

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

**CITOGENÔMICA COMPARATIVA DE MORCEGOS DA FAMÍLIA
PHYLLOSTOMIDAE NA AMAZÔNIA**

SABRINA EMANUELA DE MELO ARAÚJO

Manaus, Amazonas

Janeiro 2016

SABRINA EMANUELA DE MELO ARAÚJO

**CITOGENÔMICA COMPARATIVA DE MORCEGOS DA FAMÍLIA
PHYLLOSTOMIDAE NA AMAZÔNIA**

DR. CARLOS HENRIQUE SCHNEIDER – UFAM

Dra. Maria Claudia Gross – UFAM

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica.

Manaus, Amazonas

Janeiro 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

A663c Araujo, Sabrina Emanuela de Melo
Citogenômica comparativa de morcegos da família
Phyllostomidae na Amazônia / Sabrina Emanuela de Melo Araujo.
2016
56 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Henrique Schneider
Coorientadora: Maria Claudia Gross
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Amazônia. 2. evolução cariotípica. 3. heterocromatina. 4. DNAs
repetitivos. I. Schneider, Carlos Henrique II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

Sinopse:

Quatro espécies de filostomídeos foram estudadas mediante análises de citogenética clássica (coloração convencional, detecção da heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolo) e molecular e (hibridização fluorescente *in situ* de DNA repetitivo). Os resultados obtidos demonstraram que o mapeamento físico cromossômico de sequências repetitivas de DNA estão relacionadas a diversificação cariotípica, com padrão de organização diferencial entre os táxons de diferentes clados.

Palavras-chave: Amazônia, evolução cariotípica, heterocromatina, DNAs repetitivos.

Aos meus pais, aos meus irmãos e
a Diego Rodrigues, com amor
dedico.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus por quem tenho fé e por quem deposito minhas esperanças.

Ao meu pai Manoel Luciano e à minha mãe Maria Lúcia, meus exemplos de vida e aprendizagem, por cuidarem de mim em cada detalhe, meu porto seguro e por todo amor me doam.

Aos meus irmãos, por me entenderem mesmo nos momentos de estresse e confiarem em mim.

Ao meu amor, amigo e companheiro Diego Rodrigues que sempre me apoiou com carinho, paciência, incentivo e confiança.

Aos meus amigos que são uma extensão da minha família, em especial a Priscilla e a Angélica, que me apoiam e que sempre estão presentes.

Aos meus orientadores Carlos Schneider e Maria Claudia Gross por me acolherem com carinho e paciência, me ensinando não só em falar, mas por demonstrar o quão são excelentes profissionais e pessoas a quem se inspirar.

A todos do Laboratório de Citogenética Animal, em especial: Vanessa Pinheiro, pelas conversas, companhias durante o almoço e apoio na bancada; Sabrina Mitozo, por dividir comigo momentos difíceis como a qualificação e as FISHs; Francijara, pelas banguças de todos os dias, tornando-os mais alegres; Natália, pela experiência e paciência na bancada; Leonardo e Érica companhias agradáveis de conversar e todos os outros no qual tive oportunidade de conhecer durante esta caminhada, obrigada por cada detalhe ensinado e aprendido, cada momento compartilhado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro da bolsa e também à Rede de pesquisa para ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de vertebrados da Amazônia brasileira com aplicações sobre seu uso e conservação – Rede BioPHAM (CNPq/FAPEAM)

Por fim, agradeço aos meus morceguinhos, sem vocês isso tudo não seria possível.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Resumo

Dentre os Chiropteros, a família Phyllostomidae constitui o clado mais diversificado do neotrópico e na Amazônia são encontradas cerca de 80 espécies. Do ponto de vista cromossômico, Phyllostomidae destaca-se por apresentar grande variação cariotípica, com números diplóides que vão de $2n=14$ em *Vampyressa melissa* (Stenodermatinae) a $2n=46$ em *Macrotus waterhousii* (Macrotinae). São vários os processos ou mecanismos genéticos que podem resultar em alterações cromossômicas numéricas/estruturais e muitas vezes sequências repetitivas de DNA estão envolvidas neste processo. Visando compreender a variedade e a evolução cariotípica desta família, foram realizadas análises citogenéticas clássicas e moleculares em cromossomos mitóticos de quatro espécies, pertencentes a quatro subfamílias de clados filogenéticos distintos: *Artibeus obscurus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Phyllostomus elongatus*. *Artibeus obscurus* apresentou $NF=56$ e $2N=30/31$, sendo $22m+6st+XX/XY_1Y_2$; *C. perspicillata* $NF=36$ e $2N=20/21$, sendo $14m-sm+4st+XX/XY_1Y_2$; *D. rotundus* $NF=52$ e $2N=28$, sendo $26m-sm+XX/XY$; *P. elongatus* $NF=60$ e $2N=32$, sendo $28m-sm+2a+XX/XY$. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva revelou marcação na região pericentromérica em todos os cromossomos das quatro espécies analisadas e variações intraespecíficas foram observadas quando comparados os resultados deste trabalho com o existente na literatura. Em relação à marcação de sítios de DNA ribossomal 18S e regiões organizadoras de nucléolo ativas, em *A. obscurus* foram evidenciados na região terminal dos pares 5, 6 e 7; em *C. perspicillata* na região pericentromérica do cromossomo X; em *D. rotundus* na região centromérica do par 8 e em *P. elongatus* na região centromérica/terminal do par 15. Marcações teloméricas conspícuas foram visualizadas em *D. rotundus* e *P. elongatus*, enquanto que em *A. obscurus* e *C. perspicillata* as marcações terminais são tênues. Sítios teloméricos intersticiais foram ausentes em *P. elongatus* e presente nas demais espécies, podendo ser indicativo de fusões. O retroelemento LINE-1 revelou marcação dispersas, porém em alguns cromossomos são coincidentes com os padrões de bandas escuras evidenciados na banda G, sendo também acumulados no cromossomo X. Se comparada a posição filogenética as espécies estudadas, nota-se que os táxons mais derivados, acumulam maior variação cariotípica, assim como os elementos repetitivos.

Palavras-chaves: Amazônia, evolução cariotípica, heterocromatina, DNAs repetitivos.

Abstract

Among the Chiropteran, the Phyllostomidae family is the most diverse clade of the Neotropics and in Amazon are found about 80 species. From a chromosomal point of view, Phyllostomidae stands out for presenting many karyotype variation, with diploid numbers ranging from $2n = 14$ in *Vampyressa melissa* (Stenodermatinae) to $2n = 46$ in *Macrotus waterhousii* (Macrotinae). There are several genetic mechanisms or processes that can result in numeric/structural chromosomal abnormalities and often repetitive DNA sequences are involved in this process. In order to understand the variety and karyotype evolution of this family, classical and molecular cytogenetic analyzes were performed on mitotic chromosomes of four species belonging to four subfamilies of distinct phylogenetic clades: *Artibeus obscurus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* and *Phyllostomus elongatus*. *Artibeus obscurus* presented $NF = 56$ and $2N = 30/31$, with $22m + 6st + XX / XY1Y2$; *C. perspicillata* $NF = 36$ and $2N = 20/21$, with $14m-sm + 4st + XX / XY1Y2$; *D. rotundus* $NF = 52$ and $2N = 28$, and $26m-sm + XX / XY$; *P. elongatus* $NF = 60$ and $2N = 32$, and $28m-sm + 2a + XX / XY$. The distribution pattern of constitutive heterochromatin revealed a signal in the pericentromeric region in all chromosomes of the four analyzed species and intraspecific variations were observed when compared the results of this work with the one in existing literature. Regarding the signal of ribosomal DNA sites 18S and nucleolus organizer regions active in *A. obscurus* were shown in the terminal region of the pairs 5, 6 and 7; *C. perspicillata* in pericentromeric region of the X chromosome; *D. rotundus* in the centromeric region of pair 8 and in *P. elongatus* in the centromeric/terminal region of the pair 15. Conspicuous telomeric signals were observed in *D. rotundus* and *P. elongatus*, while in *A. obscurus* and *C. perspicillata* the terminals signals are blurred. Interstitial telomeric sites were absent in *P. elongatus* and present in other species, which may indicate mergers. The LINE-1 retroelement presented scattered signals, however in some chromosomes they are identical to the patterns of dark bands evident in the band G and is also accumulated on chromosome X. If compared the phylogenetic position of the studied species, it is noted that the most derived taxons accumulate high karyotype variation as repetitive elements.

Key words: Amazon, karyotype evolution, heterochromatin, repetitive DNA.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 13 |
| 1.1 Aspectos gerais sobre o modelo de estudo | 13 |
| 1.2 Estudos Citogenéticos de Phyllostomidae | 18 |
| 2. Objetivos..... | 22 |
| 2.1 Geral | 22 |
| 2.2 Específicos..... | 22 |
| 3. Material e Métodos | 23 |
| 3.1 Material..... | 23 |
| 3.2 Métodos | 24 |
| 3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos | 24 |
| 3.2.2 Técnicas citogenéticas clássicas | 25 |
| Detecção das regiões organizadoras de nucléolo – RONS | 25 |
| Detecção da heterocromatina constitutiva (Banda C) | 25 |
| Detecção da Banda G | 26 |
| 3.2.3 Técnicas citogenéticas moleculares..... | 26 |
| Extração de DNA..... | 26 |
| Isolamento de sequências repetitivas por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) e marcação por <i>nick translation</i> | 27 |
| Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência..... | 28 |
| 3.2.4 Análise cariotípica | 29 |
| 4. Resultados..... | 31 |
| 4.1 Coloração convencional | 31 |
| 4.2 Padrão de Heterocromatina Constitutiva..... | 31 |
| 4.2 Sítios de DNA ribossomal 18S e Regiões Organizadoras de Nucléolo | 34 |
| 4.3 Telômeros | 34 |
| 4.4 Line 1 e Banda G | 36 |
| 5. Discussão | 39 |

6. Conclusão46

7. Referências bibliográficas47

Lista de Figuras

- Figura 1.** a) filogenia molecular proposta por Baker et al. (2003). b) A filogenia molecular deduzida de um completo conjunto de dados moleculares. Fonte: Datzmann et al. (2010).....17
- Figura 2.** Mapa evidenciando os pontos de coleta.....23
- Figura 3.** Cariótipos de fêmeas em coloração convencional: a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*. Em destaque nos quadrados os cromossomos sexuais dos machos.....32
- Figura 4.** Padrões de distribuição de heterocromatina em cromossomos mitóticos de fêmeas: a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*. Em destaque nos quadrados os cromossomos sexuais dos machos.....33
- Figura 5.** Cromossomos portadores de sítios de DNA ribossomal 18S à esquerda (sinais em vermelho) e regiões organizadoras de nucléolo ativas impregnadas com nitrato de prata à direita: a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*. Em destaque nos quadrados os cromossomos sexuais dos machos.....34
- Figura 6.** Localização física cromossômica de sequências teloméricas de DNA (sinais em vermelho) em cariótipos de indivíduos machos. a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*.....35
- Figura 7.** Padrão de distribuição de Line 1 (a,c – marcações em vermelho) e bandamento longitudinal G (b, d) em cromossomos mitóticos das fêmeas de: a-b. *Artibeus obscurus*; c-d. *Carollia perspicillata*.....37
- Figura 8.** Padrão de distribuição de Line 1 (a,c – marcações em vermelho) e bandamento longitudinal G (b, d) em cromossomos mitóticos de: a-b. *Desmodus rotundus*; c-d. *Phyllostomus elongatus*.....38

Lista de Abreviações e Siglas

2N - Número diploide

AgNO₃ - Nitrato de prata

BioPHAM - Rede de pesquisa para ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de vertebrados da Amazônia brasileira com aplicações sobre seu uso

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAr - DNA ribossomal

FISH - Hibridização in situ Fluorescente (*Fluorescence in situ Hybridization*)

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

INPA – Instituto de Pesquisa da Amazônia

ITS - Sítios Teloméricos Intersticiais

LINEs - Long Interspersed Nuclear Elements

N - Norte

NF - número fundamental

PCR - Polymerase Chain Reaction

S - Sul

RAG2 - Recombination activating gene 2

RNA - Ácido ribonucleico

RNAr - RNA ribossomal

RNA_t - RNA transportador

RON - Região Organizadora de Nucléolo

RONs - Regiões Organizadoras de Nucléolos

(TTAGGG)_n - Sequência telomérica

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

W - Oeste

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais sobre o modelo de estudo

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera e constituem um grupo de mamíferos abundante e diverso nas regiões tropicais (Nowak, 1994; Emmons e Feer, 1997). Representa aproximadamente 21% de todas as espécies com ampla distribuição mundial (IUCN, 2016) e com cerca de 1150 espécies em 202 gêneros e 20 famílias (Gardner, 2008). Ela tem sido dividida em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera, mas este arranjo não reflete as relações de parentesco entre as espécies (Peracchi *et al.*, 2011). Dentro do arranjo atual, a família Pteropodidae, que anteriormente era a única representante dos Megachiroptera, faz parte da subordem Yinpterochiroptera, juntamente com Rhinolophidae, Hipposideridae, Rhinopomatidae, Craseonycteridae e Megadermatidae, sendo que todas as demais famílias fazem parte da segunda subordem, Yangochiroptera (Wetterer *et al.* em revisão a, b).

Os quirópteros possuem características morfológicas e fisiológicas peculiares, que os capacitam ao verdadeiro voo. A maioria das espécies conseguem ecolocalizar, o que lhes permite ocupar abrigos menos expostos à predação e à competição e são capazes de explorar de modo eficiente os recursos oferecidos pelo meio, devido à diversificação de seus hábitos alimentares. Desta forma, contribuem ativamente para reciclagem de nutrientes, polinização e dispersão de sementes, são predadores e presas, controlam populações de insetos, incluindo algumas pragas agrícolas e também agem como vetores de doenças como a raiva, com significativo impacto sobre humanos, rebanhos animais e outras espécies de morcegos (Bernad *et al.*, 2012). Assim, os quirópteros constituem um grupo bem sucedido, presentes nas regiões temperadas e tropicais de todos os continentes (Varella-Garcia e Taddei, 1989; Brusco e Tozato, 2009).

Embora a capacidade de voo seja a característica mais marcante dos morcegos, considera-se que suas características faciais apresentam, possivelmente, o maior grau de variação em relação a qualquer outro grupo de mamíferos. Estas se encontram intrinsecamente relacionadas com as suas diferentes dietas e métodos de obtenção de alimento. De acordo com seus hábitos alimentares, os morcegos podem ser classificados em: frugívoros, insetívoros, nectívoros, onívoros, hematófagos e psicívoros (Hill e Smith, 1984; Altringham, 1996.)

Com aproximadamente 175 espécies, o Brasil abriga cerca de 15% da riqueza de morcegos do planeta, onde são encontradas as nove famílias conhecidas para a região Neotropical: Emballonuridae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Natalidae, Molossidae, Vespertilionidae e Phyllostomidae, totalizando 64 gêneros, que ocorrem em todo o território nacional (Reis *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011; Paglia *et al.*, 2011; Bernard *et al.*, 2012).

Grande parte da riqueza de morcegos do Brasil está presente na Amazônia. A compilação corrigida e atualizada dos registros de espécies de morcegos para a Amazônia Brasileira indica a ocorrência de pelo menos 146 espécies, distribuídas em 64 gêneros, estando presentes as nove famílias de morcegos conhecidas para a Região Neotropical, com destaque para Phyllostomidae, com 80 espécies (Bernard *et al.*, 2011). Contudo, ainda existe uma enorme lacuna de conhecimento para a fauna de morcegos nesta região, pois a maior parte das coletas e registros está concentrada em poucas áreas, geralmente de acesso rápido e de fácil logística, próximas aos maiores centros urbanos ou ao longo de alguns dos grandes rios da região (Bernard *et al.*, 2011).

Os representantes da família Phyllostomidae variam muito em tamanho e cor da pelagem. O comprimento da cabeça e corpo compreende de 40 a aproximadamente 135 mm e, a maioria das espécies apresenta um apêndice nasal em forma de folha, o qual constitui a característica mais importante para a identificação da família, mas nos morcegos vampiros (Desmodontinae) este apêndice encontra-se modificado em forma de ferradura (Faria, 2003). Além disso, a família Phyllostomidae é endêmica do continente americano, destacando-se como o grupo mais versátil na exploração de alimentos entre os Chiroptera, podendo explorar frutos, néctar, pólen, folhas, insetos, vertebrados e sangue (Leite *et al.*, 2010). Devido sua ampla variedade de hábitos alimentares, esses animais participam ativamente da reciclagem de nutrientes e energia em um ecossistema (Brusco e Tozato, 2009).

Atualmente a família Phyllostomidae é composta por 10 subfamílias, sendo elas: Macrochinae, Micronycterinae, Desmodontinae, Phyllostominae, Lonchophyllinae, Rhinophyllinae, Stenodermatinae, Carollinae, Glyphonycterinae, Glossophaginae (Datzmann *et al.*, 2010). Macrochinae é uma subfamília considerada como um clado basal para os filostomídeos, nela inclui espécies do gênero *Macrotus* (Baker *et al.*, 2003). Micronycterinae, formada pelos gêneros *Lampronnycteris* e *Micronycteris* (Wetterer *et al.*, 2000), no entanto, sua composição ainda é inserta (Baker *et al.*, 2003).

Desmodontinae é endêmica da América Latina e é composta por três gêneros monotípicos: *Desmodus*, *Diaemus* e *Diphylla*. São extremamente especializados para a dieta de sangue, apresentando modificações nos incisivos, que são muito afilados e em forma de bisel, e saliva com propriedades anticoagulantes. No Brasil os três gêneros são encontrados e suas espécies são simpátricas (Brass, 1994; Reis *et al.*, 2007; Peracchi *et al.*, 2011). Glossophaginae inclui duas tribos e no Brasil está representada por oito gêneros e 14 espécies; sua dieta é essencialmente composta por néctar, contribuindo para a polinização de diversas espécies de plantas (Reis *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011).

A subfamília Phyllostominae constitui o clado mais diversificado do neotrópico, com formas que variam de menos de 10 até quase 200 g (Wetterer *et al.*, 2000). Dos 16 gêneros descritos, 15 estão representados no Brasil e na Amazônia são encontradas cerca de 80 espécies (Reis *et al.*, 2007). A maioria dos filostomíneos possui orelhas e apêndices nasais desenvolvidos, auxiliam na ecolocalização e na percepção sonora de suas presas (Reid, 1997).

Lonchophyllinae inclui os gêneros *Lionycteris*, *Lonchophylla* e *Platalina* (Baker *et al.*, 2003). Carollinae possui apenas o gênero *Carollia* (Baker *et al.*, 2003), são animais robustos e de focinho reduzido (Reis *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011; Peracchi *et al.*, 2011). Glyphonycterinae inclui os gêneros *Glyphonycteris* e *Trinycteris* (Baker *et al.*, 2003). O gênero *Rhinophylla*, antes incluído na subfamília Carollinae (Wetterer *et al.*, 2000), está presente na subfamília Rhinophyllinae e apresenta como grupo irmão o clado Stenodermatinae (Baker *et al.*, 2003; Datzmann *et al.*, 2010).

Stenodermatinae possui dezessete gêneros conhecidos, destes doze ocorrem no Brasil, a mesma ainda é formada por duas tribos a Stunirini que inclui os morcegos o gênero *Sturnira* e a Stenodermatini, incluindo os morcegos dos gêneros *Ametrida*, *Artibeus*, *Chiroderma*, *Enchisthenes*, *Mesophylla*, *Platyrrhinus*, *Pygoderma*, *Sphaeronycteris*, *Uroderma*, *Vampyressa*, *Vampyrodes*. A dieta dos morcegos desta família é predominantemente frugívora e seu tamanho corporal pode variar de 25mm a 75mm (Simmons, 2005; Reis *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011).

Apesar da família Phyllostomidae ser uma das mais estudadas sob o ponto de vista biológico, a sistemática intrafamiliar é complexa e ainda não está bem compreendida (Figura 1). Análise do DNA mitocondrial com base nas sequências de RNAr 12S e 16S, RNAt valina e do gene nuclear RAG2 de espécies representantes de 48 gêneros de morcegos filostomídeos revela a criação de grupos não taxonômicos para a similaridades filogenéticas e ecológicas,

tais como o Karyovarians (variedade cariotípica), Victivarians (variedade no modo de vida), Phyllovarians (variedade de folha-nasal), Dulcivarians (dieta baseada em néctar), Carpovarians (dieta frugívora), evidenciando a complexidade e diversidade de espécies (Baker *et al.*, 2003). Ainda, gêneros nectarívoros *Lonchophylla* e *Lionycteris* estão mais relacionadas com filostomídeos frugívoros, principalmente das subfamílias Rhinophyllinae, Stenodermatinae, Carolliinae e Glyphonycterinae, do que com morcegos nectarívoros Glossophaginae, sugerindo uma origem independente de adaptações morfológicas (Datzmann *et al.*, 2010).

Em resumo, o estudo de Datzmann *et al.* (2010), apoia a classificação das morcegos Phyllostomidae proposta por Baker *et al.* (2003), com a divisão em mais subfamílias, em comparação com estudos anteriores, pois este reflecte melhor a notável diversidade ecológica desta família. Visando compreender a variedade e a evolução cariotípica desta família, foram realizadas análises citogenéticas clássicas e moleculares em cromossomos mitóticos de quatro espécies: *Artibeus obscurus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Phyllostomus elongatus*, todas incluídas no grupo não taxonômico Karyovarians, como proposto Baker *et al.*, (2003).

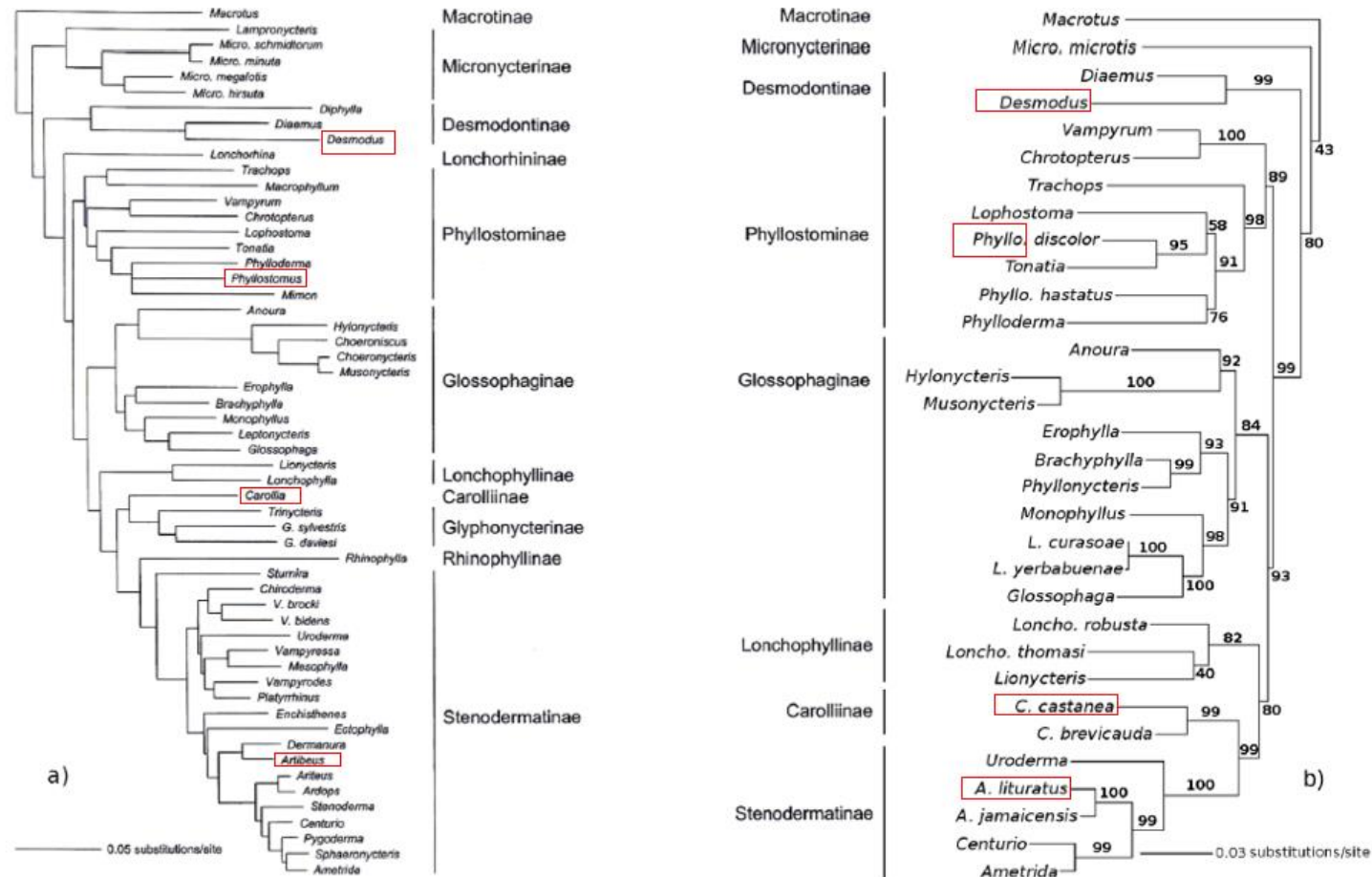


Figura 1. a) Filogenia molecular proposta por Baker *et al.* (2003). b) A filogenia molecular deduzida de um completo conjunto de dados moleculares (10.396 bp de um total de doze genes nucleares e mitocondriais). Em destaque os gêneros analisados no presente estudo. Fonte: Datzmann *et al.* (2010).

1.2 Estudos Citogenéticos de Phyllostomidae

A citogenética compreende estudos relacionados aos cromossomos isolados ou em conjunto, sua morfologia, função, replicação, comportamento nas divisões celulares, localização gênica, sua variabilidade e evolução, e sua forma distendida ou condensada (Guerra, 2004). Por meio dos estudos citogenéticos clássicos é possível localizar as regiões organizadoras dos nucléolos com a impregnação com nitrato de prata (AgNO_3) (Howell e Black, 1980), demonstrar variações na quantidade e constituição da heterocromatina constitutiva por meio do bandamento C (Sumner, 1972), bem como identificar eventuais rearranjos cromossômicos, tais como inversões pericêntricas, fusões/fissões cêntricas por meio do bandamento G e R (Sumner, 1990). Já pela técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*), segmentos específicos de DNA ou RNA, quimicamente modificados, podem ser utilizados como sondas, as quais reconhecem sequências de DNA de interesse nos cromossomos, tais como telômeros, sítios ribossomais e DNAs repetitivos, permitindo o mapeamento físico cromossômicos dos mesmos (Rogatto e Rainho, 2000).

Desta forma, os estudos citogenéticos, juntamente com os estudos ecológicos, têm auxiliado na compreensão da taxonomia, sistemática e os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação de morcegos. Se tomarmos como exemplo a família Phyllostomidae, a maioria dos pesquisadores a aceita como monofilética, mas suas espécies são anatomicamente diversas e complexas, levando a dúvidas sobre sua sistemática e suas relações evolutivas (Pieczarka *et al.*, 2005). Estudos citogenéticos tem trazido grande contribuição para a caracterização de táxons, assim como para o desenvolvimento de hipóteses de relacionamento evolutivo, pois possibilitam uma avaliação da intensidade e dos padrões de evolução cromossômica ocorridos entre e dentro dos táxons (Forman *et al.*, 1968; Baker, 1970; Simpson, 1989; Varella-Garcia e Taddei, 1989; Varella-Garcia *et al.*, 1989).

São vários os processos ou mecanismos genéticos que podem resultar em alterações cromossômicas numéricas/estruturais, tais como: inversões, translocações, fissão e fusão cêntrica (John, 1980). Para elucidar estes aspectos, vários autores têm utilizado as técnicas de bandeamentos para o esclarecimento das relações filogenéticas e dos mecanismos de evolução cromossômica por meio de comparações de padrões de bandas cromossômicas entre os táxons (Baker, 1970; Varella-Garcia e Taddei, 1989; Faria e Morielle-Versute, 2004; Rodríguez, 2007; Sotero-Caio *et al.*, 2011; Leal, 2012). Ainda, pintura cromossômica tem sido utilizada para localizar homeologia de segmentos cromossômicos entre as espécies investigadas (Noronha *et al.*, 2008; Sotero-Caio *et al.*, 2011; Pieczarka *et al.*, 2013)

As translocações são consideradas como um dos fenômenos mais atuantes na evolução cromossômica dos mamíferos, especialmente as Robertsonianas, que podem ser responsáveis pela formação de cromossomos meta-submetacêntricos e subteloentéricos, a partir de dois elementos acrocêntricos, tais eventos podem explicar a variação cariotípica presente em números diplóides que vão de $2n=14$ em *Vampyressa melissa* (Stenodermatinae) a $2n=46$ em *Macrotus waterhousii* (Macrotinae) (Baker, 1979). Quando uma fusão ocorre entre um autossomo e os cromossomos sexuais há redução tanto do número de ploide quanto do número fundamental. Caso o evento aconteça entre o X, mas não envolva o Y, resultará na diferença do número de ploide da fêmea em relação ao macho, embora permaneça o mesmo número fundamental (Baker e Bickham, 1980).

Dentre os morcegos amazônicos, alguns apresentam descrição do número de ploide, padrões de bandamento e técnicas moleculares (Silva *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2010; 2011; Rodrigues *et al.*, 2000; Silva, 2011; Noronha *et al.*, 2008; 2009; 2010; Pieczarka *et al.*, 2005; 2013; Sotero-Caio *et al.*, 2011). Para Phyllostomidae a maioria dos gêneros possui cariótipos altamente conservados, mas com intensa variabilidade intergenérica, o que torna qualquer análise comparativa usando somente o bandamento clássico muito difícil. Contudo a análise citogenética molecular ainda é incipiente, especialmente quando considerado a análise cromossômica comparativa de sequências de DNA repetitivo entre diferentes grupos de filostomídeos (Tabela 1).

Os DNAs repetitivos incluem sequências dispersas como os transposons e retrotransposons, assim como as famílias multigênicas que codificam importantes moléculas, por exemplo, os RNAs ribossômicos (RNAr) e sequências teloméricas com funções estruturais (Martins *et al.*, 2007). Contudo, devido a sua natureza repetitiva, estas sequências tendem a acumular mais diferenças que outras porções genômicas, sendo interessante o seu mapeamento cromossômico para análises comparativas entre espécies que pertencem a diferentes clados da árvore filogenética proposta por Baker *et al.* (2003) e Datzmann *et al.* (2010), visando compreender se os DNAs repetitivos contribuir para a diferenciação de clados, estando organizados cromossomicamente de maneira diferente entre espécies basais e derivadas.

Tabela 1. Dados citogenéticos disponíveis na literatura para espécies de Phyllostomidae. Sendo: p – pericentromérica; c – centromérica; t – telomérica; i – intersticial; d – distal; m – metacêntrico; sm – submetacêntrico; a – acrocêntrico; st – subtelocêntrico; ITS – sítio telomérico intersticial.

| Subfamília | Espécie | Localidade | Citogenética clássica | | | | Citogenética molecular | | | |
|-----------------|------------------------------|---|-----------------------|----|---|---|---|-------------------------|--------------------|---------------------------------|
| | | | 2n | NF | Banda C | RON - par | Telômero | 45S | 5S | Outros |
| Stenodermatinae | <i>Artibeus lituratus</i> | Pernambuco ^{1,2} Espírito Santo ⁵ | 30 - F 31- M | 56 | (p-todos; t-5,6,7,X) ¹ (p-todos; t-5,6,7) ^{2,5} | (5, 6, 7) ² | (t-todos, ITS-5 pares) ²¹ | (5, 6, 7) ²¹ | (st) ²¹ | |
| | <i>Artibeus jamaicensis</i> | Pernambuco ¹ | 30 - F 31- M | 56 | (p-todos; t-5,6,7,9, 13 e X; i-1,2,3) ¹ | | | | | |
| | <i>Artibeus obscurus</i> | Pernambuco ^{1,2} Amazonas ⁷ Pará ^{15,17} | 30 - F 31- M | 56 | (p - todos; t - 5,6,7 e X; i - 5 e 6) ¹ (p-todos; t-5,6,7) ² (X-c, t; X-c, t, i) ⁷ | (5, 6, 7) ² | (t-todos, ITS-5 pares) ²¹ | | (st) ²¹ | (ZOO- FISH) ^{15,17} |
| | <i>Artibeus fimbriatus</i> | Pernambuco ² Espírito Santo ⁵ | 30 - F 31- M | 56 | (p-todos; t-5,6,7) ^{2,5} | (5, 6, 7) ² | | | | |
| | <i>Artibeus planirostris</i> | Pernambuco ² São Paulo/ Minas Gerais ¹⁴ | 30 - F 31- M | 56 | (p-todos; t-5,6,7) ² (p-todos; t-5,6,7; i-1,2,3,5,6,7) ¹⁶ | (5, 6, 7) ^{2,16} | (t-todos, ITS-5 pares) ²¹ (t-todos; p- 5,7) ¹⁴ | (5, 6, 7) ²¹ | (st) ²¹ | (ZOO- FISH) ¹⁴ |
| | <i>Artibeus sp</i> | Amazonas ⁶ | 30 - F 31-M | 56 | (X-t; c) ⁶ | | | | | |
| | <i>Platyrrhinus lineatus</i> | Pernambuco/ Bahia ¹³ São Paulo/ Minas Gerais ¹⁴ | 30 | 56 | (p-todos; i-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8; d-5, 6, 7, 9 X) ¹³ | (7) ¹³ | (t-todos, ITS- 10 pares) ²¹ (t-todos) ¹⁴ | (7) ²¹ | (st) ²¹ | (ZOO- FISH) ¹⁴ |
| | <i>Sturnira lilium</i> | Pernambuco e Bahia ¹³ São Paulo/ Minas Gerais ¹⁴ | 30 | 56 | (p-todos; d-5, 6, 7, 9, X) ^{13,23} | (7) ¹³ | (t-todos, ITS-7 pares) ²¹ (t-alguns) ¹⁴ | (7) ²¹ | (st) ²¹ | (ZOO- FISH) ¹⁴ |
| | <i>Uroderma magnirostrum</i> | Pará ⁴ | 36 | 62 | (p-todos; d-X) ⁴ | (Braço curto dos sm) ⁴ | | | | |
| | <i>Uroderma bilobatum</i> | Pará ^{4,17} | 42 | 50 | (p-todos; d-1,2; t-X) ⁴ | (braço curto do sm/a) ⁴ | | | | (ZOO- FISH) ¹⁷ |

| | | | | | | | | | |
|----------------|-------------------------------|--|----------------|----|--|--|--|--|--------------------------|
| Desmondontinae | <i>Desmodus rotundus</i> | Pernambuco ³ Pará ¹⁸ | 28 | 52 | (p-todos) ^{3,23} | (8) ^{3,16} | | | (ZOO-FISH) ¹⁸ |
| | <i>Diphylla eucadata</i> | Pernambuco ³ Pará ¹⁸ | 32 | 60 | (p-todos) ³ | (13) ³ | | | (ZOO-FISH) ¹⁸ |
| | <i>Diaemus youngi</i> | Pará ¹⁸ | | | | (15) ¹⁶ | | | (ZOO-FISH) ¹⁸ |
| Carolliinae | <i>Carollia perspicillata</i> | Espírito Santo ⁸ São Paulo/ Minas Gerais ¹⁴ Pernambuco ²¹ | 20 - F 21-M | 36 | (p-todos; i-1) ⁸ (p-todos; i-1; t-2,3,5,X) ^{16,22,23} | (X) ⁸ | (t-todos; p- exceto 7;X) ^{14,20,21} | (X) ^{20,21} (3) ^{20,21} | (ZOO-FISH) ¹⁴ |
| Glossophaginae | <i>Glossophaga soricina</i> | Pernambuco e Bahia ¹³ Nuremberg ¹¹ São Paulo/ Minas Gerais ¹⁴ Pará ¹⁹ | 32 | 60 | (p-todos; d-Y) ¹³ (c; p-X; d-29) ¹¹ | (15) ¹³ (29) ¹¹ | (t-todos, sem ITS) ²¹ | (15) ²¹ (15) ²¹ | (ZOO-FISH) ¹⁹ |
| Phyllostominae | <i>Phyllostomus elongatus</i> | Pernambuco ⁹ | 32 | 58 | (p-todos) ⁹ | (15) ⁹ | (t-todos, sem ITS) ²¹ | (15) ²¹ (9) ²¹ | |
| | <i>P. discolor</i> | Pernambuco ⁹ Pará ¹⁰ | 32 | 60 | (p-todos) ^{9,10,22} | (15) ^{9,10,16} | (t-todos, sem ITS) ²¹ | (15) ²¹ (13) ²¹ | |
| | <i>P. hastatus</i> | Pará ¹⁰ São Paulo/ Minas Gerais ¹⁴ | 32 | 58 | (p-todos) ¹⁰ | (15) ¹⁰ | | | (ZOO-FISH) ¹⁴ |

Fonte: 1-Lemos-Pinto (2005); 2-Lemos-Pinto (2012); 3-Santos *et al.* (1999); 4-Silva *et al.* (2005); 5-Pagnozzi *et al.* (2008); 6-Souza *et al.* (2010); 7-Souza *et al.* (2011); 8-Moreira *et al.* (2009); 9-Estevam *et al.* (2005); 10-Rodrigues *et al.* (2000); 11-Vollet *et al.* (1999); 13-Calixto (2008). 14-Faria (2003); 15-Noronha *et al.* (2008); 16-Varella-Garcia e Taddei (1989); 17-Pieczarka *et al.* (2013); 18-Sotero-Caio *et al.* (2011); 19-Noronha *et al.* (2010); 20- Oliveira e Santos (2011); 21-Calixto *et al.* (2013); 22-Santos e Souza *et al.* (1998); 23-Varella-Garcia *et al.* (1989).

2. Objetivos

2.1 Geral

Comparar citogeneticamente morcegos das espécies *Phyllostomus elongatus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Artibeus obscurus*, as quais pertencem a quatro subfamílias de Phyllostomidae, para o melhor entendimento da organização cromossômica dos mesmos e da evolução cariotípica dos táxons.

2.2 Específicos

- Determinar o cariótipo das espécies de morcegos: *Phyllostomus elongatus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Artibeus obscurus* considerando seu número e morfologia;
- Estabelecer os padrões de distribuição da heterocromatina constitutiva (Banda C), Banda G e da região organizadora de nucléolo (RONs) em cromossomos mitóticos de forma a permitir a comparação entre os táxons analisados;
- Mapear sequências repetitivas de DNA em cromossomos mitóticos;
- Identificar quais as possíveis alterações cromossômica presente na evolução cariotípica destes quirópteros.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Foram analisados citogeneticamente morcegos de quatro subfamílias de Phyllostomidae coletados em quatro localidades (Figura 2): localidade 1 - margens do rio Jatapu no município de São Sebastião do Uatumã ($0^{\circ}50'$ e $01^{\circ}55'S$; $58^{\circ}50'$ e $60^{\circ}10'W$); localidade 2 - margens do rio Purus no município de Tapauá ($5^{\circ}42'115''S$; $63^{\circ}13'684''W$); Localidade 3 - margens dos rios Darahá e Ayuanã nas proximidades do município de Santa Isabel do Rio Negro ($0^{\circ}24'24''N$; $65^{\circ}1'1''W$); e localidade 4 – margens do rio Japurá ($2^{\circ}3' S$; $65^{\circ}17' W$) contemplando as seguintes espécies: *Phyllostomus elongatus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Artibeus obscurus* (Tabela 2).

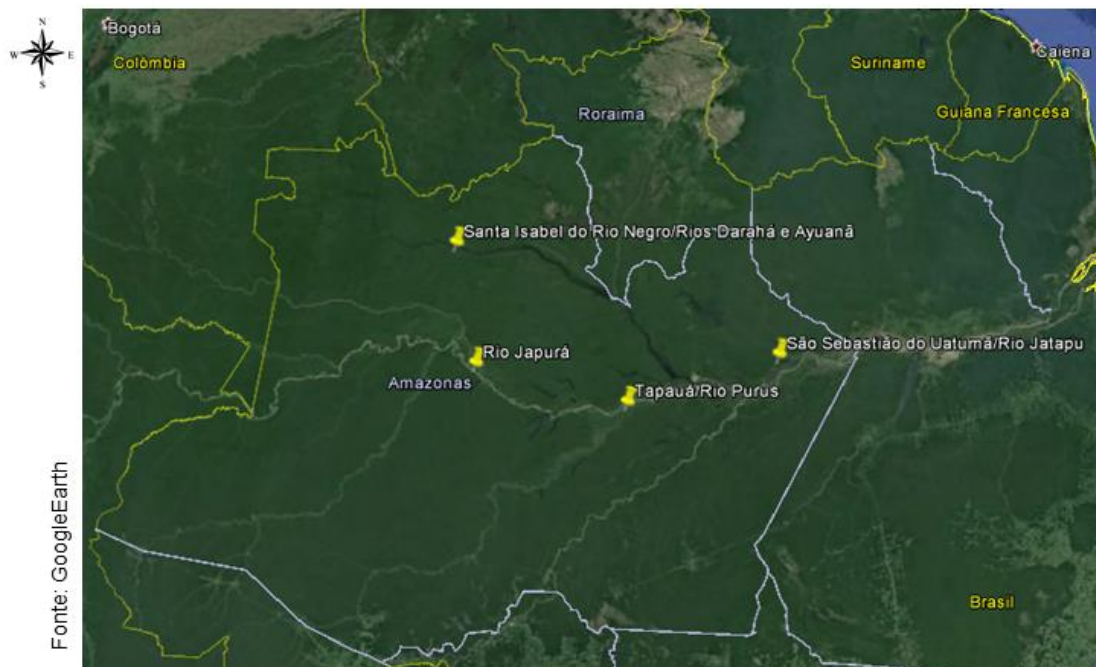


Figura 2. Mapa evidenciando os pontos de coleta.

Tabela 2. Locais de coleta de cada uma das espécies analisadas, o sinal (-) significa ausência de análise devido à falta de amostragem ou suspensões sem metáfases.

| Espécies | Localidades | | | |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Phyllostomus elongatus</i> | - | 1 macho | 1 fêmea e 1 macho | - |
| <i>Carollia perspicillata</i> | 2 fêmeas e 1 macho | 2 fêmeas e 1 macho | - | - |
| <i>Desmodus rotundus</i> | 1 fêmea e 1 macho | - | 1 fêmea | 1 fêmea |
| <i>Artibeus obscurus</i> | 2 fêmeas | 1 fêmea e 2 machos | 2 fêmeas e 1 macho | - |

As coletas foram realizadas ao longo do desenvolvimento do projeto Rede de pesquisa para ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade de vertebrados da Amazônia brasileira com aplicações sobre seu uso e conservação – Rede BioPHAM, sob a licença do IBAMA (Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e com permissão do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, licença 10832-1 /35513-1).

No laboratório de campo, os indivíduos coletados foram eutanasiados via inalação de anestésico isoflurano para a retirada da medula óssea e preparação das suspensões celulares para os estudos citogenéticos, e para a coleta de amostras de tecido muscular, que foram armazenadas em microtubos com álcool comercial 96% para análise molecular. Os exemplares testemunhos foram identificados morfológicamente, sendo posteriormente taxidermizados ou fixados e armazenados em álcool 70%, visando sua deposição na Coleção de Mamíferos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Os procedimentos de análise das suspensões foram realizados através das técnicas citogenéticas clássicas e moleculares e realizados no Laboratório de Citogenômica Animal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para obtenção das preparações cromossômicas mitóticas utilizou-se o protocolo descrito por Ford e Harmerton (1956), com modificações relacionadas à colchicinização. Os animais foram mortos via inalação de anestésico isoflurano conforme instruções da Sociedade Norte-America de Mastozoologia, Animal Care and Use Committee, The American Society of Mammalogists (1998). A seguir os úmeros foram retirados e suas epífises cortadas para a obtenção da medula óssea.

A medula foi transferida do interior da diáfise umeral para cubetas de vidro, com o auxílio de seringas de 10 mL contendo solução hipotônica de KCl a 0,075M e 0,2 mL de colchicina diluída a 0,0125%. O material foi divulsionado, homogeneizado e mantido em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para que ocorresse a hipotonização das células a interrupção das divisões celulares em metáfase. Após este tempo, a solução foi transferida para tubos Falcon de 15 ml, e adicionado 1 mL de fixador Carnoy recém-preparado na proporção 3:1 (metanol: ácido acético), realizando-se uma nova homogeneização. Essa

solução foi centrifugada e teve seu sobrenadante desprezado. O *pellet* contendo a suspensão celular foi ressuspensionado em fixador. As fixações foram repetidas por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado fixador na proporção de 3:1 em relação à quantidade de sedimento, com nova homogeneização. Por fim o material foi transferido para um tubo de 1,5 ml devidamente identificado com o número do espécime e armazenado em freezer (-10 °C) para posterior análise.

Para a preparação das lâminas, as mesmas foram colocadas em solução sulfocrômica por 24 horas. Após este tempo, foram retiradas, lavadas em água corrente e destilada e armazenadas em álcool 100%. As lâminas foram imersas em água destilada a 50 °C, em banho-maria. Após 5 minutos, as mesmas foram retiradas da água, e a suspensão celular gotejada sobre três pontos diferentes desta lâmina. As lâminas secaram diretamente ao ar. Em seguida, foram coradas com Giemsa 5%, diluído em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8, por 10 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

3.2.2 Técnicas citogenéticas clássicas

Deteção das regiões organizadoras de nucléolo – RONS

Para a detecção das regiões organizadoras de nucléolo (RONS) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980). Sobre as lâminas, contendo a suspensão celular, foram adicionadas 2 a 3 gotas de uma solução coloidal de gelatina (2 g de gelatina comercial sem sabor, dissolvida em 100 mL de água destilada, acrescentando 1mL de ácido fórmico) e, sobre cada gota de gelatina, duas gotas de solução aquosa de nitrato de Prata (AgNO₃) a 50%, agitando-se levemente a lâmina. Esta foi coberta com lamínula e colocada em câmara úmida, em banho-maria a 60 °C, durante 3 a 8 minutos. Após o tempo apropriado, quando a lâmina adquiriu uma coloração marrom dourada, foi lavada em água destilada, permitindo que a lamínula fosse retirada naturalmente pela própria água e seca ao ar.

Deteção da heterocromatina constitutiva (Banda C)

Para a detecção da heterocromatina constitutiva (banda C) foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), que consistiu em tratar a lâmina preparada para cromossomos mitóticos com HCl 0,2N à 42 °C por 2 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada rapidamente em água destilada à temperatura ambiente e seca ao ar. Posteriormente foi incubada por 35 segundos em solução de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada a 42 °C. A ação do hidróxido de bário foi interrompida imergindo rapidamente a lâmina em solução de HCl 0,2N (temperatura ambiente) e lavada em água destilada. Após seca, a lâmina foi incubada em

solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trisódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60 °C, por 15 minutos, sendo lavada em água destilada e secas ao ar. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa (diluída a 5% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8) durante 10 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

Detecção da Banda G

Para a detecção da banda G foi necessário envelhecer a lâmina por 72h. Em seguida, a lâmina foi tratada em 2xSSC a 70°C por 15 segundos. O próximo passo foi interromper a ação com tampão fosfato pH6,8 e lavá-las em água destilada. Para corar, foi usado Giemsa a 5%, diluído em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8, por 5 minutos. Para finalizar, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas ao ar.

3.2.3 Técnicas citogenéticas moleculares

Extração de DNA

A extração de DNA foi a partir do tecido muscular/fígado da própria espécie, utilizando o protocolo básico de Sambrook e Russel (2001) com algumas modificações. Foram macerados aproximadamente 20 mg de tecido muscular e transferido para um tubo de volume de 1,5 mL. Adicionou-se 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM em pH 8,0, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM, Urea 4 M, SDS 1%) de Estoup *et al.* (1993) e Asahida *et al.* (1996). Posteriormente foram acrescentados: 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 6 µL de RNase (10 mg/mL). As amostras ficaram incubadas a 60 °C por aproximadamente 2 horas para que o tecido fosse totalmente digerido. Foram adicionados 100 µL de acetato de amônio 3M, 1 volume (600 µL) de fenol-clorofórmio (1:1) e agitado por inversão, por alguns minutos. Centrifugou-se por 30 minutos a 14.000 rpm em temperatura ambiente. A fase superior foi transferida para um novo tubo, adicionando-se 600 µL de clorofórmio e misturando, gentilmente, por alguns minutos, por inversão. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi acrescentado 100 µL de acetato de amônio 3M, 1 volume (600 µL) de isopropanol gelado e misturado gentilmente por inversão. Deixou-se precipitar a -20 °C por cerca de 14 horas. O material foi retirado do freezer e centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm, descartando o sobrenadante. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado, o pellet seco em estufa a 55 °C foi ressuscitado em 100 µL de TE 0,2X ou água milli-Q e foi deixado eluindo por 14 horas. Para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, o DNA extraído foi quantificado por

comparação com marcador de concentração conhecida, em eletroforese padrão (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 40 minutos) em gel de agarose 0,8% e corado com GelRed (Biotium). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador Easy Doc 100 (BioAgency), o qual possui acoplado um transluminador de luz ultravioleta (260 nM).

Isolamento de sequências repetitivas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e marcação por *nick translation*

As sondas de sequências repetitivas foram obtidas por amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Saiki *et al.*, 1988) utilizando o DNA genômico extraído dos músculos das espécies *Phylostomus elongatus*, *Carollia perspicillata*, *Desmodus rotundus* e *Artibeus obscurus* e os primers: - DNAr 18S (IpF 5'CCGCTTTGGTACTCTTGAT e IpR 5'CCGAGGACCTCACTAAACCA) (Gross *et al.*, 2010) - LINE-1 L1-F (5' - CCATGCTCATSGATTGG-3') e L1-R (5' -ATTCTRTTCCATTGGTCTA-3') (Waters *et al.*, 2004).

Para sequências teloméricas as amplificações foram feitas sem DNA com os seguintes primers: (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.*, 1991). Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas:

- a) 18S: 2 minutos a 94 °C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C (desnaturação), 1 minuto a 55 °C (ligação dos primers), 1 minuto e 40 segundos a 72 °C (extensão); 7 minutos a 72 °C (extensão final);
- b) Line 1: 2 minutos a 95 °C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C (desnaturação), 40 segundos a 55 °C (ligação dos primers), 2 minutos a 72 °C (extensão); 5 minutos a 72 °C (extensão final);
- c) Telomérica: a primeira parte da amplificação foi feita em baixa estringência: 4 minutos a 94 °C (desnaturação inicial), 12 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação), 45 segundos a 52 °C (ligação dos primers) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão); seguida por 35 ciclos de alta estringência: 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto e 30 segundos a 60 °C (ligação dos primers) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (extensão); 7 minutos a 72 °C (extensão final).

As reações de PCR foram feitas em um termociclador, para volume final de 15 µL (1 µL de DNA genômico (100 ng); 1,5 µL de Tampão 10X com cloreto de magnésio (1,5 mM); 0,15 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL); 3,0 µL de dNTP (1 mM); 0,6 µL de cada primer (5 mM); água milli-Q (para completar o volume).

Os produtos de PCR foram utilizados como sondas que foram marcadas pelo método de *nick translation* utilizando digoxigenina-11-dUTP (Dig-Nick Translation mix Roche). Para tanto, em um tubo eppendorf de 1,5 mL, foi preparada uma solução contendo 1 µL de Mix dNTP 10x; 1 µL do produto do PCR (200 ng/ µL); 1 µL de Mix de enzima 10x; 6 µL de água milli-Q, totalizando 9 µL para cada lâmina que foi hibridizada. Esta solução foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada a 16 °C por 90 minutos no termociclador. Em seguida, para interromper a reação foi adicionado 1 µL de *stop buffer* contendo 1 µL de acetato de sódio 3M e posteriormente foi mantida em freezer para posterior utilização.

Hibridização *in situ* por fluorescência

Foi utilizada a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) descrita por Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações. Foram utilizadas como sondas, sequências teloméricas, DNA ribossomal 18S e o elemento transponível Line 1 obtidos por PCR.

Tratamento das lâminas

As lâminas contendo cromossomos mitóticos foram lavadas em tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada. Depois, tratadas com 90 µL de RNase 10 µg/mL (5 µL de RNase 10 mg/mL e 975 µL de 2XSSC) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. As lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC durante 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS 1x durante 5 minutos.

Fixação

As lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente lavadas em PBS 1x por 5 minutos. Após, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada.

Pré-hibridização

As lâminas foram desnaturadas em formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e novamente desidratadas em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada. Solução de hibridização foi desnaturada a 99 °C por 10 minutos e transferida imediatamente ao gelo.

Hibridização

Foram colocados 40 μL de solução de hibridização sobre uma lamínula e a lâmina foi invertida sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (H_2O destilada) a 37 °C por cerca de 14 horas.

Lavagens

As lamínulas foram removidas das lâminas. Em seguida foram lavadas uma vez em formamida 15% a 42°C durante 10 minutos cada. Em seguida, foram lavadas novamente em solução Tween 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Detecção

As lâminas foram incubadas em tampão NFDM (*Non Fat Dry Milk*) por 15 minutos. Em seguida foram lavadas duas vezes com solução Tween 5% por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram colocadas sobre cada lâmina 20 μL de anti digoxigenina-rodamina. Em seguida foram cobertas com lamínula e deixadas por 60 minutos em câmara úmida com água destilada. Posteriormente as lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas três vezes em solução Tween 5% por 2 minutos a temperatura ambiente cada. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada. Ao final, esperou-se secar.

Montagem das lâminas

Foi adicionado a cada lâmina solução de DAPI diluído em antifade VectaShield Vector (20 μL de antifade e 3 μL de DAPI).

3.2.4 Análise cariotípica

Após a análise e contagem dos cromossomos ao microscópio óptico foi estabelecido o número diploide. As melhores metáfases obtidas com as técnicas clássicas (Giemsa, RON, banda C e banda G) foram fotografadas, com objetiva de imersão em microscópio óptico Zeiss AX10. As lâminas submetidas a técnicas moleculares (FISH) foram analisadas e capturadas em um fotomicroscópio de epifluorescência LEICA, em objetiva de imersão. Para a montagem dos cariótipos foi utilizado o programa Adobe Photoshop 7.0, versão CS6. Os cromossomos foram medidos, utilizando o programa livre ImageJ. A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com os critérios de relação de braços ($\text{RB}=\text{BM}/\text{Bm}$, onde BM = braço maior e Bm = braço menor) segundo Levan *et al.* (1964). Para uma melhor comparação e entendimento da organização cromossômica, os cariótipos foram organizados

em ordem decrescente e separados por categorias, tais como usado em outros grupos de vertebrados, sendo metacêntricos (m), que apresentam $RB=1,00$ a $1,70$, submetacêntricos (sm) $RB=1,71$ a $3,00$, subtelocêntricos (st) $RB=3,01$ a $7,00$ e acrocêntricos (a) $RB > 7,00$. O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se os metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como tendo dois braços e acrocêntricos como tendo apenas um braço e sem contabilizar os braços dos cromossomos sexuais.

4. Resultados

4.1 Coloração convencional

As espécies *Artibeus obscurus* e *Carollia perspicillata* apresentaram sistema múltiplo de cromossomos sexuais do tipo XX/XY₁Y₂, enquanto que *Desmodus rotundus* e *Phyllostomus elongatus* apresentaram sistema simples do tipo XX/XY. Nos sistemas múltiplos os cromossomos sexuais X são subteloentrícos, enquanto o Y₁ é acrocêntrico e o Y₂ puntiforme (Figuras 3a, 3b). Já no sistema simples de determinação do sexo os cromossomos sexuais X são submetacêntricos e os Y puntiformes (Figuras 3c, 3d).

Artibeus obscurus apresentou número fundamental igual a 56 e número diploide igual a 2N=30/31, sendo a fórmula cariotípica igual a 22m+6st+XX/XY₁Y₂ (Figura 3a). *Carollia perspicillata* apresentou número fundamental igual a 36 e número diploide igual a 2N=20/21, sendo a fórmula cariotípica igual a 14m-sm+4st+XX/XY₁Y₂ (Figura 3b). Em *Desmodus rotundus* o número fundamental foi igual a 52 e número diploide igual a 2N=28, com fórmula cariotípica igual a 26m-sm+XX/XY (Figura 3c). Para *Phyllostomus elongatus* foi evidenciado número fundamental igual a 60 e número diploide igual a 32 cromossomos, com fórmula cariotípica igual a 28m-sm+2a+XX/XY (figura 3d).

Nenhuma diferença intraespecífica foi evidenciada entre indivíduos de diferentes localidades.

4.2 Padrão de Heterocromatina Constitutiva

O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva revelou marcação na região pericentromérica de todos os cromossomos das quatro espécies analisadas, com exceção dos pares 8 e 9 de *Carollia perspicillata* e 13, 14 e 15 de *Phyllostomus elongatus* (Figura 4). Contudo, marcações na região intersticial foram evidenciadas para *Artibeus obscurus* nos pares 1, 2, 3, 6; *Carollia perspicillata* no par 1; *Desmodus rotundus* no par 6 (Figuras 4a, 4b, 4c). Marcações na região terminal nos cromossomos dos pares 5, 6 e 7 foram evidenciadas em *Artibeus obscurus* e em *Carollia perspicillata* nos pares 2, 3 e X; os cromossomos sexuais Y apresentaram-se heterocromáticos em *Desmodus rotundus* e *Phyllostomus elongatus* (Destaque das figuras 4c e 4d).

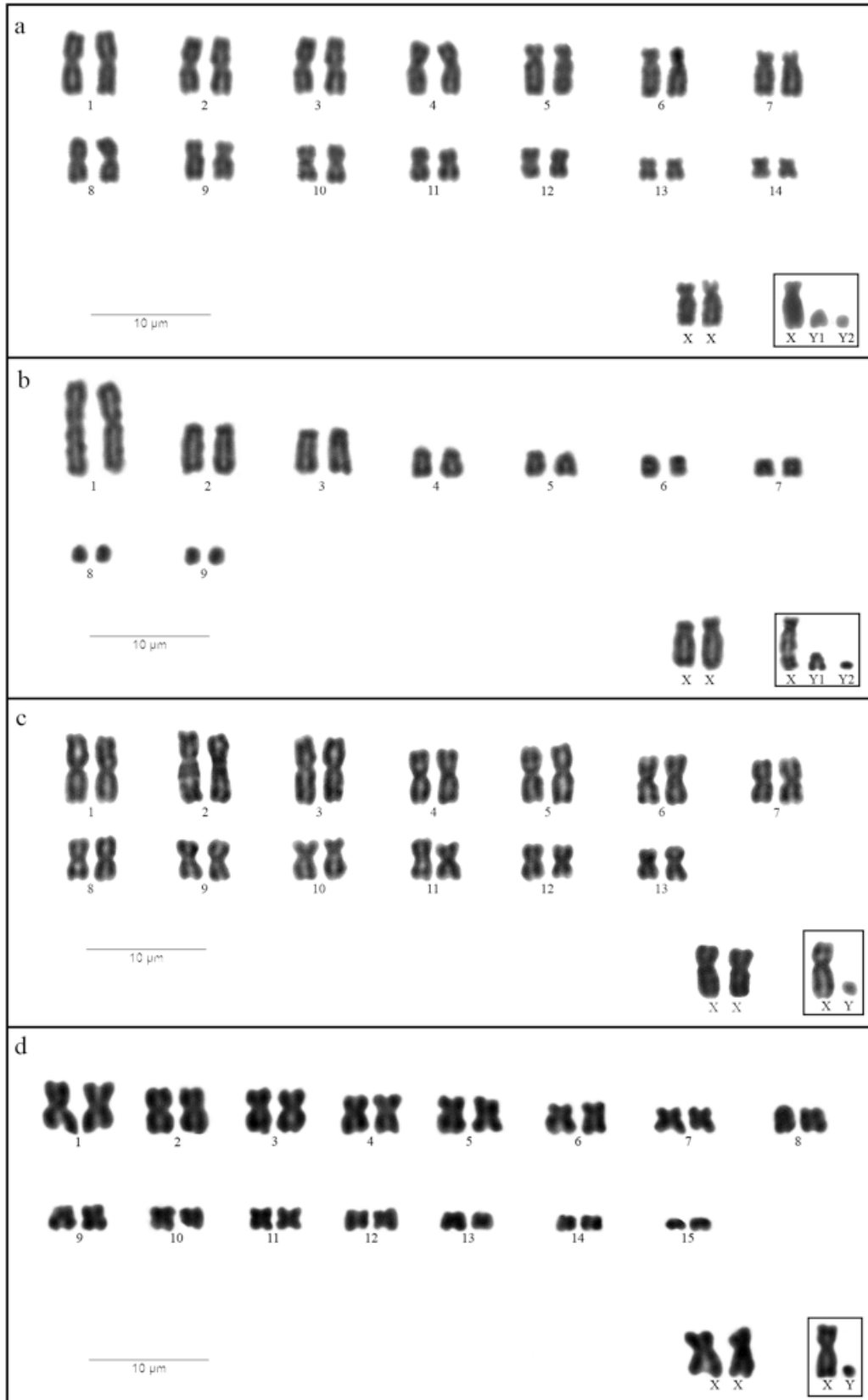


Figura 3. Cariótipos de fêmeas em coloração convencional: a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*. Em destaque nos quadrados os cromossomos sexuais dos machos.

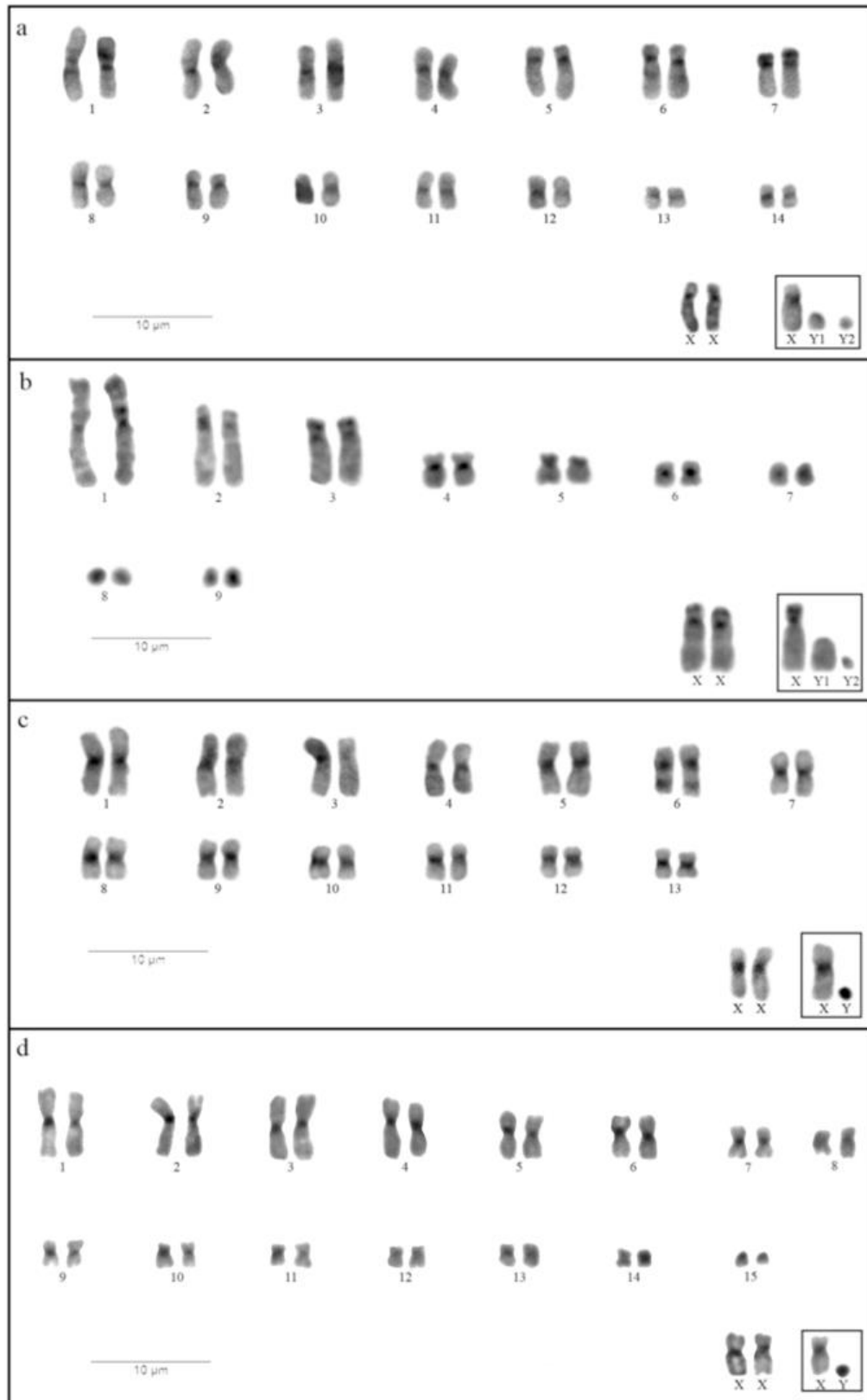


Figura 4. Padrões de distribuição de heterocromatina em cromossomos mitóticos de fêmeas: a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*. Em destaque nos quadrados os cromossomos sexuais dos machos.

4.2 Sítios de DNA ribossomal 18S e Regiões Organizadoras de Nucléolo

Para *Artibeus obscurus* sítios de DNA ribossomal 18S foram localizados na região terminal dos pares 5, 6 e 7, sendo que a impregnação com nitrato de prata revelou de duas a quatro regiões organizadoras de nucléolos ativas (Figura 5a). Em *Carollia perspicillata* o sítio de DNA ribossomal 18S foi localizado na região pericentromérica do cromossomo X de todos os indivíduos. A impregnação com nitrato de prata também revelou marcação no cromossomo sexual X de todos os indivíduos analisados (Figura 5b). Para *Desmodus rotundus* o sítio de DNA ribossomal 18S foi localizado na região centromérica do cromossomo do par 8. A impregnação com nitrato de prata também revelou marcação no mesmo par (Figura 5c). Para *Phyllostomus elongatus* o sítio de DNA ribossomal 18S foi localizado na região centromérica/terminal do cromossomo do par 15. A impregnação com nitrato de prata também revelou marcação no mesmo par (Figura 5d).

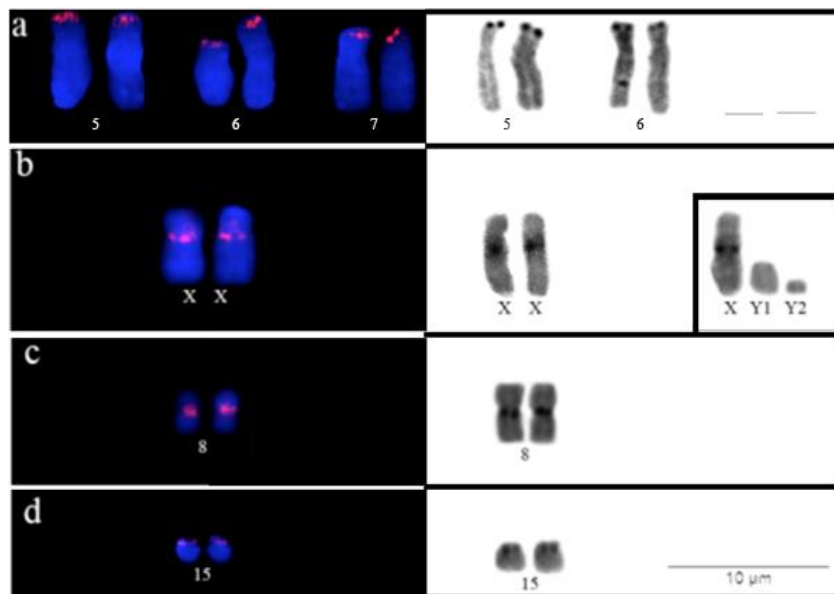


Figura 5. Cromossomos portadores de sítios de DNA ribossomal 18S à esquerda (sinais em vermelho) e regiões organizadoras de nucléolo ativas impregnadas com nitrato de prata à direita: a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*. Em destaque nos quadrados os cromossomos sexuais dos machos.

4.3 Telômeros

Marcações teloméricas bem evidentes foram visualizadas em *Desmodus rotundus* e *Phyllostomus elongatus*, enquanto que em *Artibeus obscurus* e *Carollia perspicillata* as marcações terminais são muito tênues, às vezes imperceptíveis (Figura 6). Sítios teloméricos

intersticiais foram observados em: *Artibeus obscurus* nos pares 5, 6, 7 e 10 (Figura 6a); *Carollia perspicillata* nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 (Figura 6b); e em *Desmodus rotundus* nos pares 1, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 e no X (Figura 6c).

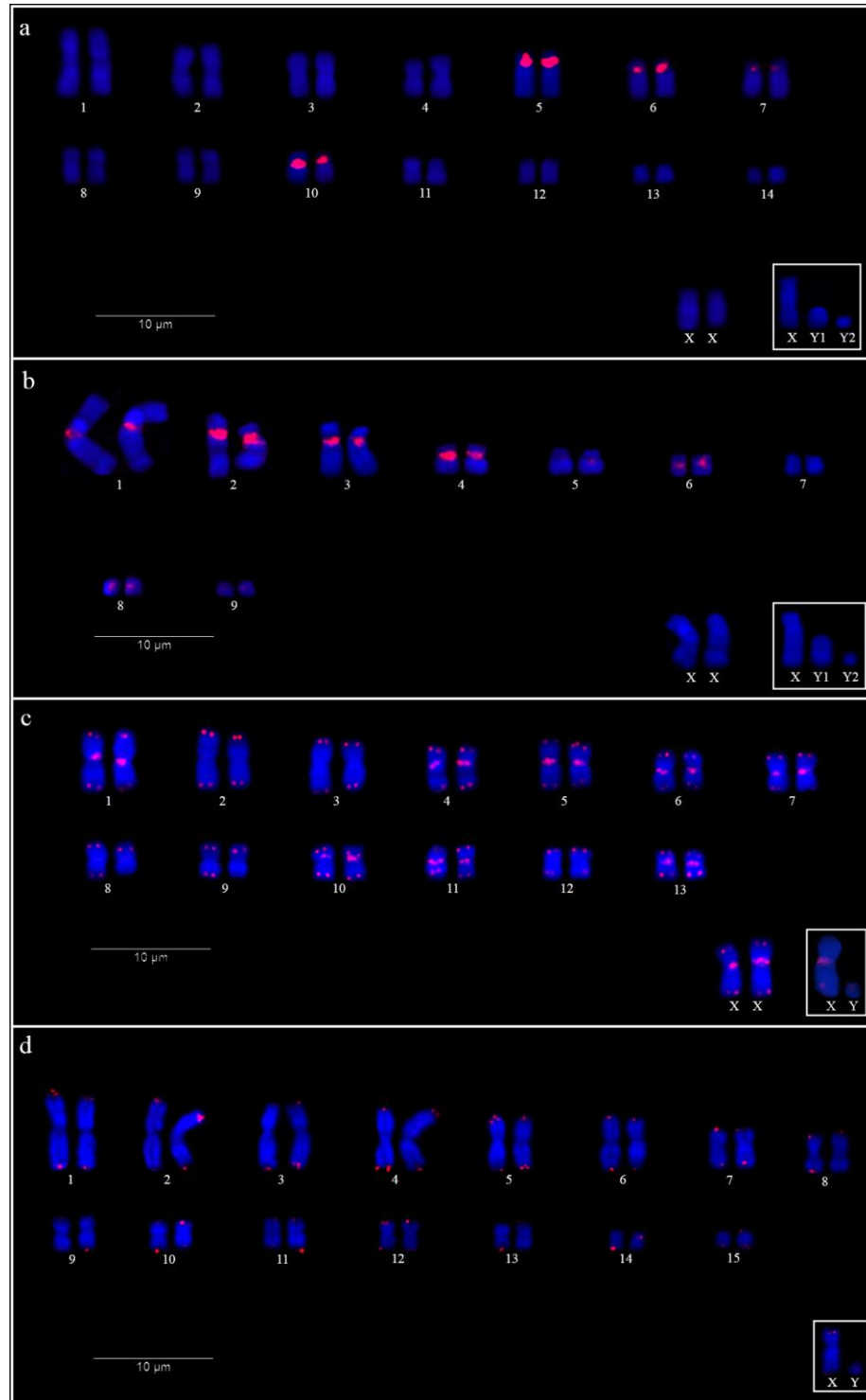


Figura 6. Localização física cromossômica de sequências teloméricas de DNA (sinais em vermelho) em cariótipos de indivíduos machos. a. *Artibeus obscurus*, b. *Carollia perspicillata*, c. *Desmodus rotundus*, d. *Phyllostomus elongatus*.

4.4 Line 1 e Banda G

Em *Artibeus obscurus* o retroelemento Line 1 apresentou revelou marcação dispersa nos pares 5, 6, 13 e no X, enquanto que nos pares 1, 2, 7, 10, 12 e 14 percebem-se marcações centroméricas e intersticiais que coincidem com os padrões de bandas escuras evidenciados na banda G (Figura 7 a, b). Para *Carollia perspicillata* marcações dispersas foram evidenciadas em todos os pares cromossômicos, coincidindo com marcações escuras da banda G (Figura 7 c, d).

Em *Desmodus rotundus* marcação dispersa foi evidenciada nos pares 10, 12, 13. Nos pares 1, 2, 3, 4, 6, 7 e 9 houve marcações centroméricas e intersticiais. Já no cromossomo X houve concentração desde marcador no braço longo, região homóloga ao Y. As regiões onde o Line 1 é mais compartimentalizado coincidem com marcações escuras da banda G (Figura 8 a,b). Já *Phyllostomus elongatus* apresentou marcação dispersa nos pares 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14. No par 15 houve compartimentalização na região telomérica e no cromossomo X marcação relativamente dispersa com maior compartimentalização na região centromérica. Os padrões de bandeamento observados coincidem com marcações escuras da banda G (Figura 8 c,d).

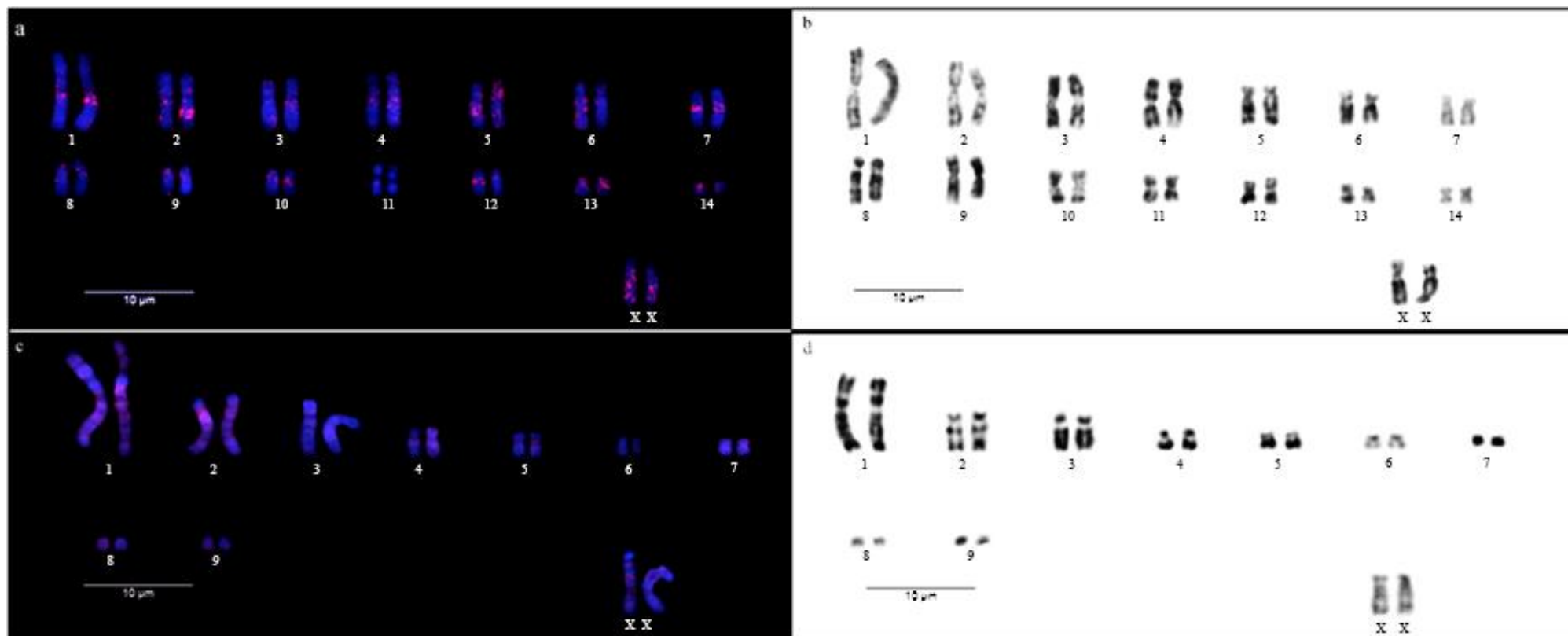


Figura 7. Padrão de distribuição de Line 1 (a,c – marcações em vermelho) e bandamento longitudinal G (b, d) em cromossomos mitóticos das fêmeas de: a-b. *Artibeus obscurus*; c-d. *Carollia perspicillata*.

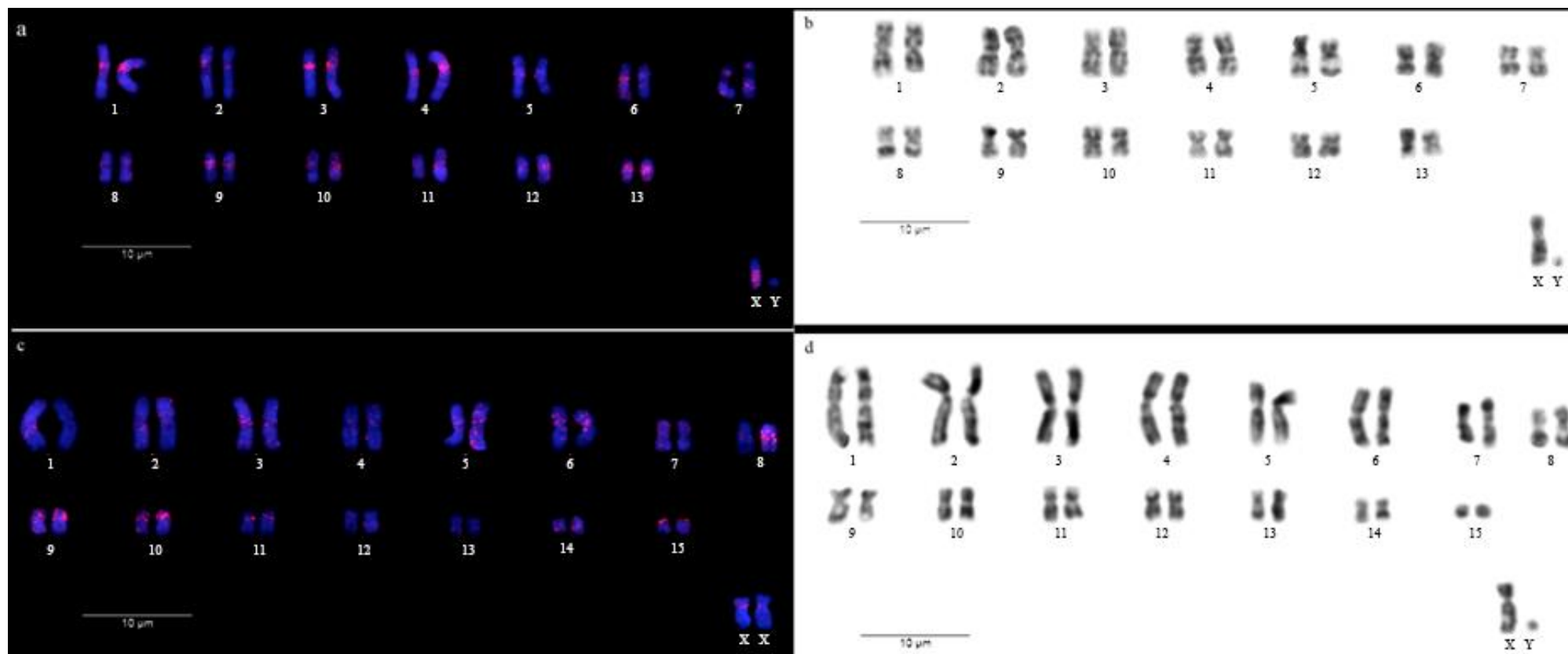


Figura 8. Padrão de distribuição de Line 1 (a,c – marcações em vermelho) e bandamento longitudinal G (b, d) em cromossomos mitóticos de: a-b. *Desmodus rotundus*; c-d. *Phyllostomus elongatus*.

5. Discussão

Apesar dos morcegos apresentarem potencial de possuírem espécies crípticas, cuja semelhança morfológica faz com sejam classificados como uma única espécie nominal (Bickford *et al.*, 2007; Ceballos e Ehrlich, 2009), as espécies nominais analisadas no presente trabalho não apresentaram variações cariotípicas entre ou dentro das localidades que indicassem a presença de espécie críptica. Além disso, todos os exemplares analisados possuem estrutura cariotípica similar ao já descrito na literatura para indivíduos coletados em Veracruz, Letícia, Restrepo, Amazonas e Pernambuco (Baker, 1967; Baker e Bleier, 1971; Baker, 1979; Cadena e Baker, 1976; Baker *et al.*, 1982; Lemos-Pinto; 2005; 2012; Souza *et al.*, 2011).

O cariótipo de *Macrotus waterhousii* (Macrotinae), com $2n=46$ cromossomos (16 meta-submetacêntricos, 28 acrocêntricos mais dois sexuais), é considerado como primitivo para os Phyllostomidae, existindo tendência no grupo à diminuição do número diploide por fusões Robertsonianas, com o X se mantendo em condição conservada (Baker *et al.*, 1987; Patton e Baker, 1978; Baker, 1973; Baker 1979).

Em relação ao sistema de determinação do sexo, as espécies *Desmodus rotundus* (Desmodontinae) e *Phyllostomus elongatus* (Phyllostominae) apresentam sistema simples XY e *Artibeus obscurus* (Sternodermatinae) e *Carollia perspicillata* (Carollinae) apresentam XY_1Y_2 . Sternodermatinae é clado irmão de Carollinae, sendo o primeiro derivado. Ambos, juntamente com Lonchophyllinae e Glossophaginae pertencem a clado irmão do clado que agrupa Phyllostominae e Desmodontinae (Datzmann *et al.*, 2010). Na subfamília Stenodermatinae e Glossophaginae são observados sistemas de cromossomos sexuais do tipo XX/XY, XX/ XY_1Y_2 e Neo XX/XY, sendo o último derivado do sistema múltiplo, resultado da fusão entre Y1 e Y2. Sistema múltiplo XX/ XY_1Y_2 é tipicamente observado em Carollinae e sistema sexual simples XX/XY é observado em espécies das subfamílias Lonchorhinae, Macrotinae, Micronycterinae, Phyllostominae, Desmodontinae, Rhinophyllinae, Lonchophyllinae (Tucker, 1986; Lemos-Pinto, 2005; 2012; Santos *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005; Pagnozzi *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010; 2011; Moreira *et al.*, 2009; Estevam *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2000; Vollet *et al.*, 1999; Silva, 2001; Calixto, 2008).

O sistema sexual múltiplo em morcegos é considerado derivado e provavelmente originou-se a partir de translocações entre autossomos e o cromossomo X, em que um dos

autossomos se fusionou ao braço curto do X e seu respectivo homólogo (Y2) passou a integrar o sistema de determinação sexual, juntamente com o Y original (Y1) (Tucker, 1986; Rodrigues *et al.*, 2003). Além disso, variação geográfica envolvendo os cromossomos sexuais foi observada em representante da subfamília, tais como *A. cinereus*, que apresentou $2n=30, XX$ e $2n=31, XY_1Y_2$ em espécimes provenientes de Trinidad (Tucker, 1986) e $2n=30$ para ambos os sexos em indivíduos provenientes de Pernambuco (Souza e Araújo, 1990) e Belém do Pará (Noronha, 2000), Brasil, representando o sistema composto do tipo neo-XY.

Ainda analisando cromossomos sexuais, Hsu *et al.* (1968) propuseram que evolutivamente as espécies derivadas *Carollia perspicillata* e *Artibeus obscurus* passaram por eventos diferentes que originaram o sistema sexual múltiplo, apesar de fusões do tipo Robertsonianas serem suportadas em ambos. Segundo os autores, *C. perspicillata* possui um autossomo fundido ao X e em *Artibeus* o Y_1 e o Y_2 passaram por várias mudanças, dentre elas o encurtamento do Y e a perda da região organizadora de nucléolo que originalmente estaria na no braço curto de X. Ou seja, a origem dos cromossomos sexuais ocorreu de maneira independente. Em relação às espécies com sistema simples, o Y apresentou-se heterocromático, provavelmente, devido à presença de poucos genes funcionais e por estar presente em espécies basais.

Análises imunológicas e morfológicas indicam que morcegos hematófagos ocupam uma posição filogenética basal em relação às outras linhagens Phyllostomidae e que Desmondontinae compartilha um ancestral comum com Phyllostominae (Baker *et al.*, 1989). Contudo, *Phyllostomus elongatus* que não é hematófago apresentou características cariotípicas que podem ser consideradas basais (presente trabalho), incluindo ausência de marcação telomérica intersticial (ITS), condição que para alguns autores é indicativa da condição mais antiga de uma espécie, sendo que espécies basais possuiriam sequências teloméricas apenas nas extremidades dos cromossomos (Baker e Bickham, 1980). Em contrapartida, a espécie hematófaga *Desmodus rotundus*, que ocupa posição basal nas árvores filogenéticas (Baker *et al.*, 2003; Datzmann *et al.*, 2010) apresentou sítios teloméricos e intersticiais conspícuos e maior proporção destes em relação às outras espécies, podendo assim representar sinais de fusões (presente trabalho).

Porém, a presença de ausência de sítios teloméricos intersticiais não é suficiente para inferências filogenéticas, uma vez que não se pode descartar a possibilidade de que pequenos resíduos de sequências teloméricas intersticiais escapem da detecção por FISH. Além disso,

se os rearranjos cromossômicos forem antigos, os telômeros intersticiais podem ter sido perdidos durante os processos moleculares de compactação do genoma (Mandrioli *et al.*, 1999; Multani *et al.*, 2001), tal como é notado em *Carollia perspicillata*, que tem o cromossomo X permanentemente fundido com um autossomo e não possui sítios de sequências telomérica intersticiais (presente trabalho).

Já as espécies que ocupam posição filogenética derivada (*Carollia perspicillata* e *Artibeus obscurus*) não apresentaram sinais teloméricos detectáveis na porção terminal dos cromossomos, apesar de marcações intersticiais serem bastante evidentes, podendo ser considerada uma condição derivada para filostomídeos (presente trabalho). Esta ausência de sítios teloméricos nas extremidades dos cromossômicos já foi observada previamente para *Carollia perspicillata* (Faria e Morielle-Versute, 2002; Multani *et al.*, 2001) e pode ser explicada por diversos mecanismos que ocasionariam pequenos resíduos dos telômeros que não poderiam ser detectados pela FISH, tais como: i) a redução do número de repetições (TTAGGG)_n no genoma; ii) inativação dos telômeros e processo de erosão molecular das sequências teloméricas; iii) proteção pelo complexo Shelterin (Mandrioli *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 2002; Revaud *et al.*, 2009; DeBaryshe e Pardue, 2011; Bolzán, 2012; Wood *et al.*, 2015). Ainda, esses diferentes mecanismos não implicariam necessariamente na perda total das sequências teloméricas, ocorrendo somente o encurtamento do telômero (Bolzán, 2012). Este tipo de resultado já foi descrito para uma espécie de morcego da família Molossidae, onde foi identificada a ausência de marcações nas extremidades dos cromossomos de *Eumops auripendulus* (Faria *et al.*, 2009).

Semelhante ao que foi observado em *Carollia perspicillata*, *Artibeus obscurus* apresentou fraco sinal telomérico e intenso sinal telomérico intersticial (presente trabalho). Os ITSs têm sido considerados indicativos de rearranjos cromossômicos durante a evolução, contudo existem dois tipos diferentes: os ITS-curtos (s-ITSs) e os ITS-heterocromáticos (het-ITSs). Os ITSs curtos são pequenas repetições teloméricas localizadas em posições intracromossômica e não necessariamente estão associado a rearranjos cromossômicos, uma vez que podem ter sido inseridos pela enzima telomerase durante o reparo do DNA (Farré *et al.*, 2009). Além disso, estes ITS parecem estar associados com a presença de elementos retrotransponíveis (Azzalin *et al.*, 2001). Já os ITSs-heterocromáticos, são repetições teloméricas localizadas em blocos heterocromáticos, preferencialmente em regiões centroméricas e pericentroméricas (Ruiz-Herrera *et al.*, 2008; Rovatsos *et al.*, 2015).

Para *Artibeus obscurus* (pares 5, 6, 7 e 10), *Carollia perspicillata* (todos os pares exceto o par 7 e os cromossomos sexuais) e *Desmodus rotundus* (pares 11, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 13 e no X) o bandeamento C corresponde às regiões de sítios teloméricos intersticiais, que podem não necessariamente referir-se a rearranjos cromossômicos e sim ao fato de $(TTAGGG)_n$ ser um constituinte de DNA altamente repetitivo, tal como observado no anuro *Xenopus* (Nanda *et al.*, 2008).

Para a família Phyllostomidae a localização preferencial das regiões de heterocromatina constitutivas está evidenciada região centromérica/pericentromérica, mas também é evidente em locais intersticiais. Variações intragenéricas na distribuição de heterocromatina são descritas apenas em casos esporádicos na família Phyllostomidae, porém para o gênero *Artibeus* a localização das regiões heterocromáticas serve como marcador na diferenciação das espécies e marcações na região terminal dos pares 5, 6 e 7 é uma característica compartilhada com o grupo (Lemos-Pinto *et al.*, 2012). Para *Carollia perspicillata*, ocorre marcação intersticial no par 1 (Moreira *et al.*, 2009), mas além das regiões pericentroméricas houve marcação terminal nos pares 2, 3 e X (presente estudo). Para *Desmodus rotundus*, Santos *et al.* (1999) revelaram apenas marcações pericentroméricas, e para as espécies analisadas (presente estudo) houve também marcação intersticial no par 6. Para *Phyllostomus elongatus*, as marcações foram observadas na região pericentromérica de todos os pares (Estevam *et al.*, 2005), mas no presente estudo houve ausência de marcação nos pares 13, 14 e 15.

Para *Artibeus obscurus* (pares 1, 5, 7, 10,12 e X), *Carollia perspicillata* (pares 1, 2 e X), *Desmodus rotundus* (pares 1, 3, 4, 9 e 13) e *Phyllostomus elongatus* (cromossomo X), as regiões heterocromáticas também coincidem com marcações do retroelemento LINE-1. De maneira geral, regiões heterocromáticas são ricas em elementos transponíveis e, muitas vezes o acúmulo destas sequências dispara o processo de heterocromatinização visando o silenciamento das mesmas (Selker, 2002). Apesar do elemento transponível LINE- 1 ser encontrado abundantemente no genoma dos mamíferos (Waters *et al.*, 2004; Graham e Boissinot, 2004; Han e Boeke, 2005; Acosta *et al.*, 2008; Chueh *et al.*, 2009;) e influenciar na organização e função do genoma (Lander *et al.*, 2001; Kazazian, 2004), a associação entre heterocromatina e Line 1 não é direta. Diversas espécies de mamíferos possuem deposição deste elemento em regiões eucromáticas (Parish *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2004), enquanto em outras estão em região heterocromáticas (Henikoff e Malik, 2002; Waters *et al.*, 2004).

Para as espécies analisadas no presente trabalho observou-se compartimentalização Line 1 em regiões positivas para o bandejamento G (faixas escuras), bem como em cromossomos sexuais X, apesar da distribuição ser prevalentemente aleatória. Este padrão foi observado para outros grupos de mamíferos (Korenberg e Rykowski, 1988; Boyle *et al.*, 1990; Wichman *et al.*, 1992). Entretanto, outros estudos tem demonstrado relação com a idade da invasão deles elementos no genoma, sendo que quando as inserções são antigas (>80-100 milhões de anos) estão alocadas em regiões banda G escuras e invasões mais recentes (<1 milhão de anos) são aleatórias no genoma do hospedeiro (Lander *et al.*, 2001; Ovchinnikov *et al.*, 2001), o que indicaria que os Line 1 estão no genoma das espécie analisadas a milhões de anos, não estando necessariamente ativas no momento.

Ainda, de acordo com Boissinot *et al.* (2001), regiões cromossômicas com pouca recombinação seria local de acumulação de LINE-1, sendo esperado uma maior deposição deste elemento no cromossomo Y quando comparado a outras porções genômicas. Porém, os cromossomos Y das espécies analisadas no presente trabalho apresentam menores quantidades de sinais de hibridização de LINE-1 quando comparado ao cromossomo X, sugerindo assim que está ocorrendo uma menor acumulação deste elemento no cromossomo Y, tais como verificado para outras espécies de mamíferos (Waters *et al.*, 2004).

Assim como nas espécies analisadas no presente trabalho, Parish *et al.* (2002) ao analisarem o elemento transponível Line 1 em *C. brevicauda* também revelaram acumulação deste elemento no cromossomo X. O acúmulo do elemento Line 1 no cromossomo sexual X revela compatibilidade com a hipótese de Lyon, sendo que a acumulação pode estar relacionada com a inativação de um dos cromossomos X nas fêmeas para promover o silenciamento gênico e garantir dosagem gênica do par sexual quando comparado com os machos. Lyon (1998) sugere que elementos repetitivos intercalados do tipo Line 1 no cromossomo X atuam como elementos de reforço para promover a disseminação de Xist RNAm, pois o contato com esse RNA faz com que os elementos Line sejam percebidos pela célula por um sistema que silencia genes induzidos por repetição, levando ao silenciamento deles e as sequências únicas, entretanto, pela sua conversão a heterocromatina (Chow *et al.*, 2010).

Contudo a composição da heterocromatina é diferente entre as espécies analisadas, pois em *Artibeus obscurus*, *Carollia perspicillata* e *Desmodus rotundus* em regiões heterocromáticas também são encontrados sítios de DNA ribossomal. Para Barros *et al.*

(2009) isso indicaria a heterogeneidade da composição de regiões intergênicas relacionadas com RONS entre as espécies da família Phyllostomidae e o fato de coincidirem com regiões heterocromáticas, isto sugere que seja uma forma de proteção dos sítios (presente estudo).

De maneira geral, os sítios de DNAr 18S e as RONS têm sido evidenciadas em apenas um par cromossômico na maioria das espécies de morcegos, o que tem sido considerada como uma condição ancestral na família Phyllostomidae. Esta característica é observada em indivíduos da subfamília Macrotinae, considerada primitiva, e nos noctilionídeos, que compreendem um grupo externo, estritamente relacionado a esta família (Pinto, 2007). A ocorrência de RONS múltiplas tem sido descrita em algumas espécies da subfamília Stenodermatinae, cuja característica mais frequente é a sua presença em 3 a 4 pares autossômicos (Morielle-Versute e Varella-Garcia, 1988; Santos e Souza, 1998, Santos *et al.*, 2001; 2002). Esta variação intrafamiliar é explicada por Baker *et al.* (1992) porque morcegos possuem mecanismos de amplificar DNA repetitivos no genoma e movê-los entre cromossomos não homólogos, por meio de translocações, característica também atribuída a outros grupos. Por isso, duas hipóteses ocorrem para a redução do número de sítios de DNA ribossomal e a redução desta variação em morcegos: a primeira consiste em que morcegos possuem um genoma de tamanho pequeno e tem menor número de sítios, condição primitiva; a segunda é que e morcegos tem mecanismos de aumentar o tamanho do genoma, através de amplificação e movimento intragenômico de repetições em tandem, elementos transponíveis e ou DNA próprios, mas nos morcegos o balanço destes mecanismos favorece fortemente a redução do tamanho do genoma (Baker *et al.* 1992).

Em *Artibeus obscurus* o sítio ribossomal 18S apresenta localização na região terminal que coincide com sítios teloméricos, condição também observada por Faria *et al.* (2009). Alguns autores acreditam que a ocorrência de um par de RON localizada em constrições secundárias parece ser uma condição ancestral entre os morcegos Phyllostomidae (Morielle e Varella-Garcia, 1988; Santos *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2009). Porém Faria *et al.* (2009), ao analisar espécies da família Molossidae e Phyllostomidae, encontraram sinais de hibridação em regiões teloméricas de cinco pares de autossomos subtelocêntricos em *Cynomops abrasus*, em pares em três *Molossops temminckii*, e em um par de *Nyctinomops laticaudatus* e *Phyllostomus discolor* que são coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolo (RONS). Ou seja, ocorrem diferenças da condição basal de acordo com a família de

Microquiróptero, uns com mais de um par e outros com apenas um par de sítios de DNAr 18S como condição basal.

Assim, o mapeamento físico cromossômico de sequências repetitivas de DNA evidenciou que estas estão relacionadas a diversificação cariotípica, com padrão de organização diferencial entre os táxons de diferentes clados.

6. Conclusão

As espécies basais apresentam sinais conspícuos de marcação telomérica, enquanto que nas derivadas estes sinais estão ausentes ou fracos. Ainda, os ITS não estão restritos apenas às espécies derivadas.

As RONS múltiplas estão presentes em espécies derivadas e, em alguns grupos estão alocadas em cromossomos sexuais X, sendo que espécies basais apresentam sistema simples de determinação do sexo, enquanto que as derivadas apresentam sistema múltiplo ou neo XY.

Regiões heterocromáticas apresentam composição nucleotídica diferencial, estando em algumas espécies relacionadas com o retroelemento LINE-1, sítios teloméricos intersticiais e sítios de DNAr 18S.

Em relação ao retroelemento Line-1, este está alocado de maneira dispersa, porém marcações mais evidentes estão em regiões de banda G positivas, indicando invasão antiga nos genomas destas espécies. Nas espécies derivadas ocorre seu acúmulo no cromossomo X de modo mais disperso.

7. Referências bibliográficas

Acosta, M.J.; Marchal, J.A.; Fernández-Espartero, C.H.; Bullejos, M.; Sánchez, A. 2008. Retroelements (LINEs and SINEs) in vole genomes: Differential distribution in the constitutive heterochromatin. *Chromosome Research*, 16: 949-959.

Altringham, J.D. 1996. *Bats, Biology and Behaviour*. Oxford. Oxford University Press.

Asahida, T.; Kobayashi, T.; Saitoh, K.; Nakayama, I. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science* 62(5): 727-730.

Azzalin, C.M.; Nergadze, S.G.; Giulotto, E. 2001. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma*, 110:75–82, DOI 10.1007/s004120100135.

Baker, R. J. 1967. Karyotypes of bats of the family Phyllostomidae and their taxonomic implications. *Southwestern Naturalist* 12(4):407-428.

Baker, R. J. 1970. The role of karyotypes in phylogenetic studies of bats. Pp. 303-312 in *About bats* (B. H. Slaughter and D. W. Walton, eds.). Southern Methodist University Press, Dallas, Texas.

Baker, R. J.; Bleier, W. J. 1971. Karyotypes of bats of the subfamily Carolliinae (Mammalia: Phyllostomatidae) and their evolutionary implications. *Experientia* 27:220-222.

Baker, R. J. 1973. Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomatidae). *Periodicum Biologorum* 75(1):37-45.

Baker, R. J. 1979. Karyology. Pp. 107-155 in *Biology of bats of the New World Family Phyllostomatidae, Part III* (R. J. Baker, J. K. Jones, Jr., and D. C. Carter, eds.). Special Publications, Museum of Texas Tech University 16:i+1-441.

Baker, R. J.; Bickham, J. W. 1980. Karyotypic evolution in bats: Evidence of extensive and conservative chromosomal evolution in closely related taxa. *Systematic Zoology* 29(3):239-253.

Baker, R. J.; Haiduk, M. W; Robbins, L. W; Cadena, A.; Koop, B. F. 1982. Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. Pp. 303-327 in *Mammalian biology in South America* (M. A. Mares and H. H. Genoways, eds.). Special Publication Series, Pymatuning Laboratory of Ecology VI.

Baker, R. J.; Qumsiyeh, M.G.; Hood, C.S. 1987. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. In. *GENOWAYS*, H. H., (ED). Current mammalogy. Plenum Press, New York, pp.67-96.

Baker, R. J.; Hood, C.S.; Honeycutt, R.L. 1989. Phylogenetic relationships and classification of the higher categories of the New World bat family Phyllostomidae. *Syst. Zool.*, v. 38, p. 228-238.

Baker, R. J.; Maltbie, M.; Owen, J. G.; Hamilton, M. J.; Bradley, R. D. 1992. Reduced number of ribosomal sites in bats: Evidence for a mechanism to contain genome size. *Journal of Mammalogy* 73(4):847-858.

Baker R.J.; Hooper, S.R.; Porter, C.A.; Van Den Bussche, R.A. 2003. Diversification among New World leaf-nosed bats: An evolutionary hypothesis and classification inferred from digenomic congruence of DNA sequence. *Occas Papers Mus, Texas Tech Univ* 230:i+1-32.

Barros, H.M.R.; Sotero-Caio, C.G.; Santos, N.; Souza, M.J. 2009. Comparative cytogenetic analysis between *Lonchorhina aurita* and *Trachops cirrhosus* (Chiroptera, Phyllostomidae). *Genetics and Molecular Biology*, 32, 4, 748-752.

Bernard, E.; Tavares, V.C.; Sampaio, E. 2011. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotrop.* 11(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/pt/abstract?article+bn00611012011>.

Bernard, P. 2012. In: *Mamíferos do Brasil: Genética, Sistemática, Ecologia e Conservação*, vol II. (ed: T.R.O. Freitas & E.M. Vieira). Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Mastozoologia, ISBN 978-85-63705-01-3, p. 19-35.

Bickford, D.; Lohman, D.J.; Sodhi, N.S.; Ng, P.K.L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K.K.; Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Volume 22, Issue 3, Pages 148-155.

Boissinot, S.; Entezam, A.; Furano, A. V. 2001. Selection against deleterious LINE-1-containing loci in the human lineage. *Molecular Biology Evolution* 18:926-935.

Bolzán, A.D. 2012. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*, vol. 27 no. 1 pp. 1-15.

Boyle, A.L.; Ballard, S.G.; Ward, D.C. 1990. Differential distribution of long and short interspersed element sequences in the mouse genome: Chromosome karyotyping by fluorescence in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Genetics*, Vol. 87, pp. 7757-7761.

Brass, D. A. 1994. *Rabies in bat, Natural history and public health implications*. Ridgefield: Livia Press, 352p.

Brusco, A.R.; Tozato, H.C. 2009. Frugivoria na dieta de *Artibeus lituratus* olfers, 1818 (Chiroptera, Phyllostomidae) no Parque do Ingá, Maringá/Pr. *Revista F@ciência*, Apucarana-PR, ISSN 1984-2333, v.3, n. 2, p. 19 - 29.

Cadena, A.; Baker, R. J. 1976. Cariotipos de los murciélagos vampiros (Chiroptera: Desmodinae). *Caldasia* 11(54):159-163.

Calixto, M.S. 2008. Análise citogenética comparativa entre *Glossophaga soricina*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium* (Phyllostomidae, Chiroptera). Pernambuco.

Calixto, M.S.; Andrade, I.S.; Cabral-de-Melo, D.C.; Santos, N.; Martins, C.; Loreto, V.; Souza, M.J. 2013. Patterns of rDNA and telomeric sequences diversification: contribution to

repetitive DNA organization in Phyllostomidae bats. *Genetica* (2014) 142:49–58. DOI 10.1007/s10709-013-9753-2.

Ceballos, G.; Ehrlich, P.R. 2009. Discoveries of new mammal species and their implications for conservation and ecosystem services. *PNAS*, vol. 106, no. 10, 3841–3846.

Chow, J. C.; Ciaudo, C.; Fazzari, M. J.; Mise, N.; Servant, N.; Glass, J. L.; Attreed, M.; Avner, P.; Wutz, A.; Barillot, E.; Grealley, J. M.; Voinnet, O.; Heard, E. 2010. Line 1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell*, 141:956-969.

Chueh, A.C.; Northrop, E.L.; Brettingham-Moore, K.H.; Choo, K.H.A.; Wong, L.H. 2009. LINE Retrotransposon RNA Is an Essential Structural and Functional Epigenetic Component of a Core Neocentromeric Chromatin. *PLoS Genet* 5(1): e1000354. doi:10.1371/journal.pgen.1000354.

Datzmann, T.; Helversen, O.; Mayer, F. 2010. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evolutionary Biology*, 10:165.

DeBaryshe, P.G.; Pardue, M. 2011. Differential Maintenance of DNA Sequences in Telomeric and Centromeric Heterochromatin. *Genetics* 187: 51–60.

Emmons, L.; Feer, F. 1997. Neotropical rainforest mammals: a field guide. (Second edition.) University of Chicago Press, Chicago, Illinois 60637, USA.

Estevam, LH; Souza, MJ; Santos, N. 2005. *Phyllostomus elongatus* e *P. discolor* (Phyllostomidae Chiroptera): um estudo citogenético-comparativo. Resumo do 51º Congresso Brasileiro de Genética. Recife.

Estoup, A.; Presa, P.; Krieg, F.; Vaiman, D.; Guyomard, R. 1993. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71: 488-496.

Faria K.C.; Morielle-Versute, E. 2002. In situ hybridization of bat chromosomes with human (TTAGGG)_n probe, after previous digestion with AluI. *Genet. Mol. Biol.* 25: 365-371.

Faria, K. C. 2003. Análise citogenética comparativa em espécies de morcegos dos gêneros *Molossus* (Molossidae), *Artibeus*, *Platyrrhinus*, *Sturnira*, *Glossophaga*, *Phyllostomus* e *Carollia* (Phyllostomidae) – Chiroptera (Mammalia). São Paulo.

Faria, K.C.; Morielle-Versute, E. 2004. Homologias cromossômicas entre Phyllostomidae e Molossidae (Chiroptera-Mammalia) evidenciadas através de comparações dos padrões de bandamento GTC. 50º Congresso Brasileiro de Genética. Florianópolis-Santa Catarina.

Faria, K.C.; Marchesin, S.R.C.; Moreira, P.R.L.; Beguelini, M.R.; Morielle-Versute, E. 2009. New insights into telomeric DNA sequence (TTAGGG)_n location in bat chromosomes. *Genetics and Molecular Research* 8 (3): 1079-1084.

Farré, M.; Ponsà, M.; Bosch, M. 2009. Interstitial telomeric sequences (ITSs) are not located at the exact evolutionary breakpoints in primates. *Cytogenet Genome Res*;124:128–131.

- Finato, A.O.; Varella-Garcia, M.; Tajara, E.H.; Taddei, V.A.; Morielle-Versute, E. 2000. Intrachromosomal distribution of telomeric repeats in *Eumops glaucinus* and *Eumops perotis* (Molossidae, Chiroptera). *Chromosome Research* 8: 563-569.
- Forman, G. L.; Baker, R. J.; Gerber, J.D. 1968. Comments on the systematic status of vampire bats (family Desmondontidae). *Systematic Zoology* 17:417-425. Reprinted in: *Selected readings in mammalogy*. 1976. (J. K. Jones, Jr., S. Anderson, and R. S. Hoffmann, eds.). Museum of Natural History, Univ. of Kansas, Monograph 5:75-83.
- Ford, C.E.; Hamerton, J.L. 1956. The chromosomes of man. *Nature* 178:1010–1013.
- Gardner, AL. 2008. *Mammals of South America*. Vol. 1. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. Chicago University Press, Chicago.
- Graham, T.; Boissinot, S. 2005. The Genomic Distribution of L1 Elements: The Role of Insertion Bias and Natural Selection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006: 1–5.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology*, 76: 1117-1127.
- Guerra, M. 2004. *Fish – Conceitos e Aplicações na Citogenética*. SBG, Ribeirão Preto.
- Han, J.S.; Boeke, J.D. 2005. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *Bioessays*. 27(8):775-84.
- Henikoff, S.; Malik, H.S. 2002. Centromeres: Selfish drivers. *Nature* 417, 227| doi:10.1038/417227a.
- Hill, J.E.; Smith, J.D. 1984. *Bats - A natural history*. University of Texas Press.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 3: 1014-1015.
- Hsu, T. C.; Baker, R. J.; Utakoji, T. 1968. The multiple sex chromosome system of American leaf-nosed bats (Chiroptera, Phyllostomidae). *Cytogenetics* 7:27-38.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19(17): 4780.
- IUCN 2016. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 17/01/2016.
- John, B. 1980. *Citogenética de Populações*. Vol 15. São Paulo: EDUSP. 84p.
- Kazazian, H.H. 2004. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*: Vol. 303 no. 5664 pp. 1626-1632. DOI: 10.1126/science.1089670.

Korenberg, J.R.; Rykowski, M.C. 1988. Human genome organization: Alu, LINES, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. Volume 53, Issue 3, p391–400.

Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; Lehoczy, J.; LeVine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; Meldrim, J.; Mesirov, J. P.; Miranda, C.; Morris, W.; Naylor, J.; Raymond, C.; Rosetti, M.; Santos, R.; Sheridan, A.; Sougnez, C.; Stange-Thomann, N.; Stojanovic, N.; Subramanian, A.; Wyman, D.; Rogers, J.; Sulston, J.; Ainscough, R.; Beck, S.; Bentley, D.; Burton, J.; Clee, C.; Carter, N.; Coulson, A.; Deadman, R.; Deloukas, P.; Dunham, A.; Dunham, I.; Durbin, R.; French, L.; Grafham, D.; Gregory, S.; Hubbard, T.; Humphray, S.; Hunt, A.; Jones, M.; Lloyd, C.; McMurray, A.; Matthews, L.; Mercer, S.; Milne, S.; Mullikin, J. C.; Mungall, A.; Plumb, R.; Ross, M.; Shownkeen, R.; Sims, S.; Waterston, R. H.; Wilson, R. K.; Hillier, L. W.; McPherson, J. D.; Marra, M. A.; Mardis, E. R.; Fulton, L. A.; Chinwalla, A. T.; Pepin, K. H.; Gish, W. R.; Chissole, S. L.; Wendl, M. C.; Delehaunty, K. D.; Miner, T. L.; Delehaunty, A.; Kramer, J. B.; Cook, L. L.; Fulton, R. S.; Johnson, D. L.; Minx, P. J.; Clifton, S. W.; Hawkins, T.; Branscomb, E.; Predki, P.; Richardson, P.; Wenning, S.; Slezak, T.; Doggett, N.; Cheng, J. F.; Olsen, A.; Lucas, S.; Elkin, C.; Uberbacher, E.; Frazier, M.; Gibbs, R. A.; Muzny, D. M.; Scherer, S. E.; Bouck, J. B.; Sodergren, E. J.; Worley, K. C.; Rives, C. M.; Gorrell, J. H.; Metzker, M. L.; Naylor, S. L.; Kucherlapati, R. S.; Nelson, D. L.; Weinstock, G. M.; Sakaki, Y.; Fujiiyama, A.; Hattori, M.; Yada, T.; Toyoda, A.; Itoh, T.; Kawagoe, C.; Watanabe, H.; Totoki, Y.; Taylor, T.; Weissenbach, J.; Heilig, R.; Saurin, W.; Artiguenave, F.; Brottier, P.; Bruls, T.; Pelletier, E.; Robert, C.; Wincker, P.; Smith, D. R.; Doucette- Stamm, L.; Rubenfield, M.; Weinstock, K.; Lee, H. M.; Dubois, J.; Rosenthal, A.; Platzer, M.; Nyakatura, G.; Taudien, S.; Rump, A.; Yang, H.; Yu, J.; Wang, J.; Huang, G.; Gu, J.; Hood, L.; Rowen, L.; Madan, A.; Qin, S.; Davis, R. W.; Federspiel, N. A.; Abola, A. P.; Proctor, M. J.; Myers, R. M.; Schmutz, J.; Dickson, M.; Grimwood, J.; Cox, D. R.; Olson, M. V.; Kaul, R.; Raymond, C.; Shimizu, N.; Kawasaki, K.; Minoshima, S.; Evans, G. A.; Athanasiou, M.; Schultz, R.; Roe, B. A.; Chen, F.; Pan, H.; Ramser, J.; Lehrach, H.; Reinhardt, R.; McCombie, W. R.; de la, B. M.; Dedhia, N.; Blocker, H.; Hornischer, K.; Nordsiek, G.; Agarwala, R.; Aravind, L.; Bailey, J. A.; Bateman, A.; Batzoglou, S.; Birney, E.; Bork, P.; Brown, D. G.; Burge, C. B.; Cerutti, L.; Chen, H. C.; Church, D.; Clamp, M.; Copley, R. R.; Doerks, T.; Eddy, S. R.; Eichler, E. E.; Furey, T. S.; Galagan, J.; Gilbert, J. G.; Harmon, C.; Hayashizaki, Y.; Haussler, D.; Hermjakob, H.; Hokamp, K.; Jang, W. Johnson, L. S.; Jones, T. A.; Kasif, S.; Kasprzyk, A.; Kennedy, S.; Kent, W. J.; Kitts, P.; Koonin, E. V.; Korf, I.; Kulp, D.; Lancet, D.; Lowe, T. M.; McLysaght, A.; Mikkelsen, T.; Moran, J. V.; Mulder, N.; Pollara, V. J.; Ponting, C. P.; Schuler, G.; Schultz, J.; Slater, G.; Smit, A. F.; Stupka, E.; Szustakowki, J.; Thierry-Mieg, D.; Thierry-Mieg, J.; Wagner, L.; Wallis, J.; Wheeler, R.; Williams, A.; Wolf, Y. I.; Wolfe, K. H.; Yang, S. P.; Yeh, R. F.; Collins, F.; Guyer, M. S.; Peterson, J.; Felsenfeld, A.; Wetterstrand, K. A.; Patrinos, A.; e Morgan, M. J. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921

Leal, A.O.S. 2012. Identificação taxonômica e caracterização citogenética das espécies de morcegos coletadas no município de Piauí. Trabalho de conclusão de curso.

Leite, F.H.R.; Nogueira-Paranhos, J.D.; Lustosa, G.S.; Valois, R.S. 2010. Filostomídeos do Parque Nacional da Serra das Confusões - Piauí -Brasil (Mammalia, Chiroptera). XXVIII Congresso Brasileiro de Zoologia.

Lemos-Pinto, M.M.P., Souza, M.J.; Santos, N. 2005. Análise comparativa do padrão de bandeamento C entre espécies do gênero *Artibeus*. Resumo do 51º Congresso Brasileiro de Genética. São Paulo.

Lemos-Pinto, M.M.P.; Calixto, M.S.; Souza, M.J.; Araújo, A.P.T.; Langguth, A.; Santos, N. 2012. Cytotaxonomy of the subgenus *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) by characterization of species-specific markers. *CompCytogen* 6(1): 17–28 doi: 10.3897/CompCytogen.v6i1.1510.

Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.

Lyon, M.F. 1998. X-Chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* 80:133–137.

Mandrioli, M.; Cuoghi, B.; Marini, M e Manicardi, G.C.; 1999. Localization of the (TTAGGG)_n telomeric repeat in the chromosomes of the pufferfish *Tetraodon fluviatilis* (Hamilton Buchanan) (Osteichthyes). Vol. 52, n. 3-4: 155-157.

Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds). *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., Enfield, New Hampshire, USA. p. 421-453.

Moreira, V.M; Selvatici, L.S; Boa, M.Q; Santos, A.B; Ditchfield, A.D; Pagnozzi, JM. 2009. Caracterização citogenética de *Carollia perspicillata* (Chiroptera phyllostomidae) procedente de um fragmento de Mata Atlântica do estado do Espírito Santo. Resumo do 55º Congresso Brasileiro de Genética, SP. Brasil.

Morielle, E.; Varella-Garcia, M. 1988. Variability of nucleolus organizer regions in phyllostomid bats. *Rev Bras Genet*, 11:853-871.

Multani, A.S.; Ozen, M.; Furlong, C.L.; Zhao, Y.-J. ; Hsu, T.C.; Pathak, S. 2001. Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110:214–220.

Nanda, I.; Schrama, D.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Schartl, M.; Schmid, M. 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG)_n sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111:215–227.

Nanda, I.; Fugate, M.; Steinlein, C.; Schmid, M. 2008. Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenet Genome Res* 122:396–400.

Noronha, R.C.R. 2000. Reconstrução do comportamento meiótico em Phyllostomidae (Chiroptera). Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Noronha, R.C.R.; Pereira, A.L; Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C. 2008. ZOO-FISH Em meiose: análise de pintura cromossômica do X humano em *Artibeus obscurus* (Phyllostomidae, Chiroptera). Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-Bahia.

Noronha, R.C.R. Nagamachi C.Y.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.; Pieczarka, J.C. 2009. Neo-XY body: an analysis of XY1Y2 meiotic behavior in *Carollia* (Chiroptera, Phyllostomidae) by chromosome painting. *Cytogenet Genome Res*; 124:37–43. DOI: 10.1159/000200086

Noronha, R.C.R. Nagamachi C.Y.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.; Pieczarka. 2010. Meiotic analysis of XX/XY and neo-XX/XY sex chromosomes in Phyllostomidae by cross-species chromosome painting revealing a common chromosome 15-XY rearrangement in Stenodermatinae. *Chromosome Research* 18:667–676. DOI 10.1007/s10577-010-9146-7

Nowak, R.M. 1994. Walker's bats of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Oliveira, K.G.; Santos, N. 2011. Mapeamento Cromossômico dos Genes Ribossomal 18S e de Histona H3 na Espécie *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera). XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC CTG - UFPE.

Ovchinnikov, I.; Troxel, A. B.; Swergold, G. D. 2001. Genomic characterization of recent human LINE-1 insertions: evidence supporting random insertion. *Genome Research* 11:2050–2058.

Paglia, A.P.; Fonseca, G.A.B.; Rylands, A.B.; Herrmann, G.; Aguiar, L.M.S.; Chiarello, A.G.; Leite, Y.L.R.; Costa, L.P.; Siciliano, S.; Kierulff, M.C.M.; Mendes, S.L.; Tavares, V.C.; Mittermeier, R.A.; Patton, J.L. 2001. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Versão Atualizada/2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology 6. Conservation International, Arlington, VA. 75pp.

Pagnozzi, J.M.; Selvatici, L.S.; Ditchfield A.D. 2008. Estudo citogenético comparativo entre duas espécies do Gênero *Artibeus* (Chiroptera, Phyllostomidae) do Parque Estadual da Fonte Grande, Vitória, ES. Resumo do 54º Congresso Brasileiro de Genética.

Parish, D. A.; P. Vise, H. A. Wichman; J. J. Bull; e R. J. Baker. 2002. Distribution of LINEs and other repetitive elements in the karyotype of the bat *Carollia*: Implications for X-chromosome inactivation. *Cytogenetic and Genome Research* 96:191-197.

Patton, J. C.; R. J. Baker. 1979. Chromosomal homology and evolution of Phyllostomatoid bats. *Systematic Zoology* 27:449-462.

Peracchi, A.L.; Lima, I.P.; Reis, N.R.; Nogueira, M.R.; Ortêncio-Filho, H. 2011. Ordem Chiroptera. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA and Lima IP. Mamíferos do Brasil, Londrina, p.162-200.

Pieczarka, J.C.; Nagamashi, C.Y.; Obrien, P.C.M.; Yang, F.; Rens, W.; Barros, R.M.S.; Noronha, R.C.R.; Rissino, J.D.; Oliveira, E.H.C.; Ferguson-Smith, M.A. 2005. Reciprocal chromosome painting between two South American bats: *Carollia brevicauda* and *Phyllostomus hastatus* (Phyllostomidae, Chiroptera). *Chromosome Research*, Inglaterra, v. 13, p. 339-347.

Piekzarca, J. C.; Gomes, A. J. B.; Nagamachi, C. Y.; Rocha, D. C. C.; Rissino, J. D.; O'Brien, P. C. M.; Yang, F.; Ferguson-Smith, M. A. 2013. A phylogenetic analysis using multidirectional chromosome painting of three species (*Uroderma magnirostrum*, *U.*

bilobatum and *Artibeus obscurus*) of subfamily Stenodermatinae (Chiroptera-Phyllostomidae). *Chromosome Research*, v. 21, p. 383-392.

Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2934–2938.

Pinto, M.M.P.L. 2007. Utilização de marcadores citogenéticos na análise comparativa dos grandes *Artibeus* (Phyllostomidae, Chiroptera) avaliando estruturas conservadas e sítios espécie-específico. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

Reid, F.A. A field guide to the mammals of Central America and southeast Mexico. New York: Oxford University Press, 334 p. 1997.

Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, L.P. 2007. Morcegos do Brasil. Ed. Universidade Estadual de Londrina. 253pp.

Revaud, D.; Mozziconacci, J.; Sabatier, L.; Desmaze, C.; Lavelle, C. 2009. Sequencedriven telomeric chromatin structure. *Cell Cycle* 8(7):1099-100.

Rodrigues, L.R.R.; Barros, R.M.S.; Assis, M.F.L.; Aguiar, S.M.; Pieczarka, J.C.; Nagamachi, C.Y. 2000. Chromosome comparison between two species of *Phyllostomus* (Chiroptera - Phyllostomidae) from Brazilian Amazonia, with some phylogenetic insights. *Genetics and Molecular Biology (Impresso)*, v. 23, n.3, p. 595-599.

Rodrigues, L.R.R.; Barros, R.M.S.; Marques-Aguiar, S.; Assis, M.F.L.; Pieczarka, J.C.; Nagamachi, C.Y. 2003. Comparative cytogenetics of two phyllostomids bats. A new hypothesis to the origin of the rearranged X chromosome from *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae), *Caryologia*, 56:4, 413-419, DOI: 10.1080/00087114.2003.10589352. To link to this article: <http://dx.doi.org/>

Rodríguez, A.G. 2007. Ecología evolutiva de las zonas de hibridación. In *Ecología molecular* (L.E. Eguiarte, V. Souza & X. Aguirre, orgs). Progreso, México, p. 427- 440.

Rogatto, S.R.; Rainho, C.A. 2000. Citogenética molecular. In *Citogenética sem risco: biossegurança e garantia de qualidade* (S.R. Rogatto, ed.). FUNPEC, Ribeirão Preto, p.133-152.

Rovatsos, M.; Kratochvíl, L.; Altmanová, M.; Pokorná, M.J. 2015. Interstitial Telomeric Motifs in Squamate Reptiles: When the Exceptions Outnumber the Rule. *PLoS ONE* 10(8): e0134985. doi:10.1371/journal.pone.0134985.

Ruiz-Herrera, A.; Nergadze, S.G.; Santagostino, M.; Giulotto, E. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res* 122:219–228.

Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K. B.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*, Vol. I. Cold Spring Harbor, NY. p. 633–664.

Santos, S.; Souza, M.J. 1998. Characterization of the constitutive heterochromatin of *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae, Chiroptera) using the base-specific fluorochromes, CMA3 (GC) and DAPI (AT), *Caryologia*, 51:1, 51-60, DOI: 10.1080/00087114.1998.10589119.

Santos, N.; Fagundes, V.; Yonenaga-Yassuda, Y.; De Souza, M. J. 1999. Comparative karyology of Brazilian vampire bats *Desmodus rotundus* and *Diphylla ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): banding patterns, base-specific fluorochromes and FISH of ribosomal genes. *Hereditas*, 3-134, 189-194.

Santos, N.; Fagundes, V.; Yonenaga-Yassuda, Y.; Souza, M.J. 2002. Localization of rRNA genes in Phyllostomidae bats reveals silent NORs in *Artibeus cinereus*. *Hereditas*, 136:137-143.

Selker, E. U. 2002. Repeat-induced gene silencing in fungi. *Advances in Genetics*, 46:439-450.

Silva, A.M.; Marques-Aguiar, S.; Barros, R.M.S.; Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C. 2005. Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype $2n = 42$) (Phyllostomidae, Sternodermatinae) in the Brazilian amazon. *Genetics and Molecular Biology (Impresso)*, Ribeirão Preto, v. 28, n.2, p. 248-253.

Silva, N.K.N. Análise citogenética comparativa em morcegos da subfamília Phyllostominae (Chiroptera-Phyllostomidae) por citogenética clássica e hibridização in situ fluorescente. 2011. Pará.

Simmons, N.B. 2005. Order Chiroptera. In D.E. Wilson e D.M. Reeder (Eds), *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3 ed., v.1, p. 312-529. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Simpson, G.G. 1989. *Princípios de Taxonomia Animal*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

Sotero-Caio, C.G.; Pieczarka, J.C.; Nagamachi, C.Y.; Gomes, A.J.B.; Lira, T.C.; O'Brien, P.C.M.; Ferguson-Smith, M.A.; Souza, M.J.; Santos, N. 2011. Chromosomal Homologies among Vampire Bats Revealed by Chromosome Painting (Phyllostomidae, Chiroptera). *Cytogenetic and Genome Research (Online)*, v. 132, p. 156-164.

Souza, M.J.; Araújo, M.C.P. 1990. Conservative patterns of the G-bands and diversity of CBanding patterns and NORs in the Sternodermatinae (Chiroptera-Phyllostomatidae). *Revista Brasileira de Genética*, 13: 255-268.

Souza, E.M.S.; Gross, M.C.; Feldberg, E. 2010. Citogenética clássica e molecular em *Artibeus* sp. (Chiroptera: Phyllostomidae) da cidade de Manaus-Am. XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM. Manaus.

Souza, E.M.S; Feldberg, E.; Silva, C.E.F.; Gross, M.C. 2011. Variação no padrão de heterocromatina no cromossomo X em *Artibeus obscurus* (Chiroptera:Phyllostomidae) de Manaus-Amazonas. 2ª Reunião Brasileira de Citogenética. Águas de Lindóia-SP.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.

Sumner, A.T. 1990. Chromosome banding. Unwin Hyman, London.

Tucker, P.K. 1986. Sex chromosome-autosome translocation in the leaf-nosed bats family Phyllostomidae. I. Mitotic analyses of the subfamilies Stenodermatinae and Phyllostominae. *Cytogenet. Cell Genet.* 43: 19-27.

Varella-Garcia, M.; Taddei, V.A. 1989. Citogenética de Quirópteros: Métodos e Aplicações. *Revista Brasileira de Zoologia.* 6 (2) : 2 9 7 - 3 2 3 15/VIII.

Varella-Garcia, M., E. Morielle-Versute; V.A. Taddei, 1989. A survey of cytogenetic data on Brazilian bats. *Brazil. J. Genet.* 12: 761–793.

Volleth, M.; Klett, C.; Kollak, A.; Dixkens, C.; Winter, Y.; Just, W.; Vogel, W.; Hameister, H. 1999. ZOO FISH analysis in a species of the order Chiroptera: *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae). *Chromosome research* 7: 57-64.

Waters, P.D.; Dobigny, A.T.P.; Robison, T.J. 2004. LINE-1 distribution in Afrotheria and Xenarthra: implications for understanding the evolution of LINE-1 in eutherian genomes. *Chromosoma* 113:137–144.

Wetterer, A.L., Rockman, M.; Simmons, N.B. 2000. Phyllostomid phylogeny: Data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 200 pp.

Wetterer, A.L., N.B. Simmons, and G.F. Gunnell. In review. Yangochiroptera. In K. de Queiroz, J. Gauthier, and P. Cantino (eds.) *The Phylocode Companion Volume*. University of California Press.

Wetterer, A.L., N.B. Simmons, and G.F. Gunnell. In review. Yinpterochiroptera. In K. de Queiroz, J. Gauthier, and P. Cantino (eds.) *The Phylocode Companion Volume*. University of California Press.

Wichman, H.A.; Van Den Bussche, R.A.; Hamilton, M. J.; Baker, R. J. 1992. Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica* 86:287-293.

Wood, A.M.; Laster, K.; Rice, E.L.; Kosak, S.T. 2015. A beginning of the end: new insights into the functional organization of telomeres. *Nucleus* 6: 172-178.