of right hand; d) stage 12; e) stage 14; f) stage 16; g) stage 18; h) stage 24; and i) stage 27. Note the progressive development of the digital plate and digital serration in limb and the appearance of claws. Scale bar: 1 mm.

and body of the embryo show more intense pigmentation (Figure 4d).

Stage 25 (67 to 71-day old embryo): Both eyelids are completely formed and completely cover the surface of the eye. Albeit no longer visible through the cranial tissue, the cranial fontanelle is still present and can be felt through palpation. Now both the pigmentation and striped pattern are typical of the hatchling. Another marked characteristic in this stage is the beginning of vitelline absorption, which begins to be encompassed by the embryo.

Stage 26 (72 to 75-day old embryo): About 50% of the vitelline sac is encompassed by the embryo. The first teeth emerge in the mandible and maxilla. Other traits remain unaltered.

Stage 27 (76 to 77-day old embryo): The vitelline sac is completely encompassed, leaving only an median raphe (Figures 4f, 7f).

Stage 28 (78 to 91-day old embryo): Embryos in this stage are very close to hatching, and their median raphe is long and narrow. The cranial fontanelle is closed and the roof of the skull is well developed (Figures 4f).

4 Discussion

The series of stages of normal embryonic development found in the present study enables us to compare *M. niger* with three other crocodylian species in order to observe the similarities and differences among these strongly related taxa, as well as make comparisons with other reptile, bird and mammal species.

Unlike other groups of vertebrates such as *Ichthyophis kohtaoensis* of the order Gymnophiona (DUNKER, WAKE and OLSON, 2000), the anuran *Hyperolius puncticulatus* (CHIPMAN, HAAS, TCHERNOV et al., 2000) and

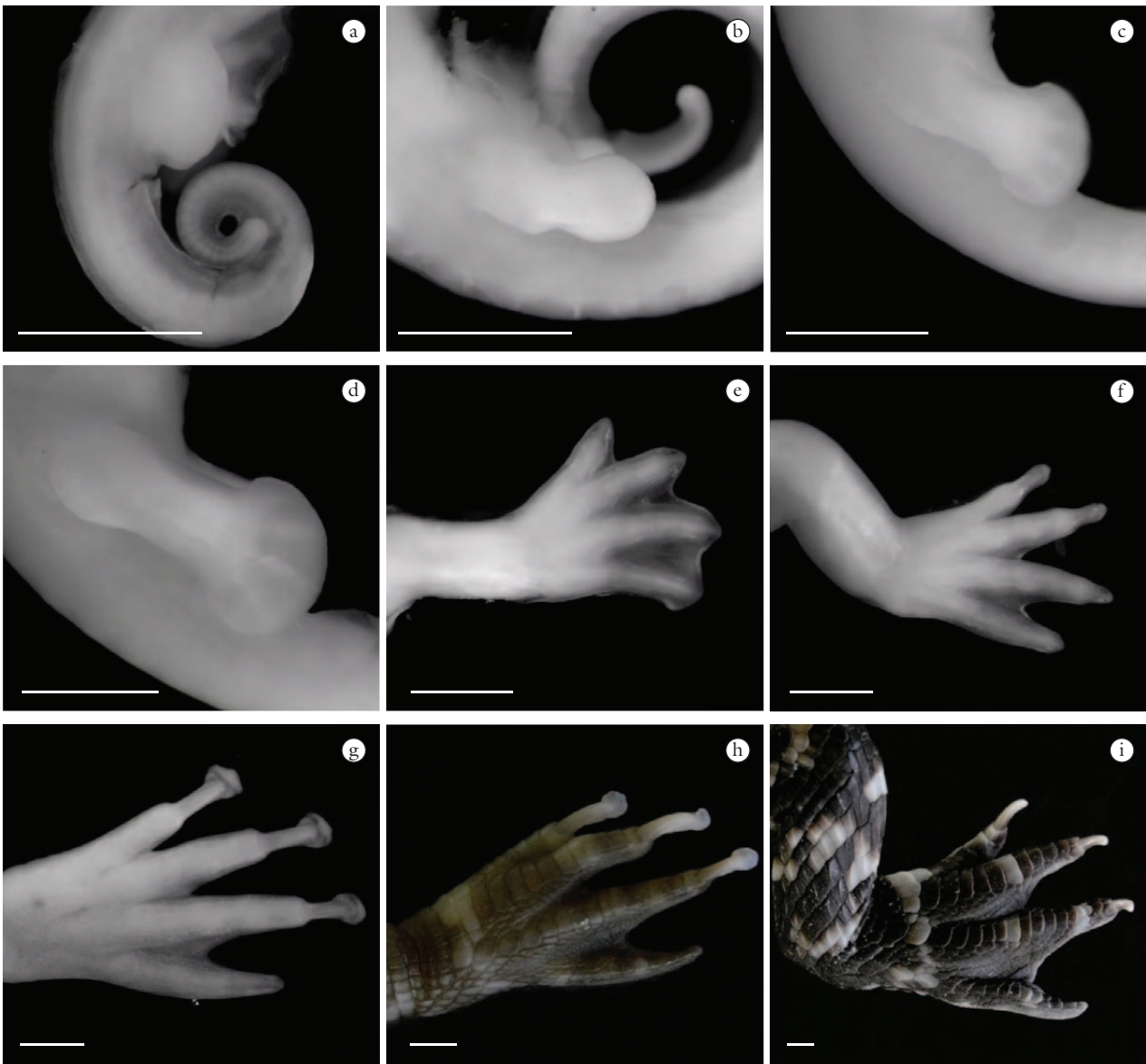


Figure 6. Photographs of the development of the hindlimb of *M. niger*. a-d) Lateral view of right hindlimb in stages 6, 8, 10 and 11, respectively; e-i) dorsal view the right foot; e) stage 12; f) stage 16; g) stage 18; h) stage 24; and i) stage 27. Note the progressive development of the digital plate and digital serration in limb and the appearance of claws. Scale bar: 1 mm.

Squamata (HUBERT, 1985), embryos of Testudines do not present species-specific traits in early stages (RENOUS, RIMBLOT-BALY, FRETEY et al., 1989), as has been found in the aforementioned crocodylians and in *M. niger*. For a better comparison, we have organized the stages of development in chronological sequence.

In the vertebrates *Paroedura pictus* (NORO, UEJIMA, ABE et al., 2009), lizards of the genus *Anolis* (SANGER, LOSOS and GIBSON-BROWN, 2008), *Pelodiscus sinensis* (TOKITA and KURATANI, 2001), *A. spinifera* (GREENBAUM and CARR, 2002), *G.g.domesticus* (HAMBURGER and HAMILTON 1992), *A. mississippiensis* (FERGUSON, 1987), *C. latirostris* (IUNGMAN, PIÑA and SIROSKI, 2008) and *C. porosus* (MAGNUSSON and TAYLOR, 1980), the early stages were determined by the emergence of the primary brain vesicles, placodes,

pharyngeal arches, number of somites, and body flexion and rotation. The intermediate stages were marked by the emergence and morphology of the limbs and craniofacial traits, while the later stages were detected by differentiated pigmentation and the scutal patterns were the most marked traits in both crocodylians and Testudines. The embryonic stages of *M. niger* were determined according to these criteria, since these traits have become practically a standard for comparative studies of reptile embryos (GREENBAUM and CARR, 2002).

According to Graham (2001), the pharyngeal arches contribute significantly to the external appearance of the embryo in the early stages. Initially, they consist of segments of mesenchymatous tissue separated by the branchial clefts. These arches begin to emerge before stage 7 in the embryological stages of *A. mississippiensis* (FERGUSON,

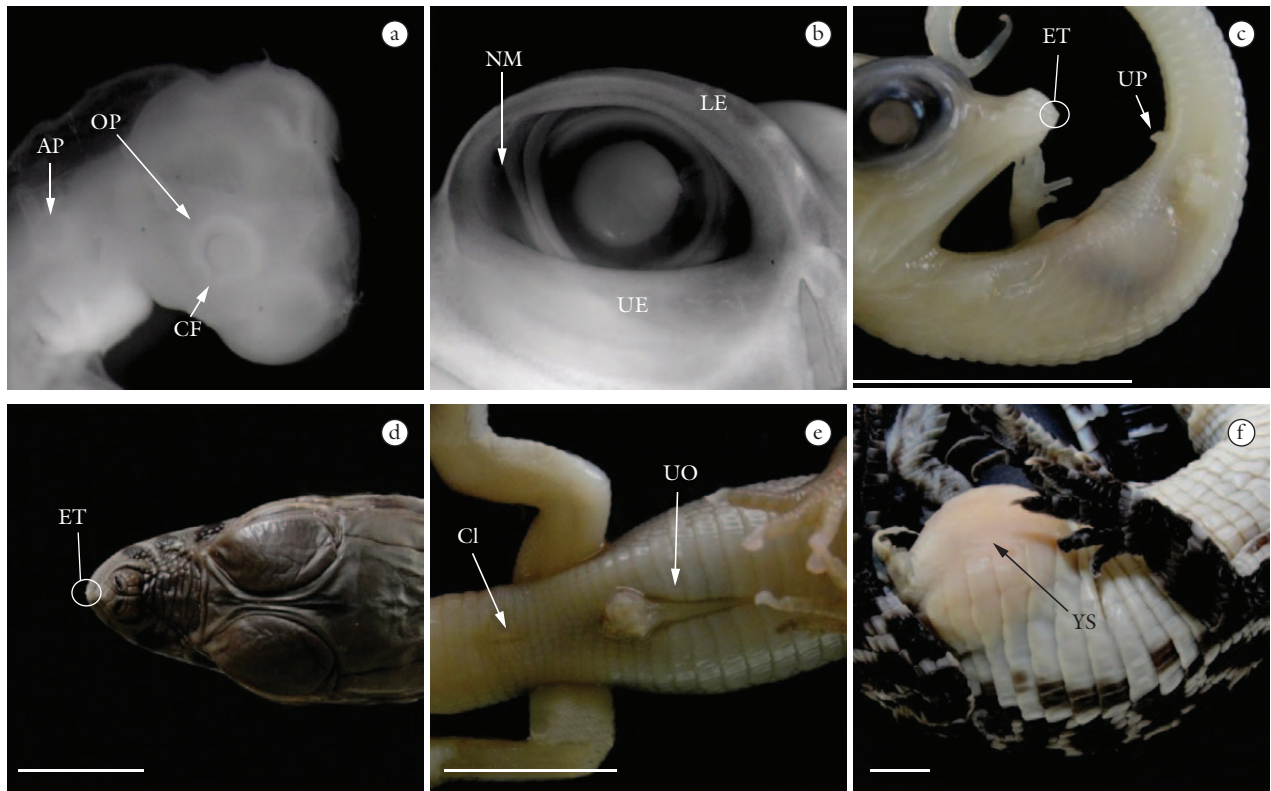


Figure 7. Photographs of the embryonic stages of *M. niger*. a-c) Lateral view; a) stage 5; b) stage 15; c) stage 18; d) stage 24 in dorsal view; e) stage 15 in ventral view; and f) stage 27. CF, Choroid fissure; OP, optic placode; AP, auditory placode; LE, lower eyelids; UE, upper eyelids; NM, nictitating membrane; UP, urogenital papilla; ET, eggtooth; UO, umbilical opening; Cl, cloaca; YS, yolk sac. Scale bar: 1 cm.

1987), and in *M. niger* specifically in stage 4, while for Iungman, Piña and Siroski (2008), these mesenchymatous structures are visible precisely in stage 7, and Magnusson and Taylor (1980) described the emergence of two pharyngeal arches in *C. porosus* already in stage 1.

The optic placodes in *M. niger* emerge in stage 4, similar to what Ferguson (1987) observed in *A. mississippiensis* and Iungman, Piña and Siroski (2008) in *C. latirostris*, where the development of this structure begins in stage 4, although it is completed only in stage 6, while for *C. porosus* (MAGNUSSON and TAYLOR, 1980) this structure is described in stage 2. The formation of the auditory placode is reported by Ferguson (1987) for *A. mississippiensis*, by Iungman, Piña and Siroski (2008) for *C. latirostris* and by Magnusson and Taylor (1980) for *C. porosus* in stage 2, unlike *M. niger*, where it was only observed in stage 4. In *G.g.domesticus* (HAMBURGER and HAMILTON, 1992), the auditory placode is present in stage 14. A trait shared by the crocodylians *A. mississippiensis*, *C. latirostris*, *C. porosus* and *M. niger* is the emergence of the choroidal fissure in stage 7 and of the urogenital papilla in stage 8, which represent pronounced structures in these stages for the Crocodylia species, except for the choroid fissure in *C. porosus*, which was not described by Magnusson and Taylor (1980).

The emergence of the somites was evidenced principally by a dorsal protuberance in stage 4 of *M. niger*. Magnusson and Taylor (1980) reported their emergence in *C. porosus*

right at the beginning of development in stage 1, unlike the species *C. latirostris* (IUNGMAN, PIÑA and SIROSKI, 2008) and *A. mississippiensis* (FERGUSON, 1987), where they emerge in stage 2. It is important to note that although the somites appear early in these species, their number varies considerably during the primordium of their development, with 20 somites in *A. mississippiensis* and *C. latirostris*, 25 in *C. porosus* and 26 in *M. niger*. In our observations of *M. niger*, consistent with the descriptions of Iungman, Piña and Siroski (2008) for *C. latirostris*, individual observation of the somites became increasingly difficult starting from stage 5, which for *G.g.domesticus* (HAMBURGER and HAMILTON, 1992) occurred starting from stage 14. According to Hamburger and Hamilton (1992), this is in part due to dispersion of the mesoderm of the more cranial somites and, in the final stages, to the curvature of the tail. Therefore, other structures, such as the formation of the limbs, were used as identification criteria from stage 5 onward in crocodylians.

With regard to the development of the limbs, the Testudines exhibit a tendency for differentiation of the forelimbs before the hindlimbs, except for marine turtles, in which the limbs develop synchronously (MILLER, 1985). In birds, bats, *C. latirostris*, *C. porosus* and *M. niger* (IUNGMAN, PIÑA and SIROSKI, 2008; BEGGS, YOUNG, GEORGES et al., 2000; CRETEKOS et al., 2005; HAMBURGER and HAMILTON, 1992; MAGNUSSON and TAYLOR, 1980), the forelimb buds emerge prior or

simultaneously with the hindlimb buds. This information is not consistent with the descriptions of Ferguson (1985, 1987) for *A. mississippiensis*, in which the emergence of the hindlimbs occurs first.

Among the amphibians, even within a single genus, there is considerable variation in the sequence of emergence of the limbs. In *Xenopus*, the hindlimb buds appear first (NIEUWKOOP and FABER, 1994), unlike *Ambystoma* (HARRISON, 1969; SCHRECKENBERG and JACOBSON, 1975), which still present significant differences among several species (SCHRECKENBERG and JACOBSON, 1975), as well as in *Rana*, where the hindlimb buds emerge in different stages (SHUMWAY, 1940). Variations in the chronology limbs development may reflect a functional value. The forelimb buds in the possum (McCRADY, 1938), for instance, develop more rapidly than in other mammal species. According to the author, this heterochrony reveals an adaptation to the characteristics of marsupial reproductive biology, since newborns must use these limbs to climb up into the pouch.

Unfortunately, we were unable to observe whether there is an order in the emergence of these limbs in *M. niger* due to their rapid development, even with specimens collected daily. We believe new studies may reflect the lack of a complete ontogenetic series, making it difficult to observe the development of this trait. We also suggest that the unequivocal observation of these possible events will require more precise analyses of many specimens in the stages in which these episodes occur, possibly at intervals shorter than 24 hours.

In this context, we point out that the time of emergence of the hind and forelimb buds is extremely variable. This diverges notably from the phylotypic concept put forward by Haeckel (1891), in which the morphology of vertebrate embryos in the early stages of development is considered resistant to evolutionary changes. However, upon analyzing these and other prominent traits on the planes of the body of these vertebrates, we see evidence of considerable evolutionary modifications in the comparison of embryos of different species.

In the final stages, unlike other crocodylian species, *C. latirostris* and *M. niger* exhibit apparent pigmentation only after the formation of the jaws and claws. In both these crocodylians, pigmentation begins along the limbs, spreading up the ventral side of the flanks, jaws and back, but showing little or no ventral pigmentation, unlike other crocodiles that present pigmentation first in the ventral portion which then extends dorsally (FERGUSON, 1985, 1987). Iungman, Piña and Siroski (2008) reported that the coloration pattern of *C. latirostris* during its development is a unique trait, since it differs from that reported for the other crocodylians. However, our investigation of *M. niger* revealed a pigmentation pattern with aspects resembling those of *C. latirostris*, indicating a closely associated trait between these two species.

An interesting trait to highlight is the emergence of the egg tooth which, according to Ferguson (1987), marks the beginning of stage 26, although the author did not describe this stage due to the absence of this structure in his series of embryos of *A. mississippiensis*. Later, Iungman, Piña and Siroski (2008) concurred with this statement, although they reported that the egg tooth of *C. latirostris* begin to emerge in stage 23. On the other hand, in our

observations of embryos of *M. niger*, the egg tooth became visible in stage 18. We also found that this structure was very fleeting, disappearing a week after its emergence, as has been seen in most birds (the egg tooth disappears within the first week after hatching). However, this structure may also remain for longer times, as Wiebe (2010) observed. This author concludes that in some bird species, the size and persistence of the egg tooth suggests an alternative or complementary function, such as orientation of the parents while feeding their young in nests located in sites with little light (WIEBE, 2010). The lack of quantitative data about the persistence of the egg tooth in crocodylians rendered it impossible to associate them with any other function in these reptiles.

The variations in the chronological emergence of the structures can be explained, in part, by the incubation temperature, which may vary under natural conditions within and among nests; hence, the incubation period is often variable (LANG, ANDREWS and WHITAKER, 1989; PIÑA, LARRIERA, MEDINA et al., 2007). In addition to temperature, development may be influenced by other variables such as nest humidity (PACKARD and PACKARD, 1984), gas environment (WARBURTON, HASTINGS and WANG, 1995) and acid-base equilibrium (ETCHBERGER, EWERT, PHILLIPS et al., 1992). This may explain the differences between the species reported by Ferguson (1987), Iungman, Piña and Siroski (2008), Magnusson and Taylor (1980), and *M. niger*, considering that the latter was collected in an area of natural incubation. Thus, the main differences are concentrated in chronological variations. Further studies are needed for a comparative phylogenetic analysis due to the high potential for intra and interspecific variations in species.

Acknowledgements: We wish to express our sincere thanks to Maria Marlene M. Olegário and Matias Szabó for allowing the use of the Tick Research Laboratory (LABIX) to capture the images, to Beatrice Allain, Pedro Ivo Molina Pellicano and Tainã Rapp Py-Daniel for the translation. This work was supported by the National Center for Research and Conservation of Reptiles and Amphibians (RAN), of the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio).

References

- AINSWORTH, S.J., STANLEY, R.L. and EVANS, DJR. Developmental stages of the Japanese quail. *Journal of Anatomy*, 2010, vol. 216, p. 3-15.
- BEGGS, K., YOUNG, J., GEORGES, A. and WEST, P. Ageing the eggs and embryos of the pig-nosed turtles, *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelyidae), from northern Australia. *Canadian Journal of Zoology*, 2000, vol. 78, p. 373-392.
- BOUGHNER, J.C., BUCHTOVÁ, M., FU, K., DIEWERT, V., HALLGRÍMSSON, B. and RICHMAN, J.M. Embryonic development of *Python sebae* – I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology*, 2007, vol. 110, p. 212-230.
- CHIPMAN, AD., HAAS, A., TCHERNOV, E. and KHANER, O. Variation in anuran embryogenesis: Differences in sequence and timing of early developmental events. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, vol. 88, p. 352-365.

- CRETEKOS, CJ., WEATHERBEE, SD., CHEN, C., BADWAIK, NK., NISWANDER, L., BEHRINGER, RR. and RASWEIRLER JJ. Embryonic staging system for the short-tailed fruit bat. *Carofilia perspicillata*, a model organism for the mammalian order Chiroptera, based upon timed pregnancies in the captive-bred animals. *Developmental Dynamics*, 2005, vol. 233, p. 721-738.
- DA SILVEIRA, R., MAGNUSSON, WE. and CAMPOS, Z. Monitoring the distribution, abundance and breeding areas of *Caiman crocodilus* and *Melanosuchus niger* in the Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. *Journal of Herpetology*, 1997, vol. 31, p. 514-520.
- DONAYO, P., PINA, C. and LARRIERA, A. Período de incubación, banda de calcificación, peso de los huevos y desarrollo embrionario de *Caiman latirostris* a três temperaturas diferentes. In: LARRIERA, A. and VERDADE, LM. *La conservación y al manejo de Caimanes y Crocodrilos de América Latina*. Piracicaba: C. N. Editora, 2002. p. 79-90.
- DUNKER, N., WAKE, MH. and OLSON, WM. Embryonic and larval development in the caecilian *Ichthyophis kohtaoensis* (Amphibia, Gymnophiona): a staging table. *Journal of Morphology*, 2002, vol. 43, p. 3-34.
- ETCHBERGER, CR., EWERT, MA., PHILLIPS, JB., NELSON, CE. and PRANGE, HD. Physiological responses to carbon dioxide in embryonic red-eared slider turtles, *Trachemys scripta*. *Journal of Experimental Zoology*, 1992, vol. 264, p. 1-10.
- FERGUSON, MWJ. Post-laying stages of embryonic development in crocodilians: In: WEBB, GJW., MANOLIS, SC. and WHITEHEAD, PJ. *Wildlife management: crocodiles and alligators*. Chipping Norton: Surrey Beatty & Sons, 1987. p. 427-444.
- FERGUSON, MWJ. Reproductive biology and embryology of the crocodilians. In: GANS, C., BILLET, F. and MADERSON, PFA. *Biology of the reptilian*. New York: John Wiley and Sons, 1985. p. 329-491.
- GRAHAM, A. The development and evolution of the pharyngeal arches. *Journal of Anatomy*, 2001, vol. 199, p. 133-141.
- GREENBAUM, EB. and CARR, JL. Staging criteria for embryos of the spiny softshell turtle, *Apalone spinifer* (Testudines: Trionychidae). *Journal of Morphology*, 2002, vol. 254, p. 272-291.
- HAECKEL, E. *Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen*. Leipzig: Engelmann, 1891.
- HAMBURGER, V. and HAMILTON, HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 1992, vol. 195, p. 231-272.
- HARRISON, RG. Harrison stages and description of the normal development of the spotted salamander, *Ambystoma punctatum* (Linn). In: WILENS, S. *Organization and development of the embryo*. New Haven: Yale University Press, 1969. p. 44-66.
- HERRON, JC., EMMONS, LH. and CADLE, JE. Observations on reproduction in the black Caiman, *Melanosuchus niger*. *Journal of Herpetology*, 1990, vol. 24, p. 314-316.
- HORNA, V., ZIMMERMANN, R., CINTRA, R., VÁSQUEZ, P. and HORNA, J. Feeding ecology of the black caiman (*Melanosuchus niger*) in Manu National Park, Peru. *Lyonia*, 2003, vol. 4, p. 65-72.
- HUA, TM., WANG, CL. and CHEN, BH. Stages of embryonic development for *Alligator sinensis*. *Zoological Research*, 2004, vol. 25, p. 263-271.
- HUBERT, J. Embryology of the squamata. In: GANS, C. and BILLET, F. *Biology of the reptilia*. vol. 15. Development B. New York: John Wiley and Sons, 1985. p. 1-34.
- IUNGMAN, J., PIÑA, CI. and SIROSKI, P. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Genesis*, 2008, vol. 46, p. 401-417.
- KAMAL, AM. and HAMMOUDA, HG. The development of the skull of *Psammophis sibilans*. I. The development of the chondrocranium. *Journal of Morphology*, 1965, vol. 116, p. 197-245.
- KAMAL, AM., HAMMOUDA, HG. and MOKHTAR, FM. The development of the osteocranium of the Egyptian Cobra: I. The embryonic osteocranium. *Acta Zoologica*, 1970, vol. 970, p. 1-17.
- LANG, JW., ANDREWS, H. and WHITAKER, R. Sex determination and sex ratios in Crocodilians. *Journal of Experimental Zoology*, 1989, vol. 270, p. 28-44.
- MAGNUSSON, WE. and TAYLOR, JA. A description of developmental stages in *Crocodylus porosus*, for use in adding eggs in the field. *Australian Wildlife Research*, 1980, vol. 7, p. 479-485.
- MCCRADY, E. Embryology of the opossum. *The American Anatomical Memoirs*, 1938, vol. 16, p. 1-233.
- MEDEM, F. Osteologica craneal, distribución geográfica y ecología de *Melanosuchus niger* (Spix) (Crocodylia, Alligatoridae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas, y Naturales*, 1963, vol. 12, n. 45, p. 5-19.
- MILLER, JD. Embryology of marine turtles. In: GANS, C.; BILLET, F. and MADERSON, PFA. *Biology of the Reptilia*. New York: John Wiley and Sons, 1985. p. 269-328.
- NIEUWKOOP, PD. and FABER, J. *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. New York: Garland, 1994.
- NORO, M., UEJIMA, A., ABE, G., MANABE, M. and TAMURA K. Normal developmental stages of the madagascar ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 2009, vol. 238, p. 100-109.
- PACKARD, GC. and PACKARD, MJ. Coupling of physiology of embryonic turtles to the hydric environment. In: SEYMOUR, RS. *Respiration and metabolism of embryonic vertebrates*. Doudrecht: Junk Publishers, 1984. p. 99-199.
- PARKER, WK. On the structure and development of the skull in the common snake, *Tropidonotus natrix*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1879, vol. 169, p. 385-417.
- PIÑA, CI., LARRIERA, A., MEDINA, M. and WEBB, GJW. Effects of incubation temperature on the size of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) at hatching and after one year. *Journal of Herpetology*, 2007, vol. 41, p. 209-214.
- REESE, AM. *The Alligator and Its Allies*. New York: G. P. Putnam's Sons, 1915.
- RENOUS, S., RIMBLOT-BALY, F., FRETEY, J. and PIEAU, C. Caractéristique du développement embryonnaire de la tortue luth, *Dermodochelys coriacea* (Vandelli, 1761). *Annales des sciences naturelles. Zoologie et Biologie*, 1989, vol. 10, no. 4, p. 197-229.
- RISLEY, PL. Observations on the natural history of the common musk turtle, *Sternotherus odoratus* (Latreille). *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters*, 1932, vol. 17, p. 685-711.
- SANGER, TJ., LOSOS, JB. and GIBSON-BROWN, JJ. A developmental staging series for the lizard genus *Anolis*: a new system for the integration of evolution, development and ecology. *Journal of Morphology*, 2008, vol. 269, p. 129-137.
- SCHRECKENBERG, GM. and JACOBSON, AG. Normal stages of development of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*, 1975, vol. 42, p. 391-400.
- SHUMWAY, W. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. *The Anatomical Record*, 1940, vol. 78, p. 139-147.

- TOKITA, M. and KURATANI, S. Normal embryonic stages of the Chinese softshelled turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological Science*, 2001, vol. 18, p. 705-715.
- TOWNSEND, DS. and STEWART, MM. Direct development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia*, 1985, p. 423-436.
- VOELTZKOW, A. Beitrage zur entwicklungs-geschichte der reptilien. 1. Biologie und entwicklung der ausseren korperform von *Crocodylus madagascariensis*. *Abhandl. Senckenb. Naturf. Ges.*, 1899, vol. 26, p. 1-150.
- WARBURTON, SJ., HASTINGS, D. and WANG, T. Responses to chronic hypoxia in embryonic alligators. *Journal of Experimental Zoology*, 1995, vol. 273, p. 44-50.
- WIEBE, KL. A supplemental function of the avian egg tooth. *Condor*, 2010, vol. 112, p. 1-7.
- YNTEMA, CL. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*, 1968, vol. 125, p. 219-251.

Received April 10, 2010
Accepted February 15, 2011