Métodos em Herpetologia

A Morfometria Geométrica e suas aplicações nos estudos de Serpentes

Natália Malaquias Souto[1,2,4*], Roberta Azeredo Murta-Fonseca[2,3], Daniel Silva Fernandes[1,2]

1 Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-902 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
2 Departamento de Vertebrados, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, 20940-040 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
3 Laboratório de Zoologia, Campus do Pantanal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 79304-902 Corumbá, MS, Brasil.
*Corresponding author. E-mail: souto.nm@gmail.com
DOI: 10.5281/zenodo.5211377

RESUMO

Na biologia a descrição da forma dos organismos serve como base para diversos estudos. Durante muitos anos pesquisadores buscaram técnicas que permitissem quantificar estatisticamente a variação de forma de organismos e/ou estruturas até que na década de 1980 houve o surgimento da Morfometria Geométrica (MG), técnica que permite analisar a forma dos organismos ou de determinada estrutura considerando o espaço de forma geométrica e usando métodos estatísticos multivariados. As análises de MG são baseadas em conjuntos de marcos anatômicos que carregam informações de coordenadas cartesianas indicando seu posicionamento exato na estrutura analisada. O conceito de tamanho em MG é dado pelo tamanho do centroide, definido como a quantidade de dispersão dos marcos anatômicos em torno do centro de gravidade da configuração (centroide). Já a forma é definida como a propriedade geométrica de um objeto que permanece após a retirada dos efeitos de localização, escala e orientação, que pode ser realizada através da Análise Generalizada de Procrustes. Para

avaliar o uso da MG em estudos de serpentes foi realizada uma pesquisa bibliográfica na qual foram levantados 55 artigos que utilizam essa técnica no estudo do grupo. O tema mais abordado é a variação morfológica associada ao habitat (20% dos artigos), seguido por delimitação de espécies e variação morfológica associada à dieta (17% cada). A maior parte desses trabalhos utiliza a morfologia externa da cabeça como fonte de informação (51%), seguida pela osteologia craniana (30%). Existe uma variedade de análises estatísticas multivariadas utilizadas nos trabalhos dependendo do objetivo. Contudo, cada vez mais estudos que relacionam a morfologia a fatores bióticos e/ou abióticos buscam avaliar a relação desses caracteres em um contexto evolutivo através de métodos filogenéticos comparativos, o que configura uma técnica poderosa para identificar associações e inferir pressões seletivas que geraram a diversidade biológica. Com essa pesquisa foi possível observar um número crescente de estudos de serpentes utilizando MG e a partir dos resultados dos mesmos há a amplificação das possibilidades de novas abordagens, o que permitirá uma melhor compreensão da evolução, ecologia e morfologia das serpentes.

INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da biologia a descrição da morfologia dos organismos serve como base para estudos de classificação taxonômica e diversidade de espécies, elevando a importância da análise da forma em diversos estudos biológicos (Adams et al. 2013). No século XVI o pintor e geômetra Albrecht Dürer, em seu livro "*Vier Bücher von menschlicher Proportion*" (Quatro livros de proporções humanas, tradução livre) de 1528, apresentou as primeiras tentativas de caracterizar as diferentes formas das estruturas do corpo humano por meio de deformações dos desenhos sobre uma grade sobreposta na qual modificações do tamanho das linhas e quadrículas causavam transformações nas proporções das estruturas (Monteiro & Reis 1999; Mitteroecker & Gunz 2009; Reyment 2010). No final do século XIX o zoólogo D'Arcy W. Thompson em seus estudos que culminaram na publicação da obra "*On Growth and Form*" (Sobre o crescimento e a forma) (Thompson 1917), retornou aos conceitos de linhas e quadrículas de Albrecht Dürer, sendo esse estudo considerado um marco para a exploração da temática da morfometria (Bookstein 1991; Marcus et al. 1996; Cohen 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012). O método de coordenadas proposto por Thompson baseava-se em mapear a localização de pontos homólogos entre as diferentes formas biológicas através da constru-

ção de grades de deformação, ilustrando como uma parte de um organismo pode ser descrita através da distorção desta mesma parte em outro organismo. Apesar da abordagem visualmente atraente, ainda não existia um arcabouço estatístico que permitisse estudar a variação da forma quantitativamente (Thompson 1917; Marcus et al. 1996; Monteiro & Reis 1999; Mitteroecker & Gunz 2009; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012).

Paralelamente, no final do século XIX, com base nos trabalhos de Francis Galton, Walter Weldon e Karl Pearson, deu-se início à formação de uma escola morfométrica (nomeada de Biométrica), com o intuito de estudar as variações da forma biológica através de correlações das distâncias medidas entre pontos localizados em estruturas biológicas (Reyment 1996, 2010). Essas correlações e os conceitos estatísticos utilizados por esses autores tornaram-se a base da análise multivariada desenvolvida no século seguinte (Reyment 1996; Monteiro & Reis 1999). No início do século XX houve uma transição de estudos puramente descritivos para abordagens com uma mudança de enfoque, que utilizavam a morfometria como uma ferramenta para o "estudo quantitativo da variação das formas biológicas" (Bookstein 1996; Monteiro & Reis 1999; Adams et al. 2013). Durante a década de 1930 desenvolveram-se análises estatísticas multivariadas que viriam a ser de suma importância para os avanços da morfometria (Fisher 1936; Teissier 1938), enquanto nas décadas de 1960 e 1970 a escola biométrica passou a utilizar tais ferramentas para descrever padrões de variação de forma dentro e entre grupos (Adams et al. 2004; Mitteroecker & Gunz 2009). Esse tipo de abordagem recebeu o nome de morfometria multivariada ou morfometria tradicional (MT) e consistia em aplicar análises estatísticas multivariadas a conjuntos de variáveis morfológicas (Jolicoeur 1959; Jolicoeur & Mosimann 1960; Blackith & Reyment 1971; Marcus 1990; Reyment 1991; Adams et al. 2004; Mitteroecker & Gunz 2009).

Na MT são utilizadas principalmente variáveis lineares - como medidas de distâncias - e, em alguns casos, informações de ângulos e proporções (Rohlf 1990; Adams et al. 2004; Galán 2015). Considerando que medições lineares de distância geralmente estão relacionadas ao tamanho do elemento em estudo (Bookstein et al. 1985; Adams et al. 2004), houve um esforço dos pesquisadores para desenvolver métodos capazes de extrair variáveis de forma sem a influência deste fator (Jolicoeur 1959, 1963; Jolicoeur & Mosimann 1960; Mosimann 1970; Oxnard 1978; Humphries et al. 1981; Rohlf & Bookstein 1987; Bookstein 1989; Sundberg 1989; Jungers et al. 1995). Muitos métodos foram propostos com este obje-

tivo, porém com pouca concordância sobre qual seria o mais adequado, fato este relevante porque métodos distintos geralmente produzem resultados ligeiramente diferentes (Sundberg 1989; Adams et al. 2004). Outra característica da morfometria tradicional é que o mesmo conjunto de medidas de distância pode ser obtido em objetos com formas diferentes, como por exemplo, as medidas do comprimento e largura máximos de uma forma oval e de uma lágrima, onde ambos os objetos podem ter os mesmos valores de altura e largura máxima, ainda que possuam formas visivelmente diferentes (Adams et al. 2004). Além disso, em alguns casos a medida pode não representar características comparáveis nos diferentes organismos (Fig. 1) (Zelditch et al. 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012).

Paralelamente ao incremento da escola biométrica houve o desenvolvimento de uma escola geométrica. De maneira contrária ao que ocorria na morfometria tradicional, na escola geométrica foram desenvolvidos métodos capazes de extrair informações relacionadas à geometria dos organismos, ainda que estes não permitissem o estudo estatístico da variação de forma (Monteiro & Reis 1999). Durante a década de 1980 essa limitação foi superada simultaneamente em diversos centros de pesquisa. Goodall (1983), Kendall (1984) e Bookstein (1984, 1989) propuseram um arcabouço estatístico para a análise de forma em um espaço multivariado e descreveram as propriedades de um espaço de forma que tornou possível combinar métodos estatísticos multivariados e métodos para visualização direta da forma biológica (Monteiro & Reis 1999; Adams et al. 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012). Bookstein (1984) propôs um método geométrico para estudar diferenças de forma através da descrição de um espaço multivariado para análises morfométricas com configurações de marcos anatômicos representadas por valores de coordenadas cartesianas (Marcus et al. 1996; Monteiro & Reis 1999; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012). Bookstein (1986) sintetizou as técnicas desenvolvidas por Goodall (1983) e Kendall (1984) junto a suas próprias contribuições mostrando a convergência das ideias sobre o espaço de forma (Monteiro & Reis 1999; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012). Bookstein (1989) propôs o método "*thin plate spline*" para análises de deformações por meio da criação de um espaço de transformações geométricas baseado nas diferenças nas posições dos marcos anatômicos em um organismo em relação a uma configuração de marcos anatômicos de referência, o que permitiu a construção de grades de transformações semelhantes àquelas de Dürer e Thompson. Todas essas contribuições geraram a chamada "revolução na morfometria", que corresponde ao surgimento da Morfometria Geométrica (MG), definida como "Fusão empírica da geometria com a biologia" e que

analisa a forma dos organismos ou de determinada estrutura considerando o espaço geométrico e usando métodos estatísticos multivariados (Bookstein 1982; Rohlf & Marcus 1993; Monteiro & Reis 1999; Adams et al. 2004; Mitteroecker & Gunz 2009; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012; Adams et al. 2013; Galán 2015).

Apesar da revolução que ocorreu no final da década de 1980, a MG ainda não era um método acessível para a maior parte dos pesquisadores (Monteiro & Reis 1999). No final da década de 1980 e início da década de 1990 houve a realização de *workshops* que resultaram na publicação dos volumes conhecidos como "livro azul" (*Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*), "livro preto" (*Contributions to Morphometrics*) e "livro branco" (*Advances in Morphometrics*) (Rohlf & Bookstein 1990; Marcus et al. 1993, 1996). A década de 1990 representou um grande avanço para o conhecimento e utilização prática das técnicas da MG (Marcus et al. 1996; Monteiro & Reis 1999; Adams et al. 2004; Galán 2015; Mcnulty & Vinyard 2015), sendo que atualmente existem programas gratuitos, como o TPSRelw (Rohlf 2003), MorphoJ (Klingemberg 2011), GeoMorph (pacote para o programa R desenvolvido por Adams et al. 2014), entre outros que auxiliam nas análises de MG.

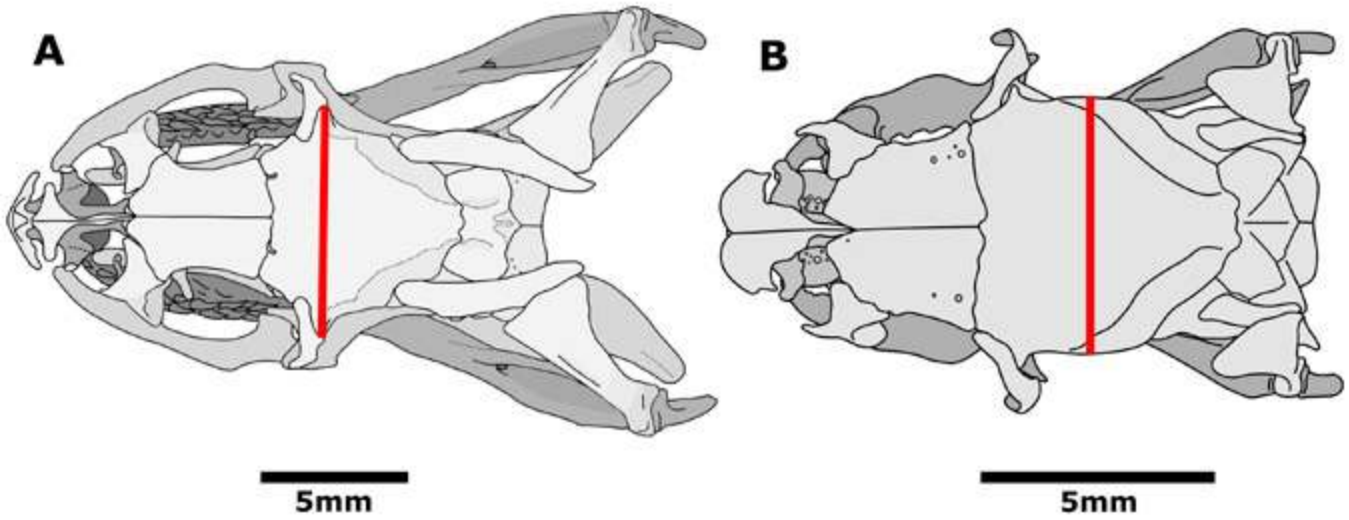

Figura 1. Exemplo de distintas medidas de largura da caixa craniana em Serpentes. A: Largura do crânio obtida através das extremidades do processo pós-orbital de *Thamnodynastes chaquensis* (MNRJ 21003). B: Largura do crânio tomada no local de maior largura de *Sibon nebulatus* (MNRJ 18031).

METODOLOGIA DA MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Marcos Anatômicos

Como discutido anteriormente, o conjunto de medidas lineares da morfometria tradicional pode não representar características comparáveis nos diferentes organismos (Fig. 1A, B) (Zelditch et al. 2004). Uma proposta de solução para essa questão foi a definição de pontos cuja localização anatômica fosse correspondente em todos os organismos da análise e, desta forma, as medidas lineares pudessem ser tomadas entre tais pontos, agora chamados de marcos anatômicos (*landmarks* em inglês) (Strauss & Bookstein 1982; Bookstein et al. 1985; Zelditch et al. 2004).

A MG incorporou este conceito de marcos anatômicos, que passaram a carregar informações de coordenadas cartesianas indicando seu posicionamento em determinada estrutura (Bookstein 1984). Os critérios para a escolha dos marcos anatômicos representam um passo delicado e muito importante nos estudos de MG, portanto essa etapa requer a experiência de um especialista na morfologia da estrutura e/ou dos táxons analisados (Bookstein 1991; Monteiro & Reis 1999). Os marcos anatômicos devem: (1) ser anatomicamente homólogos segundo um critério operacional, ou seja, devem apresentar correspondência biológica de suas posições entre os diferentes objetos; (2) ser precisamente localizados e fornecer informações comparáveis e replicáveis em todos os espécimes; (3) representar a forma da estrutura de maneira adequada; e (4) estar situados em um mesmo plano anatômico, quando se trata de análises em duas dimensões (2D) (Bookstein 1991; Monteiro & Reis 1999; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012).

Bookstein (1991) classificou os marcos anatômicos em três tipos (Fig. 2): Tipo I – justaposição de tecidos (e.g. pontos onde três estruturas se encontram); Tipo II – pontos de máxima curvatura ou outros processos morfogenéticos locais (e.g. extremidades de processos e vales de invaginações); Tipo III – pontos extremos (e.g. relacionados à maior distância que pode ser medida em uma estrutura). Em alguns casos as estruturas biológicas podem ser superfícies planas ou lisas, sendo difícil estabelecer marcos anatômicos dos tipos supracitados, ou esses marcos não são capazes de capturar a forma a ser analisada. Nesses casos, podem ser utilizados pontos cuja localização é escolhida baseada em outros critérios, como por exemplo distribuídos uniformemente ao longo do contorno e/ou superfície, que são conhecidos como pseudo-marcos anatômicos ou *semilandmarks* (Bookstein 1991; Galán 2015; Dryden & Mardia 2016) (Fig. 3). Estes pontos podem ser fixos ou móveis ao longo de linhas tangentes à curva de contorno da estrutura (Green 1996; Bookstein 1997).

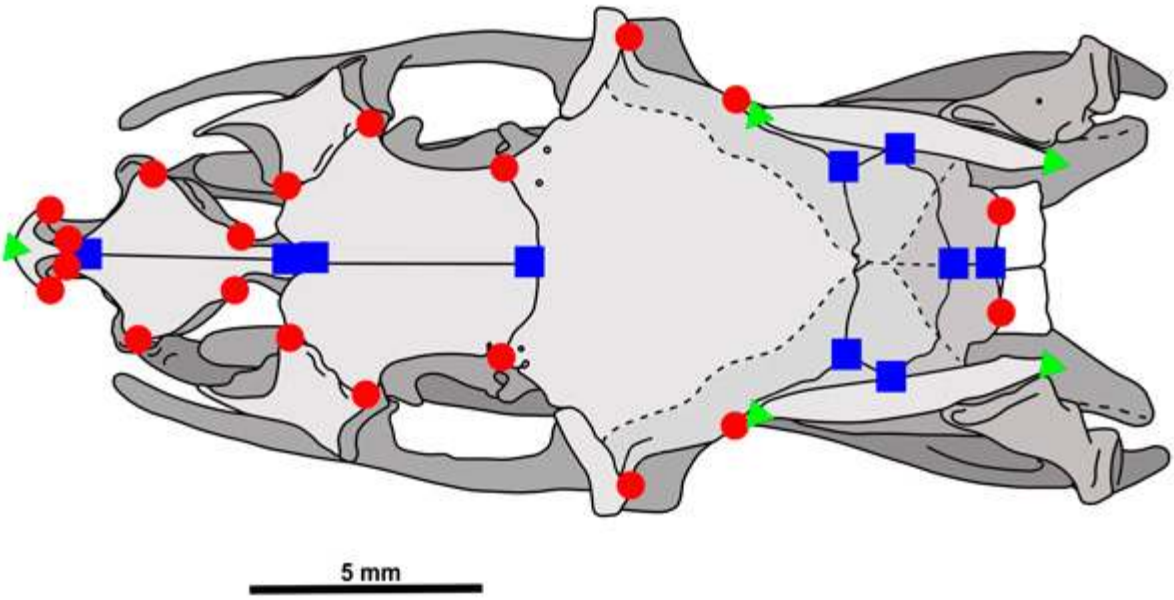

Figura 2. Classificação dos marcos anatômicos. Quadrados Azuis: Tipo I – Justaposição de tecidos; Círculos Vermelhos: Tipo II – pontos de máxima curvatura ou outros processos morfogenéticos locais; Triângulos Verdes: Tipo III – pontos extremos (sensu Bookstein, 1991).

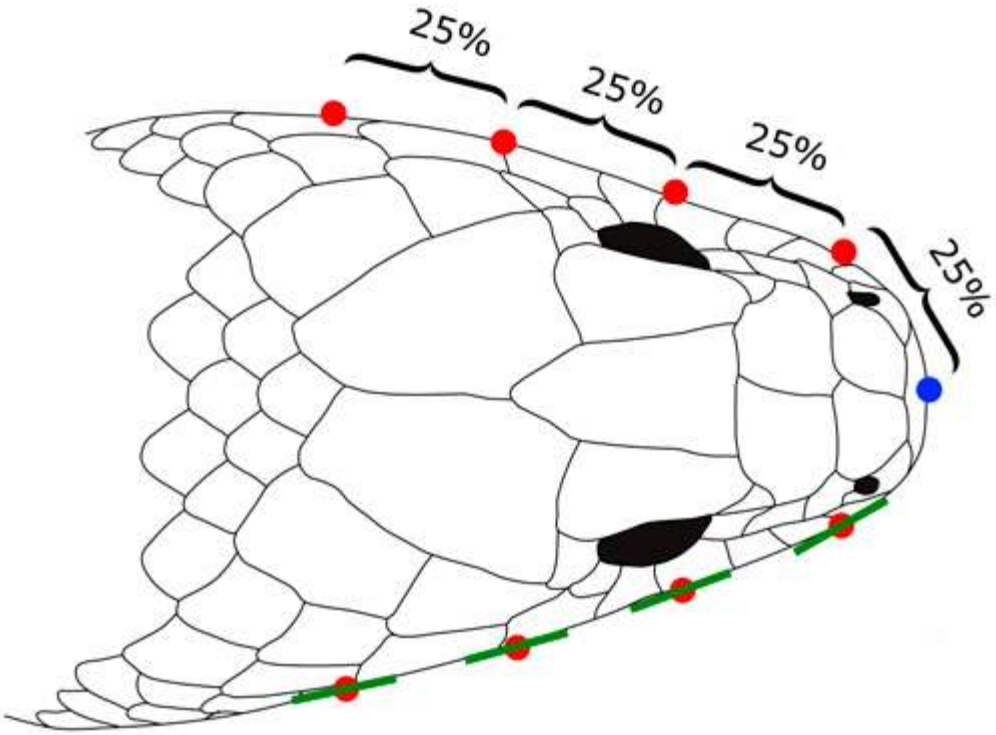

Figura 3. Exemplo de marcação de *semilandmarks* ou pseudo-marcos anatômicos. No caso de *semilandmarks* móveis, no processo de superposição estes pontos podem se mover ao longo de linhas tangentes à curva de contorno da estrutura (linhas verdes).

Forma e tamanho em MG

Não são apenas os métodos para separar variação de tamanho e de forma que apresentam limitações, mas o conceito de tamanho e forma tem sido um dos assuntos mais controversos da MT (Zelditch et al. 2004), até porque há uma variedade de definições de tamanho encontradas na literatura (Bookstein 1989). No entanto, para o desenvolvimento da MG é importante que se explore a relação entre forma e tamanho, pois não é possível haver uma abordagem matemática coerente oriunda de um conceito indefinido (Zelditch et al. 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012).

Cabe ressaltar que forma (*shape* em inglês) e formato (*form*) possuem significados diferentes no contexto da MG, sendo formato definido como a soma da forma e do tamanho (Monteiro & Reis 1999; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012; Galán 2015).

Tamanho em MG

Em MG o tamanho de um objeto é dado pelo tamanho do centroide. O centroide é definido como a coordenada do centro gravitacional da forma, que corresponde à média das coordenadas de todos os marcos anatômicos de um objeto (Klingenberg 2016). Seu valor é calculado a partir da distância entre cada marco anatômico e o centroide (Zelditch et al. 2004) e, em seguida, calcula-se a raiz quadrada da soma dos quadrados dessas distâncias (Bookstein 1991; Zelditch et al. 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012; Kingenberg 2016). O tamanho do centroide possui propriedades estatísticas desejáveis para a MG, como a independência conceitual ou teórica em relação às variáveis de forma (Zelditch et al. 2004). Empiricamente, entretanto, o tamanho do centroide pode estar correlacionado à forma porque os organismos maiores geralmente têm formas diferentes dos organismos menores, como quando há presença de alometria (Zelditch et al. 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012) – lembrando que correlação e dependência entre variáveis são conceitos distintos. O fato de existir a independência entre essas duas variáveis não significa a perda de informação sobre a relação entre elas, o que é facilmente avaliado através de análises de Regressões multivariadas que buscam verificar a existência de relação entre variáveis dependentes (e.g. coordenadas de Procrustes – veja abaixo) e uma ou mais variáveis independentes (e.g. tamanho do centroide) (Zelditch et al. 2004).

Forma em MG e Superposição de Procrustes

Em estudos de MG a forma pode ser definida como a propriedade geométrica de um objeto que permanece após a retirada dos efeitos de localização, escala e orientação (através dos proces-

sos de translação, escalonamento e rotação, respectivamente) (Kendall 1977; Bookstein 1996; Zelditch et al. 2004; Galán 2015). Isso significa que para que seja possível comparar as formas de organismos ou estruturas utilizando a MG, é necessário que estes efeitos sejam retirados dos objetos através de um processo chamado "superposição".

Existem vários métodos de superposição, sendo o mais difundido atualmente o método de superposição parcial de Procrustes (Rohlf & Slice 1990; Slice 2001). Para exemplificar uma análise comum deste método com duas configurações de marcos anatômicos usaremos o crânio da serpente *Liophis miliaris* (Linnaeus, 1758) (Fig. 4). Primeiro as duas configurações em estudo possuem localização, tamanho e orientação diferentes (Fig. 4A). A variação na localização é removida através da translação, ou seja, o deslocamento das configurações de marcos com a sobreposição dos seus centros de gravidade. Isso é obtido através da centralização das coordenadas cartesianas dos centroides das duas configurações na origem dos eixos de variação (0,0) (Fig. 4B). Entretanto, as configurações centralizadas ainda diferem em escala (diferenças de tamanho), sendo este efeito retirado através da divisão de cada coordenada das configurações pelo tamanho do respectivo centroide, o que leva à homogeneização do tamanho do centroide das configurações centralizadas para o valor igual a 1,0 (escalonamento) (Fig. 4C). Por fim, os objetos ainda diferem na orientação e são rotacionados (processo de rotação) através do método dos quadrados mínimos para se alinharem de maneira que a soma dos quadrados das distâncias entre os marcos correspondentes seja a menor possível (Fig. 4D). Após a execução destas três etapas, as diferenças restantes entre os marcos anatômicos das duas configurações correspondem a diferenças de forma. Ao final desse processo são obtidas as coordenadas dos marcos anatômicos (agora chamadas coordenadas de Procrustes), que serão utilizadas para o cálculo das distâncias de Procrustes. A distância de Procrustes é a principal medida de diferença de forma entre configurações de marcos anatômicos, correspondendo à raiz quadrada da soma dos quadrados das distâncias entre marcos correspondentes após a superposição de Procrustes (Klingenberg 2020).

Em estudos biológicos normalmente são utilizadas mais de duas configurações de marcos anatômicos, sendo necessário realizar o ajuste simultâneo de todas as configurações através da Análise Generalizada de Procrustes (Rohlf & Slice 1990). Assim como na análise comum de superposição, também é utilizado o ajuste por quadrados mínimos, porém de forma iterativa. Em um primeiro momento todas as configurações são ajustadas a uma configuração alvo escolhida aleatoriamente (normal-

mente a configuração do primeiro organismo da amostra). Posteriormente, é gerada uma configuração média e, na próxima iteração, todas as configurações serão ajustadas a essa configuração média. Em seguida, uma nova configuração média é calculada e o procedimento é repetido até que a configuração média gerada não mude mais (Rohlf & Slice 1990; Bookstein 1991; Rohlf 1990; Galán 2015; Klingenberg 2020).

Existem duas maneiras equivalentes de apresentar as informações de forma: as já citadas coordenadas de Procrustes e os resíduos de Procrustes, estes correspondendo aos desvios das coordenadas de Procrustes em relação às coordenadas dos marcos anatômicos correspondentes da configuração média (Klingenberg & McIntyre 1998; Zelditch et al. 2004). Algumas maneiras de facilitar a visualização das variações de forma entre configurações são através dos vetores de deslocamento relativo dos marcos anatômicos (Fig. 5C) (Fornel & Cordeiro-Estrela 2012); das grades de deformação (Zelditch et al. 2004) (Fig. 5D); das linhas de contorno (wireframes e outlines, Fig. 5E e F, respectivamente) (Klingenberg 2013); e, para superfícies em três dimensões, as próprias superfícies escaneadas de-

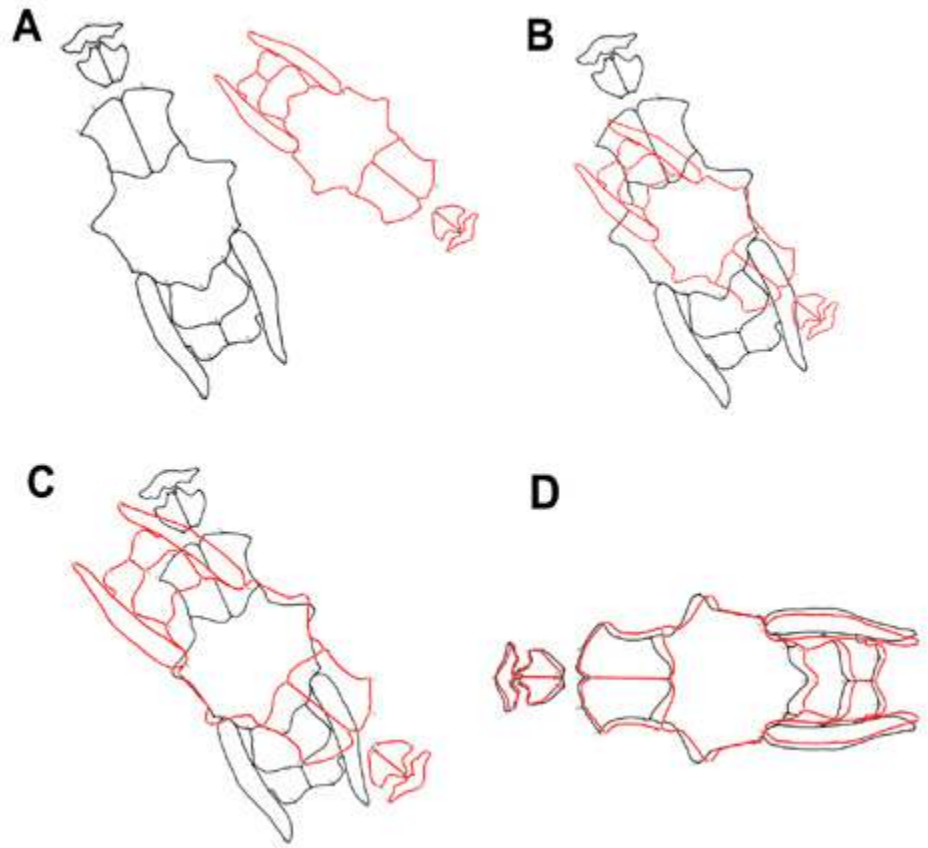

Figura 4. Removendo os efeitos de diferenças na localização, escala e orientação em análises de MG. A: Configurações originais. B: Após o processo de translação. C: Após o processo de escalonamento. D: Após o processo de rotação, permanecem apenas as diferenças de forma.

formadas (Drake & Klingenberg 2010). Linhas de contorno (*outlines*) e superfícies deformadas são criadas baseadas nas grades de deformação da estrutura (Klingenberg 2013). A partir da superposição de Procrustes uma série de análises estatísticas multivariadas podem ser empregadas dependendo da natureza do estudo.

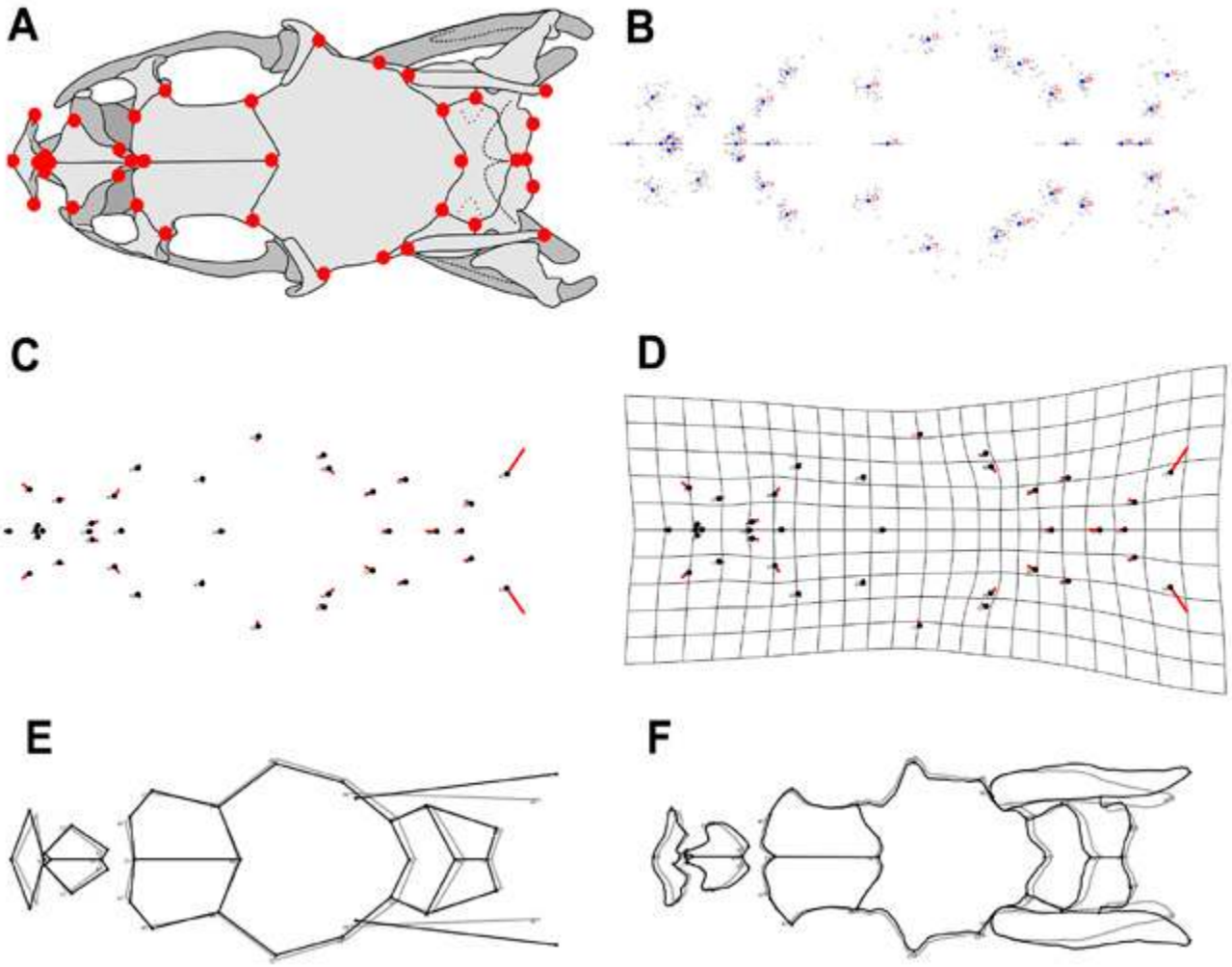

Figura 5. Diferentes formas de visualização da variação da forma em crânios de serpentes. A: Posição dos marcos anatômicos; B: Posição dos marcos anatômicos em todos os espécimes da análise após superposição de Procrustes – pontos azuis maiores representam localização média de cada marco anatômico e pontos pretos menores representam localização dos marcos anatômicos em cada espécime; C: Vetores de deslocamento relativo dos marcos anatômicos após a Análise de Componentes Principais (PCA) – pontos pretos representam a posição média de cada marco anatômico e vetores vermelhos representam o deslocamento daquele marco anatômico em relação à média em determinada escala do PC representado; D: Os mesmos vetores sobre grade de deformação; E: Linhas de contorno – *Wireframe* – Linhas cinzas representam a média de todos os indivíduos e linha preta a forma em determinada escala do PC representado; F: Linhas de contorno – *Outline* – Linhas cinzas representam média e pretas forma em determinada escala do PC.

MORFOMETRIA GEOMÉTRICA E SERPENTES

As serpentes atuais possuem um corpo peculiar, em forma de tubo com uma cabeça, cauda e ausência de membros locomotores (Lillywhite 2014). Os estudos envolvendo a morfologia desse grupo tradicionalmente são baseados em descrições de caracteres externos, como folidose (contagem e formato de escamas), caracteres morfométricos e de padrão de coloração, além de caracteres internos referentes à osteologia (crânio e vértebras), morfologia de hemipênis, musculatura e glândulas (Thorpe 1975; Zaher 1999; Passos & Fernandes 2008; Fernandes et al. 2010; Murta-Fonseca & Fernandes 2016; Souto et al. 2017). Nos últimos anos é possível observar um número crescente de estudos de serpentes utilizando MG como ferramenta. O método da MG vem sendo usado em diferentes abordagens: relacionando morfologia e hábitos (Fabre et al. 2016; Klaczko et al. 2016), dimorfismo sexual (Meik et al. 2012; Loebens et al. 2019; Murta-Fonseca et al. 2019), ontogenia (Murta-Fonseca & Fernandes 2016), delimitação de espécies (Andjelkovic et al. 2016), entre outros.

Através de pesquisa bibliográfica foram levantados 55 artigos na literatura que utilizam as técnicas da MG no estudo de Serpentes. O levantamento foi realizado utilizando palavras-chave (e.g. "*Geometric Morphometrics;*" "Snakes Geometric Morphometrics") pelo buscador *Google Scholar*, além das referências contidas nos próprios artigos levantados, e compreende o período entre a década de 1980 até o momento atual. Foi constatado que o início das publicações se deu nos primeiros anos de 2000, sendo que há um aumento no número de estudos na segunda década (Fig. 6).

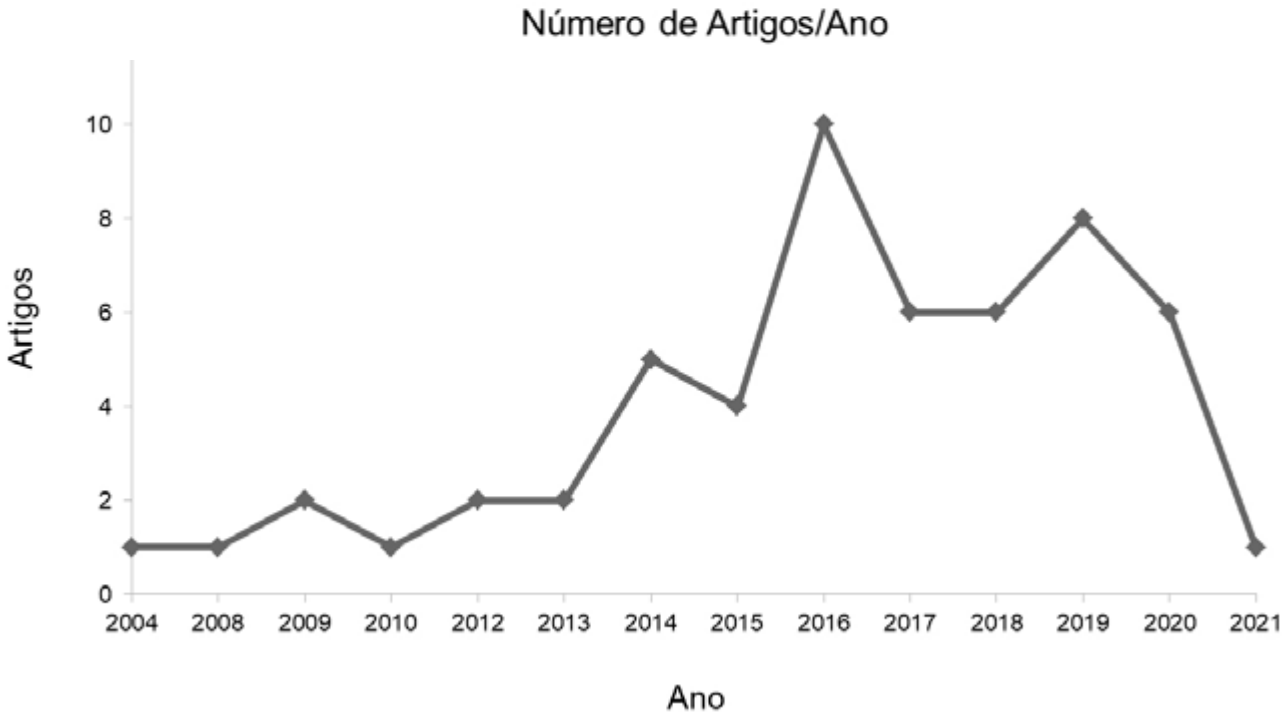

Figura 6. Número de artigos publicados utilizando MG em estudos de Serpentes por ano.

Existe uma diversidade de temas que podem ser abordados utilizando a MG como ferramenta de estudo (Fig. 7A). O Apêndice I contém uma tabela com os principais temas abordados por cada artigo. A área mais abordada usando a MG e serpentes é a variação morfológica associada ao habitat (presente em 20% dos artigos) (Manier 2004; Head et al. 2009; Yi & Norell 2015; Esquerré & Keogh 2016; Fabre et al. 2016; Segall et al. 2016; Allemand et al. 2017; Palci et al. 2017, 2018; Moshtaghie et al. 2018; Da Silva et al. 2018; Silva et al. 2017; Segall et al. 2019, Esquerré et al. 2020; Segall et al. 2020); seguida por delimitação de espécies e variação morfológica associada à dieta (17% cada) (*Delimitação de espécies* - Manier 2004; Gentilli et al. 2009; Moreno-Barajas et al. 2013; Magiacotti et al. 2014; Showalter et al. 2014; Mezzasalma et al. 2015; Ruane 2015; Barbo et al. 2016; Davis et al. 2016; Pokrant et al. 2016; Akman & Goçomem 2019; Belgheiszadeh et al. 2019; Keates et al. 2019. *Dieta* - Meik et al. 2012; Smith 2014; Andjelkovic et al. 2016, 2017; Fabre et al. 2016; Klaczko et al. 2016; Santos et al. 2017; Silva et al. 2018; Sherratt et al. 2019; Rajabizadeh et al. 2020; Rhoda et al. 2020; Segall et al. 2020; Cleuren et al. 2021); dimorfismo sexual (15%) (Manier 2004; Smith & Collyer 2008; Meik et al. 2012; Henao-Duque & Ceballos 2013; Andjelkovic et al. 2016; Silva et al. 2017; Tamaginini et al. 2018; Loebens et al. 2019; Murta-Fonseca et al. 2019; Abegg et al. 2020; Lucchini et al. 2020); ontogenia (8%) (Murta-Fonseca & Fernandes 2016; Palci et al. 2016; Silva et al. 2017; Esquerré et al. 2017; Abegg et al. 2020; Lucchini et al. 2020); variação morfológica intraespecífica, estudos metodológicos com Serpentes como modelo e alometria estática (5% cada) (*Variação Intraespecífica* - Smith & Collyer 2008; Sarris et al. 2012; Showalter et al. 2014; Lucchini et al. 2020. *Metodologia* – Lawing & Polly 2010; Baum et al. 2014; Palci & Lee 2018; Souto et al. 2019. *Alometria estática* - Sarris et al. 2012; Andjelkovic et al. 2016; Tamagnini et al. 2018; Abegg et al. 2020); estudos sobre a origem ecológica (4%) (Yi & Norell 2015; Palci et al. 2017; Da Silva et al. 2018); evolução da forma do corpo (3%) (Head et al. 2009; Head & Polly 2015); e estudo com espécies que mimetizam serpentes (1%) (Hossie & Sherratt 2014).

A maior parte desses estudos utiliza a morfologia externa da cabeça como fonte de informação (51%), seguida pela osteologia craniana (30%); vértebras (9%); orelha interna (5%); forma do dente (3%) e um dos estudos utilizou a forma da genitália feminina (2%) (Fig. 7B e Apêndice I). O grande número de estudos utilizando a morfologia externa da cabeça pode estar associado a uma maior facilidade de obtenção de material nas coleções, visto que as técnicas mais utilizadas para acessar a morfologia interna realizam procedimentos mais destrutivos. Por esses motivos, os curadores de coleções zoológicas podem ser restritivos quanto ao uso de tais técnicas, especialmente no caso de material-tipo ou táxons raros (Bell & Mead 2014; Souto et al. 2019). Nesses casos, o uso do micro-CT scan pode

ser a melhor alternativa, pois é uma técnica não destrutiva e relativamente rápida (Machado et al. 2015), além de permitir a visualização de estruturas internas. No entanto, o micro-CT ainda é caro na maioria dos países e, ocasionalmente, a visualização de suturas e a delimitação dos ossos podem ser afetadas devido à resolução inadequada do scanner ou ao tamanho da estrutura (Souto et al. 2019).

Muitos dos estudos que utilizaram a morfologia externa da cabeça como fonte de informação consideraram, além do contorno, as regiões entre as escamas como referência para a digitalização dos marcos anatômicos (Manier 2004; Smith & Collyer 2008; Henao-Duque & Ceballos 2012; Meik et al. 2012; Moreno-Barajas 2013; Magiacotti et al. 2014; Mezzasalma et al. 2015; Ruane 2015; Barbo et al. 2016; Davis et al. 2016; Silva et al. 2017; Moshtaghie et al. 2018; Tamagnini et al. 2018; Akman & Göçmen 2019; Keates et al. 2019; Loebens et al. 2019; Abegg et al. 2020). Isso pode estar associado a uma maior facilidade para a identificação de pontos correspondentes, principalmente dos tipos I e II (Bookstein 1991). A osteologia do crânio aparece em segundo lugar nas estruturas mais estudadas, provavelmente devido à menor disponibilidade de material discutida anteriormente. Entretanto, essa é uma rica fonte de caracteres para estudos de MG, permitindo a digitalização de marcos anatômicos dos tipos I, II e III (Fig. 2) e consequentemente aumentando o grau de precisão das análises, já que esses tipos de pontos são capazes de capturar uma maior quantidade de informação de forma da estrutura de estudo (Bookstein 1991; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012).

Dentre as análises exploratórias mais utilizadas nestes estudos estão a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Variáveis Canônicas (CVA) (e.g. Manier 2004; Gentilli et al. 2009; Lawing & Polly 2009; Sarris et al. 2012; Moreno-Barajas et al. 2013; Hossie & Sherratt 2014; Mezzasalma et al. 2015; Ruane 2015; Yi & Norell 2015; Andjelkovic et al. 2016; Barbo et al. 2016; Fabre et al. 2016; Klaczko et al. 2016; Silva et al. 2017; Esquerré et al. 2017; Palci et al. 2017; Da Silva et al. 2018; Silva et al. 2018; Tamagnini et al. 2018; Akman & Göçmen 2019; Belgheiszadeh et al. 2019; Keates et al. 2019; Murta-Fonseca et al. 2019; Abegg et al. 2020; Lucchini et al. 2020; Rajabizadeh et al. 2020; Cleuren et al. 2021). A PCA na MG é utilizada para sumarizar as descrições de variação entre indivíduos a partir de uma série de variáveis representadas pelas coordenadas ou resíduos de Procrustes, enquanto a CVA é usada para sumarizar descrições de diferenças entre grupos pré-estabelecidos. Além disso, a PCA e a CVA geram gráficos onde cada configuração de marcos anatômicos da amostra será representada por um ponto, o que facilita a determinação de possíveis padrões de ordenação nos dados (Montei-

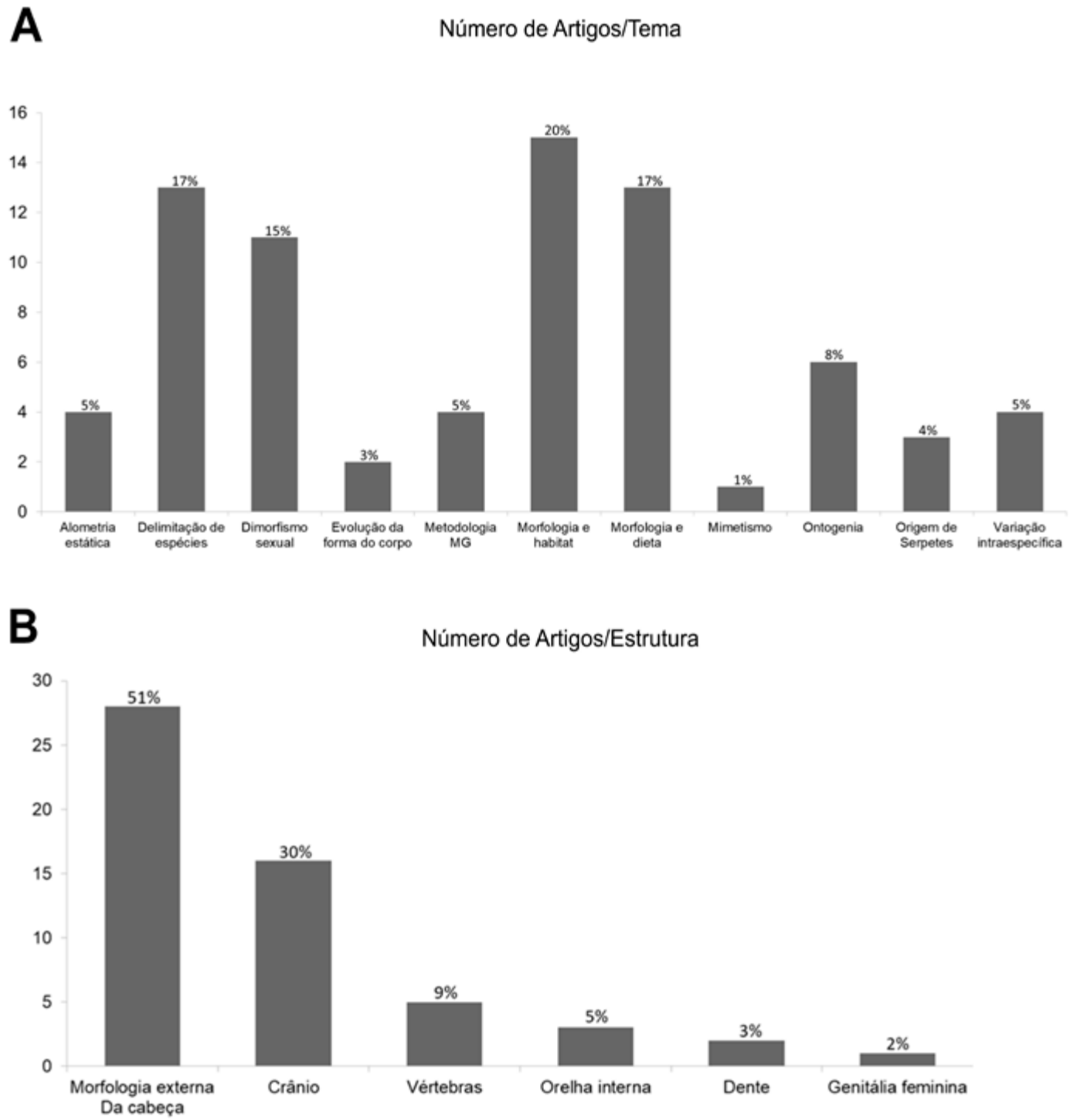

Figura 7. Temas e estruturas abordados em estudos de Serpentes utilizando MG. A: Temas abordados. B: Estruturas utilizadas.

ro & Reis 1999; Zelditch et al. 2004; Fornel & Cordeiro-Estrela 2012). A robustez da CVA, assim como das análises discriminantes, pode ser verificada através de testes de permutação e validação cruzada, respectivamente (Monteiro & Reis, 1999; Zelditch et al. 2004). Muitos trabalhos testaram as diferenças entre grupos através de Análises de Variância de Procrustes (ANOVA de Procrustes) ou Análise de Variância Multivariada (MANOVA) (e.g. Mangiacotti et al. 2014; Showalter et al. 2014; Yi & Norell 2015; Andjelkovic et al. 2016; Davis et al. 2016; Segall et al. 2016; Tamagnini et al. 2018, Cleuren et al. 2021). Outra possível abordagem utilizando análises de variância hierárquica nos trabalhos de MG é a avaliação de erros na tomada de fotografias e na digitalização dos marcos anatômicos (Klingenberg & McIntyre 1998; Klingenberg et al. 2002; Klingenberg 2015; Murta-Fonseca & Fernandes 2016; Andjelkovic et al. 2017; Moshtaghie et al. 2018; Murta-Fonseca et al. 2019; Souto et al. 2019). Para isso podem ser comparadas duas fotografias diferentes do mesmo indivíduo e duas digitalizações distintas de marcos anatômicos da mesma fotografia. Para que os resultados obtidos em análises posteriores não sejam enviesados, as diferenças entre as fotografias do mesmo indivíduo e os marcos anatômicos da mesma fotografia devem ser menores do que as diferenças entre os indivíduos (Souto et al. 2019).

Outro tipo de análise muito utilizada, principalmente em trabalhos de ontogenia e alometria, são as análises de Regressão multivariada (Sarris et al. 2012; Andjelkovic et al. 2016; Murta-Fonseca & Fernandes 2016; Silva et al. 2017; Esquerré et al. 2017; Abegg et al. 2020; Lucchini et al. 2020; Cleuren et al. 2021). Essas análises buscam verificar se existe relação entre variáveis dependentes e uma variável independente. Neste caso as variáveis dependentes representam a forma e são relativas aos escores da regressão, refletindo uma direção ou vetor das coordenadas de Procrustes que está relacionado ao tamanho do centróide (ou log do tamanho do centróide). A variável independente é o tamanho, representado justamente pelo tamanho do centróide ou log do tamanho do centróide (Klingenberg 2016; Murta-Fonseca & Fernandes 2016).

Finalmente, os resultados de estudos de MG também servem para avaliar a correlação de caracteres em um contexto evolutivo. Esse tipo de abordagem pode ser usado, por exemplo, em estudos que relacionam a morfologia a hábitos (e.g. uso do habitat) e/ou dieta (Klaczko et al. 2016; Esquerré et al. 2017; Da Silva et al. 2018; Sherrat et al. 2019; Segall et al. 2020; Cleuren et al. 2021). Em biologia, estudos que comparam características morfológicas e ambientais, aliados a hipóteses de relacionamento filogenético avaliados através de métodos filogenéticos comparativos, configuram uma técnica poderosa para identificar associações e inferir pressões seletivas que geraram a diversidade biológica (Pizzato et al. 2007). Desta forma, estudar complexos morfológicos em grupos monofiléticos de serpentes permite que as relações entre

morfologia e hábitos sejam avaliadas sob um contexto evolutivo (Martins et al. 2001; Pizzatto et al. 2007).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como pode ser notado, o número de estudos de serpentes utilizando MG vem aumentando ao longo dos últimos anos e a partir dos resultados oferecidos pelos mesmos é possível observar uma amplificação das possibilidades de novas abordagens. Os avanços tecnológicos e de conhecimento estão viabilizando o desenvolvimento de novos programas computacionais e a elaboração de análises que nos permitem fazer perguntas cada vez mais complexas e levar em conta um número cada vez maior de variáveis. Com tantas perspectivas, podemos dizer que há espaço para diversos pesquisadores explorarem as diferentes vertentes proporcionadas pela MG de maneira colaborativa e a soma de todos esses estudos permitirá uma melhor compreensão da evolução, ecologia e morfologia das serpentes. Como primeiro passo para delimitação de um estudo de MG com serpentes, pode-se considerar grupos e complexos morfológicos ainda pouco explorados. Em relação aos grupos, algumas famílias de serpentes foram muito mais estudadas que outras e quando pensamos em táxons menos inclusivos - como tribos, gêneros e espécies – a carência de estudos e as possibilidades de abordagens utilizando MG aumentam consideravelmente. Em relação aos complexos morfológicos, podemos observar que ainda há uma grande carência de estudos que abordem a morfologia pós-craniana e a morfologia interna de maneira geral. Em suma, cada estudo nos traz uma peça de um quebra-cabeça que ainda está longe de ser totalmente montado e, mesmo que um trabalho tenha um escopo bastante específico, na visão geral ele pode trazer justamente a peça que faltava para nos permitir avançar cada vez mais na compreensão deste grande e complexo grupo de animais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a P. Passos e P. C. Paiva pelo apoio nas primeiras revisões. Ao Fábio A. Machado e mais um revisor anônimo pelos valiosos comentários sobre o artigo. NMS recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. RAMF foi apoiada pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001. DSF agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo 308567/2019-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (processo 88887.159161/2017-00); e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (processo E-26/211.154/2019).

REFERÊNCIAS

Abegg A.D., Passos P., Mario-da-Rosa C., Azevedo W.S., Malta-Borges L., Bubadué J.M. 2020. Sexual dimorphism, ontogeny and static allometry of a semi-fossorial snake (genus *Atractus*). *Zoologischer Anzeiger* 287:95–104.

Adams D.C., Rohlf F.J., Slice D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71:5–16.

Adams D.C., Rohlf J.F., Slice D.E. 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 24:7–14.

Adams D.C., Otárola-Castillo E., Sherratt E. 2014. Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 2.0. Disponível em: URL http://CRAN.Rproject.org/package=geomorph.

Akman G. 2019. Comparison of the Blind Snake Populations, *Xerotyphlops vermicularis* (Merrem, 1820) (Squamata: Typhlopidae) in Turkey and Cyprus: Morphology, Serology, Ecology, and Geometric Morphometrics *Commagene Journal of Biology* 3:6–18. doi: 10.31594/commagene.522170

Allemand R., Boistel R., Daghfous G., Blanchet Z., Cornette R., Bardet N., Houssaye A. 2017. Comparative morphology of snake (Squamata) endocasts: Evidence of phylogenetic and ecological signals. *Journal of Anatomy* 231:849–868. doi:10.1111/joa.12692

Andjelkovic M., Tomovic L., Ivanovic A. 2016. Variation in skull size and shape of two snake species (*Natrix natrix* and *Natrix tessellata*). *Zoomorphology* 135:243–253

Andjelkovic M., Tomovic L., Ivanovic A. 2017. Morphological integration of the kinetic skull in *Natrix* snakes. *Journal of Zoology* 303:188–198.

Barbo F.E., Gasparini J.L., Almeida A.P., Zaher H., Grazziotin F., Gusmão R.B., ... Sawaya R.J. 2016. Another new and threatened species of lancehead genus *Bothrops* (Serpentes, Viperidae) from Ilha dos Franceses, Southeastern Brazil. *Zootaxa* 4097:511–529.

Baum D., Mahlow K., Lamecker H., Zachow S., Müller J., Hege H-C. 2014. The Potential of Surface-based Geometric Morphometrics for Evolutionary Studies: An Example using Dwarf Snakes (*Eirenis*). Pp. 1–2 in Mallison H., Vogel J., Belvedere M. (Eds.) Digital Specimen Abstracts of Presentations. Museum für Naturkunde Berlin.

Belgheiszadeh H., Salemi A., Heydari N., Tahouri A., Tafreshi S. 2019. Geometric morphometrics of the head shape of *Pseudocerastes persicus* (Duméril, Bibrón & Duméril, 1854) (Ophidia: Viperidae) from central Iran. *Journal of Biological Studies* 2:56–63.

Bell C.J., Mead J.I. 2014. Not Enough Skeletons in the Closet: Collections-Based Anatomical Research in an Age of Conservation Conscience. *The Anatomical Record* 297:344–348.

Blackith R., Reyment R.A. 1971. Multivariate morphometrics. Academic Press, New York.

Bookstein F.L. 1982. Foundations of Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:451–470.

Bookstein F.L. 1984. A Statistical Method for Biological Shape Comparisons. *Journal of Theoretical Biology* 107:475–520.

Bookstein F.L. 1986. Size and Shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science* 1:181–242.

Bookstein, F.L. 1989. "Size and shape". A comment on semantics. *Systematic Zoology* 38:173–190.

Bookstein F.L. 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press. Cambridge.

Bookstein F.L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology* 58:313–365.

Bookstein F.L. 1997. Landmark methods for forms without landmarks: Morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis* 1:225–243.

Bookstein F.L., Chernoff B., Elder R.L., Humphries J. M., Smith G.R., Strauss R.E. 1985. Morphometrics in evolutionary biology. Special publication. *Academy of Natural Sciences Press*, Philadelphia.

Cleuren S.G.C., Hocking D., Evans A.R. 2021. Fang evolution in venomous snakes: Adaptation of 3D tooth shape to the biomechanical properties of their prey. *Evolution* 75: 1377–1394. doi: doi.org/10.1111/evo.14239

Cohen C. 2004. Gould at D'arcy Thompson. *Comptes Rendus Palevol* 3:421–431.

Da Silva F.O., Fabre A.-C., Savriama Y., Ollonen J., Mahlow K., Herrel A., ... Di-Poi N. 2018. The ecological origins of snakes as revealed by skull evolution. *Nature Communications* 9:376.

Davis M.A., Douglas M.R., Collyer M.L., Douglas M.E. 2016. Deconstructing a Species- Complex: Geometric Morphometric and Molecular Analyses Define Species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLoS ONE* 11:e0146166. doi:10.1371/journal.pone.0146166.

Drake A.G., Klingenberg C.P. 2010. Large-scale diversification of skull shape in domestic dogs: disparity and modularity. *American Naturalist* 175:289–301.

Dryden I.L., Mardia K.V. 2016. Statistical Shape Analysis with Application in R. Wiley, New York.

Esquerré D., Keogh J.S. 2016. Parallel selective pressures drive convergent diversification of phenotypes in pythons and boas. *Ecology Letters* 19:800–809.

Esquerré D., Sherratt E., Keogh J.S. 2017. Evolution of extreme ontogenetic allometric diversity and heterochrony in pythons, a clade of giant and dwarf snakes. *Evolution* 71:2829–2844.

Esquerré D., Donnellan S., Brennan I.G., Lemmon A.R., Lemmon E.M., Zaher H., Grazziotin F., Keogh J.S. 2020. Phylogenomics, biogeography, and morphometrics reveal rapid phenotypic evolution in pythons after crossing Wallace's line. *Systematic Biology* 69:1039–1051.

Fabre A-C, Bickford D., Segall M., Herrel A. 2016. The impact of diet, habitat use, and behaviour on head shape evolution in homalopsid snakes. *Biological Journal of the Linnean Society* 118:634–647.

Fernandes D.S., Marques O.A.V., Argôlo A.J.S. 2010. A new species of *Dipsas Laurenti* from the Atlantic Forest of Brazil (Serpentes: Dipsadidae). *Zootaxa* 2691:57–66.

Fisher R.A. 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of Eugenics* 7:179–184.

Fornel R., Cordeiro-Estrela P. 2012. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. Pp 101–120 in Marinho J.R., Hepp L.U., Fornel R. (Orgs.). Temas Em Biologia: Edição Comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos Do PPG-Ecologia a URI Campus de Erechim. EDIFAPES, Erechim.

Galán A.L. 2015. Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biologia. *Temas de Ciencia y Tecnología* 19:53–59

Galton F. 1888. Co-relations and their measurement, chiefly from anthropometric data. *Proceeding of the Royal Society of London* 45:219–247

Gentilli A., Cardini A., Fontaneto D., Zuffi M.A.L. 2009. The phylogenetic signal in cranial morphology of *Vipera aspis*: a contribution from geometric morphometrics. *Herpetological Journal* 19:69–77

Goodall C.R. 1983. The statistical analysis of growth in two dimensions. PhD dissertation, Department of Statistics, Harvard University, USA.

Green W.D.K. 1996. The thin-plate spline and images with curving features. Pp. 79–87 in Mardia K.V., Gill C.A., Dryden I.L. (Eds), Proceedings in Image Fusion and Shape Variability Techniques. Leeds University Press, Leeds.

Head J.J., Bloch J.I., Hastings A.K., Bourque J.R., Cadena E.A., Herrera F.A., ... Jaramillo C.A. 2009. Giant boid snake from the Palaeocene neotropics reveals hotter past equatorial temperatures. *Nature* 457:715–717. doi:10.1038/nature07671

Head J.J., Polly P.D. 2015. Evolution of the snake body form reveals homoplasy in amniote Hox gene function. *Nature* 520:86–89. doi:*10.1038/ nature14042*

Henao-Duque A.M., Ceballos C.P. 2013. Sex-related head size and shape dimorphism in Mapaná snakes (*Bothrops asper*) kept in captivity. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 26:201–210.

Hossie T.J., Sherratt T.N. 2014. Does defensive posture increase mimetic fidelity of caterpillars with eyespots to their putative snake models? *Current Zoology* 60:76–89.

Humphries J.M., Bookstein F.L., Chernoff B., Smith G.R., Elder R.L., Poss S.G. 1981. Multivariate discrimination by shape in relation to size. *Systematic Zoology* 30:291–308.

Jolicoeur P. 1959. Multivariate Geographical Variation in the Wolf *Canis lupus* L. *Evolution* 13:283–299.

Jolicoeur P. 1963. The Multivariate Generalization of the Allometry Equation. *Biometrics* 19:497–499.

Jolicoeur P., Mosimann J. 1960. Size and shape variation in the painted turtle. A principal component analysis. *Growth* 24:339–354.

Jungers W.L., Falsetti A.B., Wall C.E. 1995. Shape, relative size, and size-adjustments in morphometrics. *The Yearbook of Physical Anthropology* 38:137–161.

Kendall D.G. 1977. The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability* 9:428–430.

Kendall D.G. 1984. Shape manifolds, procrustean metrics, and complex pro-

jective spaces. *Bulletin of the London Mathematical Society* 16: 81–121

Keates C., Conradie W., Greenbaum E., Edwards S. 2019. A snake in the grass: Genetic structuring of the widespread African grass snake (*Psammophylax* Fitzinger 1843), with the description of a new genus and a new species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary* Research 57:1039–1066

Klaczko J., Sherratt E., Setz E.Z.F. 2016. Are Diet Preferences Associated to Skulls Shape Diversification in Xenodontine Snakes? *PLoS ONE* 11: e0148375. doi:*10.1371/journal.pone.0148375*

Klingenberg C.P. 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews* 73:79–123.

Klingenberg C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11:353–357.

Klingenberg C.P. 2013. Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix* 24:15–24.

Klingenberg C.P. 2015. Analyzing fluctuate asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications. *Symmetry* 2015:847-934.

Klingenberg C.P. 2016. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution* 226:113–137.

Klingenberg C.P. 2020. Walking on Kendall's shape space: Understanding shape spaces and their coordinate systems. *Evolutionary Biology* 47:334–352. doi:*10.1007/s11692-11020-09513-x*

Klingenberg C.P., Mcintyre, G.S. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52:1363–1375.

Klingenberg C.P., Barluenga M., Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56:1909–1920.

Klingenberg C.P., Marugán-Lobón J. 2013. Evolutionary covaration in geometric morphometric data: analyzing integration, modularity, and allometry in phylogenetic context. *Systematic Biology* 62:591–610.

Lawing A.M., Polly P.D. 2010. Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology* 280:1–7.

Lillywhite H.B. 2014. How snakes work: structure, function, and behavior: of world's snakes. *Oxford University Press*, New York.

Linnaeus C. 1758. Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. Laurentii Salvii, Holmiæ, Stockholm.

Loebens L., Hendges C.D., Almeida-Santos S.M., Cechin S.Z. 2019. Morphological variation and sexual dimorphism in two sympatric dipsadine snakes from Southern Brazil. *Zoologischer Anzeiger* 280:42–51. doi:*10.1016/j.jcz.2019.03.004*.

Lucchini N., Kaliontzopoulou A., Val G.A., Martínez-Freiría F. 2020. Sources of intraspecific morphological variation in *Vipera seoanei*: allometry, sex, and colour phenotype. *Amphibia-Reptilia* 2020:1–16

Machado A.C., Silva M.A., Filho R.D.T., Pfeil M.S., Lima I., Lopes R.T. 2015. 3D investigation of steel fiber distribution in reinforced concrete by X-ray microtomography. *Revista IBRACON de Estruturas Materiais* 8:707–720.

Mangiacotti M., Limongi L., Sannolo M., Sacchi R., Zuffi M.A.L., Scali S. 2014. Head shape variation in eastern and western Montpellier snakes. *Acta Herpetologica* 9: 167–177

Manier M.K. 2004. Geographic variation in the long-nosed snake *Rhinocheilus lecontei* (Colubridae): Beyond the subspecies debate. *Biological Journal of the Linnean Society* 83:65–85.

Marcus L.F. 1990. Traditional morphometrics. Pp 77–122 in Rohlf F.J., Bookstein F.L. (Eds), Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. University of Michigan Museum of Zoology. Ann Arbor, Michigan.

Marcus L.F., Bello E., Garcia-Valdecasas A. 1993. Contributions to Morphometrics. Monografias, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Madrid.

Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G. J.P., Slice D.E. 1996. Advances in Morphometrics. *NATO ASI series A: Life Sciences*, Plenum Press, New York.

Martins M., Araújo M.S., Sawaya R.J., Nunes R. 2001. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group on Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *Journal of Zoology* 254:529–538.

Mcnulty K.P., Vinyard C.J. 2015. Morphometry, Geometry, Function, and the Future. *The Anatomical Record* 298:328–333.

Meik J.M., Setser K., Mociño-Deloya E., Lawing A.M. 2012. Sexual differences in head form and diet in a population of Mexican lance-headed rattlesnakes *Crotalus polystictus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 106:633–640.

Mezzasalma M., Dallasta A., Loy A., Cheylan M., Lymberakis P., Zuffi M.A., ... Guarino F.M. 2015. A sisters' story: comparative phylogeography and taxonomy of *Hierophis viridiflavus* and *H. gemonensis* (Serpentes, Colubridae). *Zoologica Scripta* 44:495–508.

Mitteroecker P., Gunz P. 2009. Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary Biology* 36:235–247.

Monteiro L.R., Reis S.F. 1999. Princípios de morfometria geométrica. Holos Editora, Ribeirão Preto, São Paulo.

Moreno-Barajas R., Rodríguez-Romero F., Valázquez-Rodríguez A., Aragón-Martínez A. 2013. Variación geográfica en *Phrynosoma orbiculare* (Sauria: Phrynosomatidae): análisis de las subespecies. *Acta Zoológica Mexicana* 29:129–143.

Moshtaghie M., Kaboli M., Salehi M. 2018. Geometric morphometric analysis of head shape in a spotted whip snake (*Hemorrhois ravergieri*) in different habitats of iran. *Acta Medica Mediterranea* 34:583–589.

Mosimann J.E. 1970. Size allometry: size and shape variables with characterizations of the lognormal and generalized gamma distributions. *Journal of the American Statistical Association* 65:930–945.

Murta-Fonseca R.A., Fernandes D.S. 2016. The skull of *Hydrodynastes gigas* (Duméril, Bibron & Duméril, 1854) (Serpentes: Dipsadidae) as a model of snake ontogenetic allometry inferred by geometric morphometrics. *Zoomorphology* 132:33–241. doi: 10.1002/ar.22852.

Murta-Fonseca R.A., Machado A, Lopes R.T., Fernandes D.S. 2019. Sexual dimorphism in *Xenodon neuwiedii* skull revealed by geometric morphometrics (Serpentes, Dipsadidae). *Amphibia-Reptilia* 40: 461-474. doi:10.1163/15685381-20191147.

Oxnard, C.E. 1978. One biologist's view of morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 9:219–241.

Palci A., Lee, M.S., Hutchinson M.N. 2016. Patterns of postnatal ontogeny of the skull and lower jaw of snakes as revealed by micro-CT scan data and three-dimensional geometric morphometrics. *Journal of Anatomy* 229:723–754.

Palci A., Hutchinson M.N., Caldwell M.W., Lee M.S.Y. 2017. The morpholo-

gy of the inner ear of squamate reptiles and its bearing on the origin of snakes. *Royal Society Open Science* 4:170685.

Palci A., Hutchinson M.N., Caldwell M.W., Scanlon J.D., Lee M.S.Y. 2018. Palaeoecological inferences for the fossil Australian snakes. *Yurlunggur* and *Wonambi* (Serpentes, Madtsoiidae). *Royal Society Open Science* 5:172012.

Palci A., Lee M.S.Y. 2018. Geometric morphometrics, homology and cladistics: Review and recommendations. *Cladistics* 35:230–242. doi: *10.1111/cla.12340*.

Passos P., Fernandes R. 2008. Revision of the *Epicrates cenchria* complex (Serpentes: Boidae). *Herpetological Monographs* 22:1–30.

Pearson K. 1901. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* 2:559-572.

Pizzatto L., Almeida-Santos S.M., Shine R. 2007. Life history adaptations to arboreality in snakes. *Ecology* 88:359–366.

Pokrant F., Kindler C., Ivanov M., Cheylan M., Geniez P., Böme W., Fritz U. 2016. Integrative taxonomy provides evidence for the species status of the Ibero-Maghrebian grass snake *Natrix astreptophora*. *Biological Journal of the Linnean Society* 118:873–888.

Rajabizadeh M., Wassenbergh S., Mallet C., Rücklin M., Herrel A. 2020. Tooth Shape Adaptations in *Aglyphous* Colubrid Snakes Inferred from 3D Geometric Morphometrics and Finite Element Analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* 191:454–467.

Reyment R.A. 1991. Multidimensional paleobiology. Pergamon Press, New York.

Reyment R.A. 1996. An idiosyncratic history of early morphometrics. Pp 15–22 in Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. Advances in Morphometrics. *NATO ASI series A: Life Sciences*. 284. Plenum Press, New York.

Reyment R.A. 2010. Morphometrics: an historical essay. Pp 9–24 in Elewa A.M.T. (Ed.). Morphometrics for non-morphometricians. Springer-Verlag, New York.

Rhoda R., Polly D., Raxworthy C., Segall M. 2020. Morphological Integration and Modularity in the Hyperkinetic Feeding System of Aquatic-foraging Snakes. *Evolution* 75: 56–72.

Rohlf F.J. 1990. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:299–316.

Rohlf F.J. 2003. tpsRelw, Versão 1.37. Disponível em: http://life.bio.sunysb.edu/morph

Rohlf F. J., Bookstein F. L. 1987. A comment on shearing as a method for "size correction." *Systematic Zoology* 36:356–367.

Rohlf F.J., Bookstein F.L. 1990. Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. *Ann Arbor: The University of Michigan Museum of Zoology Special Publication* 2:147–166.

Rohlf F.J., Slice D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39:40–59.

Rohlf F.J., Marcus L.F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8:129–132.

Ruane S. 2015. Using geometric morphometrics for integrative taxonomy: an examination of head shapes of milksnakes (genus *Lampropeltis*). *Zoological Journal of the Linnean Society* 174:394–413.

Santos M.M., Da Silva F.M., Hingst-Zaher E., Machado F.A., Zaher H.E.D., Prudente A.L.D.C. 2017. Cranial adaptations for feeding on snails in species of *Sibynomorphus* (Dipsadidae: dipsadinae). *Zoology* 120:24–30. doi: 10.1016/j.zool.2016.09.003.

Sarris I., Marugán-Lobón J., Chamero B., Buscalioni A.D. 2012. Shape variation and allometry in the precloacal vertebral series of the snake *Daboia russelli* (Viperidae). *International Journal of Morphology* 30:1363–1368.

Segall M., Cornette R., Fabre A-C., Godoy-Diana R., Herrel A. 2016. Does aquatic foraging impact head shape evolution in snakes? *Proceedings of the Royal Society* 283:20161645. doi:10.1098/rspb.2016.1645.

Segall M., Herrel A., Godoy-Diana R. 2019. Hydrodynamics of frontal striking in aquatic snakes: drag, added mass, and the possible consequences for prey capture success. *Bioinspiration & Biomimetics* 14:036005.

Segall M., Cornette R., Godoy-Diana R., Herrel A. 2020. Exploring the functional meaning of head shape disparity in aquatic snakes. *Ecology and Evolution* 10:6993–7005.

Sherratt E., Sanders K.L., Watson A., Hutchinson M.N, Lee M.S.Y., Palci A. 2019. Heterochronic Shifts Mediate Ecomorphological Convergence in Skull Shape of Microcephalic Sea Snakes. *Integrative and Comparative Biology* 59:616–624. doi: 10.1093/icb/icz033.

Showalter I., Todd B.D., Brennan P.L.R. 2014. Intraspecific and interspecific variation of female genitalia in two species of watersnake. *Biological Journal of Linnean Society* 111:183–191

Silva F.M., Oliveira L.S., Nascimento L.R., Machado F.A., Prudente A.L. 2017. Sexual dimorphism and ontogenetic changes of Amazonian pitvipers (*Bothrops atrox*). *Zoologischer Anzeiger* 271:15–24.

Silva F.M., Prudente A.L.C., Machado F.A., Santos M.M., Zaher H., Hingst-Zaher E. 2018. Aquatic adaptations in a Neotropical coral snake: a study of morphological convergence. *Journal of Systematic and Evolutionary Research* 56:382–394.

Slice D. 2001. Landmark Coordinates Aligned by Procrustes Analysis Do Not Lie in Kendall's Shape Space. *Systematic Biology* 50:141–149.

Smith M.T., Collyer M.L. 2008. Regional variation and sexual dimorphism in head form of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*): comparisons using new analytical techniques and collection methods. Pp 79–90 in Hayes W.K, Beaman K.R, Cardwell M.D, Bush S.P. (Eds). The biology of rattlesnakes. Loma Linda Press, California.

Smith M.T. 2014. Induction of phenotypic plasticity in rattlesnake trophic morphology by diet manipulation. *Journal of Morphology* 275:1339–1348.

Souto N.M., Pinna P.H., Machado A.S., Lopes R.T. 2017. New records, morphological variation, and description of the skull of *Liophis dorsocorallinus* Esqueda, Natera, La Marca and Ilija-Fistar, 2005 (Serpentes: Dipsadidae). *Herpetological Review* 48:532–537.

Souto N.M, Murta-Fonseca R.A., Machado A.S., Lopes R.T., Fernandes D.S. 2019. Snakes as a model for measuring skull preparation errors in geometric morphometrics. *Journal of Zoology* 309:12–21.

Sundberg P. 1989. Shape and size-constrained principal component analysis. *Systematic Zoology* 38: 166-168.

Strauss R.E., Bookstein F.L. 1982. The truss body form reconstructions in morphometrics. *Systematic Zoology* 31:113–135.

Tamagnini D., Stephenson J., Brown R.P., Meloro C. 2018. Geometric morphometric analyses of sexual dimorphism and allometry in two sympatric snakes: *Natrix helvetica* (Natricidae) and *Vipera berus* (Viperidae). *Zoology* 129:25–34.

Teissier G. 1938. Un essai d'analyse factorielle. Les variants sexuels de Maia squinada. *Biotypologie* 7:73–96.

Thompson D'A.W. 1917. On growth and form. University press, Cambridge.

Thorpe R.S. 1975. Quantitative handling characters useful in snake systematics with particular reference to intraspecific variation in the Ringed Snake *Natrix natrix*. *Biological Journal of Linnean Society* 7:27–43.

Yi H., Norell M.A. 2015. The burrowing origin of modern snakes. *Science Advances* 1:e1500743.

Zaher H. 1999. Hemipenial morphology of the South American xenodontines snakes, with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 240:1–168.

Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. 2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. Elsevier Academic Press, San Diego.

Editor: Alexandro Tozetti



Micrurus pyrrhocryptus
Villa de las rosas - Cordoba, Argentina
@Francisco Brito

Apêndice I: Tabela com trabalhos publicados que utilizaram as técnicas da MG no estudo de Serpentes, separados por ano de publicação, temas abordados e estrutura utilizada.

Autor	Ano	Tema	Estrutura
Manier	2004	• Delimitação de espécies; • Dimorfismo sexual; • Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Smith & Collyer	2008	• Dimorfismo sexual; • Variação morfológica in-traespecifica	Morfologia externa da cabeça
Gentilli et al.	2009	• Delimitação de espécies	Crânio
Head et al.	2009	• Evolução da forma do corpo; • Morfologia e habitat	Vértebras
Lawing & Polly	2010	• Metodologia MG	Vértebras
Sarris et al.	2012	• Alometria estática; • Variação morfológica in traespecífica	Vértebras
Meik et al.	2012	• Dimorfismo sexual; • Morfologia e dieta	Morfologia externa da cabeça
Henao-Duque & Ceballos	2013	• Dimorfismos sexual	Morfologia externa da cabeça
Moreno-Barajas et al.	2013	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Baum et al.	2014	• Metodologia MG	Crânio
Hossie & Sherratt	2014	• Mimetismo	Morfologia externa da cabeça
Mangiacotti et al.	2014	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Showalter et al.	2014	• Delimitação de espécies; • Variação morfológica in traespecifica	Genitália feminina
Smith	2014	• Morfologia e dieta	Morfologia externa da cabeça
Head & Polly	2015	• Evolução da forma do corpo	Vértebras

Mezzasalma et al.	2015	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Ruane	2015	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Yi & Norell	2015	• Morfologia e habitat; • Origem de Serpentes	Ouvido interno
Andjelkovic et al.	2016	• Alometria estática; • Dimorfismo sexual; • Morfologia e dieta	Crânio
Barbo et al.	2016	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Davis et al.	2016	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Esquerré & Keogh	2016	• Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Fabre et al.	2016	• Morfologia e dieta; • Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Klaczko et al.	2016	• Morfologia e dieta	Crânio
Murta-Fonseca & Fernandes	2016	• Ontogenia	Crânio
Palci et al.	2016	• Ontogenia	Crânio
Pokrant et al.	2016	• Delimitação de espécies	Vértebras
Segall et al.	2016	• Morfologia e uso do habitat	Morfologia externa da cabeça
Santos et al.	2017	• Morfologia e dieta	Crânio
Allemand et al.	2017	• Morfologia e uso do habitat	Crânio
Andjelkovic et al.	2017	• Morfologia e dieta	Crânio
Silva et al.	2017	• Dimorfismo sexual; • Ontogenia	Morfologia externa da cabeça

Equerré et al.	2017	• Ontogenia	Morfologia externa da cabeça
Palci et al.	2017	• Morfologia e habitat; • Origem de Serpentes	Ouvido interno
Moshtaghie et al.	2018	• Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Palci et al.	2018	• Morfologia e habitat	Ouvido interno
Da Silva et al.	2018	• Morfologia e dieta; • Origem de Serpentes	Crânio
Palci & Lee	2018	• Metodologia MG	Crânio
Silva et al	2018	• Morfologia e dieta; • Morfologia e habitat	Crânio
Tamagnini et al.	2018	• Alometria estática; • Dimorfismo sexual	Morfologia externa da cabeça
Akman & Goçomem	2019	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Belgheiszadeh et al.	2019	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Keates et al.	2019	• Delimitação de espécies	Morfologia externa da cabeça
Loebens et al.	2019	• Dimorfismo sexual	Morfologia externa da cabeça
Murta-Fonseca et al.	2019	• Dimorfismo sexual	Crânio
Segall et al.	2019	• Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Sherratt et al.	2019	• Morfologia e dieta	Crânio
Souto et al.	2019	• Metodologia MG	Crânio
Rajabizadeh et al.	2020	• Morfologia e dieta	Dente
Abegg et al.	2020	• Alometria estática; • Dimorfismos sexual; • Ontogenia	Morfologia externa da cabeça

Esquerré et al.	2020	• Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Lucchini et al.	2020	• Dimorfismo sexual; • Ontogenia; • Variação morfológica intraespecifica;	Morfologia externa da cabeça
Rhoda et al.	2020	• Morfologia e dieta	Crânio
Segall et al.	2020	• Morfologia e dieta; • Morfologia e habitat	Morfologia externa da cabeça
Cleuren et al.	2021	• Morfologia e dieta	Dente