



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Samira Brito Mendes

**FAMÍLIA MOLOSSIDAE (MAMMALIA, CHIROPTERA) DE OCORRÊNCIA EM
BIOMAS MARANHENSES NO ENFOQUE MORFOLÓGICO, MOLECULAR E
CIRCULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO**

SÃO LUÍS-MA

2017

SAMIRA BRITO MENDES

**FAMÍLIA MOLOSSIDAE (MAMMALIA, CHIROPTERA) DE OCORRÊNCIA EM
BIOMAS MARANHENSES NO ENFOQUE MORFOLÓGICO, MOLECULAR E
CIRCULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO**

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Claudene Barros – CESC/UEMA

SÃO LUÍS-MA

2017

**FAMÍLIA MOLOSSIDAE (MAMMALIA, CHIROPTERA) DE OCORRÊNCIA EM
BIOMAS MARANHENSES NO ENFOQUE MORFOLÓGICO, MOLECULAR E
CIRCULAÇÃO DO VÍRUS RÁBICO**

SAMIRA BRITO MENDES

APROVADO EM: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Maria Claudene Barros – Orientadora
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

**Prof. Dr. Flávio Kulaif Ubaid
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

**Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga – Membro
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA**

SÃO LUÍS-MA

2017

*A Deus, minha família e todos os
meus amigos, com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

Á Deus pelo dom da vida, por ter chegado até aqui, por todas as vezes que me deu forças para não desistir diante das pedras encontradas pelo caminho;

A UEMA (Universidade Estadual do Maranhão) pelo programa de mestrado Ciência Animal;

A FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão) por permitir a realização deste trabalho;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa;

A minha orientadora professora Dr^a. Maria Claudene Barros por ter confiado em mim e ter me acolhido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GEMBIMOL), por ser essa pessoa admirável e determinada, sou muito grata por tudo, e feliz por tê-la como orientadora;

O professor Wilson Uieda e a professora Fernanda Atanaena pela confirmação na identificação dos morcegos e por me ensinar muito do que hoje eu sei sobre eles;

A equipe de campo sem os quais esse trabalho não teria sido realizado: Fabio Henrique Cardoso, Amanda Cristiny, Cleison Luís, Katione Cardoso, Marcelo Almeida, Bruno Campos e Marcelo Ventura;

À Agência Estadual de Defesa agropecuária do Maranhão – AGED, pelo auxílio prestado nas coletas;

A minha família, em especial a minha mãe, meu alicerce, sem ela não sei o que seria de mim, te amo mãe, meu filho minha vida o motivo para chegar até aqui, minha avó guerreira batalhadora pela força incentivo e amor, meus irmãos: Janaina Brito, Emerson Brito e Edson Mendes;

A família GENBIMOL pelo apoio durante a realização desse trabalho, por trás de grandes conquistas sempre há uma grande equipe;

Um agradecimento especial a todos os morcegos, que sempre me estimulam mais e mais a conhecê-los melhor;

Enfim, a todos que tiveram presentes em minha vida durante a realização desse trabalho, sou imensamente abençoada por Deus por ter permitido que cada um de vocês fizessem parte dessa jornada.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécie *Molossus molossus* (Pallas, 1766) evidenciando a “cauda livre” presentes em todos os Molossídeos. 15
- Figura 2.** Mapa do Maranhão evidenciando as áreas de estudo. 20
- Figura 3.** Em (A) Disposição das redes de neblinas abertas próximas a abrigo em (B) exemplar coletado em rede de neblina. 22
- Figura 4.** Vista dorsal da espécie de morcego da família Molossidae (*Cynomops abrasus*), mostrando os caracteres morfológicos externos. 24
- Figura 5.** Medidas cranianas de quirópteros em (A) vista ventral, (B) lateral, (C) dorsal, (D) mandíbula e (E) altura da caixa craniana. 25
- Figura 6.** Espécies de Morcegos pertencentes a família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses. Em (A) *M. rufus*, em (B) *M. molossus*, (C) *C. planirostris*, (D) *C. abrasus*, (E) *M. temminckii* e em (F) *N. laticaudatus*. 27
- Figura 7.** Mapa de distribuição geográfica da espécie *C. planirostris* para o Brasil. 30
- Figura 8.** Crânio das espécies *M. rufus* e *M. molossus* em (A) *M. molossus* em (B) *M. rufus* pertencentes aos biomas maranhenses. 31
- Figura 9.** Análises canônicas das variáveis craniométricas (A) e morfométricas (B) para as fêmeas do gênero *Molossus*. CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana; CM=Candido Mendes; CX = Caxias. 33
- Figura 10.** Análise canônicas das variáveis craniométricas (A) e morfométricas (B) para os Machos do gênero *Molossus*. CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana; CM=Candido Mendes; CX = Caxias. 34
- Figura 11.** Árvore filogenética pelo método Agrupamento de Vizinhos, com o algoritmo Tamura Nei, para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene rRNA16S. Os valores corresponde ao *bootstrap* de Agrupamento de Vizinhos, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, da esquerda para a direita respectivamente 35
- Figura 12.** Árvore filogenética pelo método Agrupamento de vizinhos, com o algoritmo Tamura Nei, para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene COI. Os valores correspondem ao *bootstrap* de Agrupamento de Vizinhos, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, da esquerda para a direita respectivamente. 38

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Municípios maranhenses e suas coordenadas geográficas | 20 |
| Tabela 2. Total de espécimes por localidade, espécie e sexo utilizados nas análises craniométricas e morfométricas | 23 |
| Tabela 3. Espécies, biomas, localidades e n amostral da família Molossidae encontrados nos biomas maranhenses | 27 |
| Tabela 4. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado para medidas morfométricas para machos e fêmeas, valores amostrados > 0,7 | 32 |
| Tabela 5. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação de VARIMAX, normalizados para medidas craniométricas para machos e fêmeas, valores amostrados >7,0 | 32 |
| Tabela 6. Sequências do gene rRNA 16S pertencentes às espécies família Molossidae dos diferentes biomas maranhenses | 34 |
| Tabela 7. Matriz de distância genética nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura Nei, para as espécies pertencentes à família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses através do gene rRNA16S. Divergência interespecífica (abaixo da diagonal) e média intraespecífica (diagonal em negrito) | 36 |
| Tabela 8. Espécies, biomas, localidades e espécimes de morcegos pertencentes à família Molossidae analisados para o gene COI | 36 |
| Tabela 9. Similaridades de sequências obtidas para as espécies pertencentes à família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses | 37 |
| Tabela 10. Matriz de distância genética nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura Nei, para as espécies de morcego pertencentes à família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses através do gene COI. Divergência interespecífica (abaixo da diagonal) e intraespecífica (diagonal em negrito) | 39 |
| Tabela 11. Genes e primers utilizados neste estudo, com seus respectivos autores | 58 |
| Tabela 12. Condições de PCR para o isolamento dos genes (rRNA16S e COI) | 59 |

ABREVIATURAS

- Ant. E** - Antebraço esquerdo
Ant. D - Antebraço direito
Pé - Pé
Ca - Cauda
Po - Polegar
III Me- Terceiro Metacarpo
1ª Fal- Primeira falange
2ª Fal- Segunda falange
IV Me- Quarto Metacarpo
1ª Fal - Primeira Falange
2ª Fal - Segunda Falange
V Me- Quinto Metacarpo
1ª Fal- Primeira falange
2ª Fal- Segunda falange
Ti- Tíbia
Ct - Comprimento total
Cc - Côndilo-canino
Cb - Comprimento basal
Cpt - Comprimento palatal
B - Comprimento basal
CM2/3S - Comprimento da série de dentes superiores
CM2/3I - Comprimento da série de dentes inferiores
Cm - Comprimento da mandíbula
Lc - Largura externa dos cingula-caninos
Lm - Largura externa dos molares
Li - Largura interorbital
Lp - Largura posorbitária
Lz - Largura zigomática
Lcx - Largura da caixa craniana
Lmt - Largura mastóidea
Lpt - Largura palatal
Acx - Altura da caixa craniana
Ao - Altura do occipital

CC+Inc - Comprimento do canino ao incisivo

CaPMO - Comprimento do canino ao processo mastóideo oposto

NaFo - Altura da base do crânio, comprimento do nasal ao forâmen

BTil - Largura bula timpânica na porção mais larga

BTTP - Largura bula timpânica na porção mais próxima

InCa - Distância entre incisivo e o caninos

BcCs - Crista sagital

RESUMO

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera, segunda maior ordem de mamíferos em diversidade de espécies. Os Molossídeos compõem um importante segmento da fauna de quirópteros, com implicações ecológicas, econômicas e sanitárias. Apesar do grande número de caracteres morfológicos e moleculares utilizados para a identificação e reconstruções filogenéticas das espécies de morcegos, os resultados ainda são inconclusivos. Marcadores moleculares têm sido amplamente usados como ferramentas em estudos populacionais e filogenéticos, aumentando a capacidade em identificar espécies. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo caracterizar através da morfologia, morfometria, craniometria e dados moleculares os morcegos da família Molossidae de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses, bem como, detectar presença/ausência do vírus rábico. Para tanto fez-se expedições para os municípios maranhenses: Godofredo Viana, Carutapera, Cândido Mendes e Caxias. Após a coleta os morcegos foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA, onde ocorreu a identificação morfológica com base em chaves de classificação, retirada do tecido muscular, que foi armazenado e fixado em álcool a 90% para a realização dos estudos moleculares, e tecido encefálico para o teste de Imunofluorescência Direta. Após identificação, fotografias e retirada das medidas morfométricas foi realizada a retirada da estrutura craniana dos espécimes pela abertura bucal com o rebatimento da pele. Com auxílio de paquímetro manual, foram aferidas 15 medidas morfométricas e 25 craniométricas. O DNA total foi obtido utilizando o kit PROMEGA, o isolamento e amplificação dos genes rRNA 16S e COI ocorreu via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se primers específicos e os produtos das PCRs purificados foram sequenciados. As análises moleculares foram realizadas por softwares como: BIOEDIT 7.0 e MEGA 7.0. Para a identificação correta das espécies e análises de similaridades foram usadas as plataformas *BOLD Systems v3* e *BLAST*. A análise multivariada foi realizada no software *STATISTICA 7.0*. O diagnóstico para o vírus da raiva ocorreu através da técnica da Imunofluorescência Direta (IFD) no Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís. Nesse estudo, 115 espécimes distribuídos em seis espécies e quatro gêneros, pertencentes à família Molossidae foram registrados para os biomas maranhenses. Para as espécies do gênero *Molossus*, a discriminação entre as variáveis pelo método de *stepwise* foi significativa, tanto para os machos $\lambda=00020$, $F= (26,8) =21.516$ $p< 0001$, quanto para as fêmeas com valores de $\lambda= 00430$, $F= (36,59) =8.8476$ $p< 0000$. Os dados moleculares a partir do gene rRNA 16S mostraram uma média de divergência intraespecífica variando de 0 a 1,4%. Para o gene COI a média divergência intraespecífica variou de 0,7 a 1%. A morfologia, considerando morfometria, craniometria e dados moleculares registram a ocorrência de seis espécies para a família Molossidae sendo elas: *Molossus rufus* (Geoffroy, 1805) *Cynomops abrasus* (Temminck, 1826) *Nyctinomops laticaudatus* (E. Geoffroy 1805) *Molossops temminckii* (Williams e Genoways, 1980) e *Cynomops planirostris* (Peters, 1866) para o bioma Cerrado e *Molossus molossus* (Pallas, 1766) para o bioma Amazônia. As amostras de tecido encefálico submetidas ao teste de (IFD), apresentaram resultados negativos.

Palavras-Chave: Morcegos, DNA mitocondrial, Raiva, Morfologia

ABSTRACT

The bats belong to the order Chiroptera, the second largest order of mammals in species diversity. The Molossids make up an important segment of the fauna of bats, with ecological, economic and sanitary implications. Despite the large number of morphological and molecular characters used for identification and phylogenetic reconstructions of bat species, the results are still inconclusive. Molecular markers have been widely used as tools in population and phylogenetic studies, increasing the ability to identify species. Thus, the present study aims to characterize through morphology, morphometry, craniometry and molecular data the bats of the Molossidae family occurring in the Cerrado and Amazonian Maranhenses biomes, as well as to detect the presence/absence of the rabies virus. For this purpose, expeditions were made to the municipalities of Maranhão: Godofredo Viana, Carutapera, Cândido Mendes and Caxias. After the collection, the bats were taken to the Laboratory of Genetics and Molecular Biology of the CESC/UEMA, where morphological identification occurred based on classification keys, removal of muscle tissue, which was stored and fixed in 90% alcohol for the molecular studies, and encephalic tissue for the Direct Immunofluorescence test. After identification, photographs and removal of the morphometric measurements, the cranial structure of the specimens was removed through the mouth opening with the skin folded. Using a manual pachymeter, 15 morphometric and 25 craniometric measures were measured. Total DNA was obtained using the PROMEGA kit, isolation and amplification of the genes rRNA 16S and COI occurred via Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers and the purified PCR products were sequenced. The molecular analyzes were performed by software such as: BIOEDIT 7.0 and MEGA 7.0. For the correct species identification and analysis of similarities The *BOLD Systems v3* and *BLAST* platforms were used. The multivariate analysis was performed in STATISTICA 7.0 software. The diagnosis for the rabies virus occurred through the technique of Direct Immunofluorescence (IFD) in the Laboratory of Virology of the Universidade Estadual of Maranhão, Campus São Luís. In this study, 115 specimens distributed in six species and four genera belonging to the Molossidae family were registered for the Maranhão biomes. For species of the genus *Molossus*, the discrimination between the variables by the stepwise method was significant, for males $\lambda = 00020$, $F = (26.8) = 21.516$ $p < 0001$, and for females with values of $\lambda = 00430$, $F = (36.59) = 8.8476$ $p < 0000$. Molecular data from the 16S rRNA gene showed an average intraspecific divergence ranging from 0 to 1.4%. For the COI gene the mean intraspecific divergence ranged from 0.7 to 1%. The morphology, considering morphometry, craniometry and molecular data record the occurrence of six species for the Molossidae family: *Molossus rufus* (Geoffroy, 1805) *Cynomops abrasus* (Temminck, 1826) *Nyctinomops laticaudatus* (E. Geoffroy 1805) *Molossops temminckii* (Williams and Genoways, 1980) and *Cynomops planirostris* (Peters, 1866) for the Cerrado biome and *Molossus molossus* (Pallas, 1766) for the Amazon biome. The brain tissue samples submitted to the test (IFD), were negative.

Key words: Bats, mitochondrial DNA, Rabies, Morphology

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 Aspectos Gerais dos Morcegos | 13 |
| 1.2 Família Molossidae | 14 |
| 1.3 Marcadores Moleculares | 16 |
| 1.4 Raiva em Morcegos | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Objetivo Geral | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos | 19 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Área de Estudo | 20 |
| 3.2 Coleta, Preparação e Identificação do material biológico | 21 |
| 3.3 Técnicas Morfométricas e Craniométricas externas | 23 |
| 3.4 Análises Craniométricas e Morfométricas externas | 25 |
| 3.4.1 <i>Análises Multivariada</i> | 25 |
| 3.4.2 <i>Análises Discriminantes</i> | 25 |
| 3.5 Técnicas Moleculares | 26 |
| 3.6 Análises Moleculares | 26 |
| 3.7 Técnica de Imunofluorescência direta (IFD) | 26 |
| 4. RESULTADOS | 27 |
| 4.1 Dados morfológicos | 27 |
| 4.1.1 <i>Molossus rufus</i> (Geoffroy, 1805) | 28 |
| 4.1.2 <i>Molossus molossus</i> (Pallas, 1766) | 28 |
| 4.1.3 <i>Cynomops abrasus</i> (Temminck, 1826) | 28 |
| 4.1.4 <i>Molossops temminckii</i> (Williams e Genoways, 1980) | 29 |
| 4.1.5 <i>Nyctinomops laticaudatus</i> (E. Geoffroy, 1805) | 29 |
| 4.1.6 <i>Cynomops planirostris</i> (Peters, 1866) | 29 |
| 4.2 Análises Morfométricas e Craniométricas | 30 |
| 4.3 Análises Estatísticas | 31 |
| 4.3.1 <i>Análise Multivariada</i> | 31 |
| 4.3.2 <i>Análise canônica discriminante</i> | 33 |
| 4.4 Análises Moleculares | 34 |
| 4.4.1 <i>Gene rRNA 16S</i> | 34 |
| 4.4.2 <i>Gene COI</i> | 36 |
| 5. DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 Identificação Morfológica e Molecular | 40 |
| 5.2 Complexo <i>M. rufus</i> x <i>M. molossus</i> | 42 |
| 5.3 Vírus Rábico em Molossídeos | 45 |
| 6. CONCLUSÃO | 47 |
| REFERENCIAS | 48 |
| ANEXOS | 56 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais dos Morcegos

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera, segunda maior ordem de mamíferos em diversidade de espécies, sendo superada apenas pelos roedores. Representando cerca de 24,8% das espécies de mamíferos registradas para o Brasil. Possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo a Amazônia o bioma com maior diversidade de espécies de mamíferos, seguida da Mata Atlântica e do Cerrado. A diversidade de espécies de mamíferos em cada bioma brasileiro é diferente entre as ordens. Sendo a Amazônia o bioma que possui a maior diversidade de morcegos (PAGLIA et al., 2012).

Os Morcegos ocupam uma grande variedade de abrigos, tanto estruturas construídas pelo homem, quanto ambientes naturais: cavernas, minas, fendas feitas em rocha, etc. (KUNZ; LUMSDEN, 2003). Desempenham papéis ecológicos importantes para a manutenção dos ecossistemas, são polinizadores, dispersores de sementes e atuam no controle da população de insetos. Sua importância ecológica está associada à sua diversidade de hábitos alimentares (BIANCONI et al., 2004; PÓVOAS et al., 2012).

São os únicos mamíferos a apresentar estruturas especializadas que permitem um voo verdadeiro, onde suas asas representam mãos altamente modificadas (REIS et al., 2006). Atualmente, são conhecidas no mundo pouco mais de 1.000 espécies, sendo 178 registradas para o Brasil (REIS et al., 2011; PAGLIA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2014).

A ordem Chiroptera foi classificada em duas subordens Megachiroptera e Microchiroptera (REIS et al., 2006). Os Megachiropteras são morcegos conhecidos pelo seu tamanho grande, pertencentes à família Pteropodidae, compreende 150 espécies distribuídas pelo velho mundo, na região tropical da África, Índia sudeste da Ásia e Austrália (SIMMONS, 2005). A subordem Microchiroptera é composta por 17 famílias e 930 espécies, distribuídas no novo mundo, geralmente apresentam tamanho médio, mas podem ocorrer espécies diminutas como *Furipterus borrens* com peso médio de três gramas e 15 cm de envergadura (NOWAK, 1994).

Estudos recentes têm mostrado uma nova abordagem, envolvendo uma associação de informações através de dados morfológicos e moleculares, com isso tem sido proposta uma nova classificação (REIS et al., 2011), onde a família Pteropodidae que anteriormente era uma única família pertencente à subordem

Megachiroptera atualmente faz parte da subordem Yinpterochiroptera, juntamente com: Rhinolophidae, Hipposideridae, Rhinopomatidae, Craseonycteridae e Megadermatidae, as demais famílias pertencem a subordem Yangochiroptera (REIS et al., 2011; REIS et al., 2013). No Brasil são conhecidas nove famílias: Emballonuridae, Phyllostomidae, Mormoopidae, Noctilionidae, Furipteridae, Thyropteridae, Natalidae, Molossidae e Vespertilionidae, compostas por 68 gêneros e 178 espécies. Dentre estas, a família Phyllostomidae é a mais representativa com 43 gêneros e 92 espécies (REIS et al., 2006; REIS et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2014).

Apesar do grande número de caracteres morfológicos e moleculares utilizados para a identificação e reconstrução filogenética das espécies de morcegos, os resultados ainda são inconclusivos. No que se refere a dados moleculares, o DNA mitocondrial (mtDNA) mostra ser uma ferramenta valiosa para estudos populacionais, filogenéticos e caracterização molecular de vários grupos de mamíferos, incluindo morcegos (MARCHESIN et al., 2008).

1.2 Família Molossidae

A superfamília Molossoidea da ordem Chiroptera, conforme proposto por Simmons (1998), é constituída pelas famílias Antrozoidae e Molossidae. A família Molossidae (P. Gervais, 1856 *Judith L. Eger*) é a quarta maior família de morcegos, possui 16 gêneros e cerca de 100 espécies distribuídas pelo mundo (MOREIRA, 2004; SIMMONS, 2005). Os Molossídeos são morcegos insetívoros, habitam regiões tropicais e temperadas da África, América, Ásia, Europa e Oceania (SIMMONS, 2005). Podem percorrer centenas de quilômetros em busca de alimentos (MACDONALD, 2001). Compõem um importante segmento da fauna de quirópteros brasileiros, com implicações ecológicas, econômicas e sanitárias (TADDEI, 1999). Os representantes da família Molossidae são considerados os mais rápidos de todas as espécies da ordem Chiroptera, costumam voar acima da copa das árvores, dificultando assim, a coleta de algumas espécies, e conseqüentemente essa família não costuma ser bem representada em coleções científicas, tornando o conhecimento taxonômico e ecológico bastantes escassos (FABIAN; GREGORIN, 2007).

No Brasil a família Molossidae é a segunda mais diversa, excedida apenas pela família Phyllostomidae. Compreende oito gêneros (*Molossops* Peters, 1865,

Eumops Miller, 1906, *Cynomops* Thomas, 1920, *Molossus* E. Geoffroy, 1805, *Neoplatymops* (Vieira, 1942), *Nyctinomops* Miller, 1902, *Promops* Gervais, 1856, *Tadarida* Rafinesque, 1814) e 29 espécies (NOGUEIRA et al., 2014). Para o estado do Maranhão a família Molossidae possui ocorrência de cinco gêneros e sete espécies: *Cynomops abrasus*, *Eumops perotis*, *Molossus molossus*, *Molossus rufus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* e *Molossops temimckii* (REIS et al., 2013; OLÍMPIO et al., 2016).

Características marcantes dessa família é a presença de uma cauda que se projeta além da membrana interfemural, popularmente chamada de “cauda livre” (Figura 1) e glândulas odoríferas causando fortes odores em suas colônias, possui coloração marrom, preta ou cinza, os membros inferiores são curtos e fortes, com pés estreitos, apresentam focinho largo, orelhas são largas de tamanho e forma variáveis, há dimorfismo sexual, uma vez que os machos são maiores do que as fêmeas (PERACCHI et al., 2006).

Figura 1. Espécie *Molossus molossus* (Pallas, 1766), evidenciando a “cauda livre” presentes em todos os Molossídeos.



Fonte: GENBIMOL

Muitas espécies pertencentes a família Molossidae são bastantes semelhantes, distinguidas por alguns caracteres morfológicos externos que se sobrepõe, como: o tamanho corporal, extensão da orelha, tamanho do trago, rugas nos lábios, fórmula dentarias, tamanho da cauda, medidas de antebraço, metacarpo, tíbia entre outros, neste sentido, surgem as incertezas taxonômicas, portanto, torna-se fundamental estudos que façam a combinação de caracteres moleculares e morfométricos para que sejam elucidados os problemas taxonômicos ocorrentes

dentro grupo, principalmente no que se refere a complexidade de espécies (VIZOTTO e TADDEI, 1973; FREEMAN, 1981; MCCRACKEN et al., 2008). O gênero *Molossus* é um exemplo típico de complexidade dentro da família Molossidae, uma espécie, *M. alvarezi*, foi recentemente descrita com base em tamanho, coloração da pelagem e características morfológicas. Apesar do amplo acordo entre revisões sistemáticas, os limites taxonômicos e nomes dentro do gênero não são esclarecidos. Por exemplo, *M. bondae* (J. A. Allen, 1904) e *M. currentium* (O. Thomas, 1901) podem ser agrupados sob o nome de *M. currentium* ou considerados como duas espécies com base em sua distribuição na América Central ou do Sul (GAGER et al. 2016). Para o território brasileiro são registradas a ocorrência de seis espécies para o gênero *Molossus* (*M. aztecus* Saussure, 1860, *M. coibensis* J. A. Allen, 1904, *M. currentium* Thomas, 1901 *M. Molossus* (Pallas, 1766) *M. pretiosus* Miller, 1902 *M. rufus* E. Geoffroy, 1805) (REIS et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2014). Para o estado do Maranhão, Reis et al. (2013), registra a ocorrência de apenas duas espécies para o gênero *Molossus* sendo elas: *M. rufus* e *M. molossus*.

O estado do Maranhão, por sua extensão territorial e posição estratégica de confluência dos biomas Amazônia, Cerrado e Caatinga, e ainda por apresentar formações típicas como a mata de cocais e baixada, aparece no cenário nacional como uma das áreas de maior diversidade animal (MUNIZ, 2006). No entanto, para família Molossidae, objeto desse estudo, trabalhos moleculares, morfológicos e de presença ou ausência do vírus rábico ainda são bastante escassos.

1.3 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares têm sido amplamente usados como ferramentas em estudos de padrão de variação genética, estudos populacionais e filogenéticos, aumentando a capacidade em identificar espécie, caracterizar a biodiversidade de diversos ecossistemas brasileiros, assim como avaliar a variabilidade genética inter e intrapopulacional (ROSA; PAIVA, 2009). Neste contexto serão amplificados e sequenciados fragmentos dos genes mitocondriais rRNA 16S e Citocromo Oxidase subunidade I, para as espécies de Molossídeos de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses.

O marcador molecular rRNA 16S vem sendo bastante utilizado em estudos para a caracterização de diferentes espécies de animais onde determina o grau de

similaridade entre as espécies por ser um gene espécie-específico (COLEMAN, 2003; NAEGELE et al., 2006).

O DNA barcode é constituído de um curto fragmento de 650 nucleotídeos a partir da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Foi proposto por Hebert et al. (2003a; 2003b) como o marcador para identificação molecular ao nível de espécie. O estudo dessa região utiliza sequências que permitem identificar e designar espécies desconhecidas e espécies previamente descritas auxiliando no desvendar da diversidade (OLIVEIRA et al., 2013). Este gene demonstra ser um importante marcador molecular em animais, pois apresenta alta variabilidade interespecífica (BUENO-SILVA, 2012).

1.4 Raiva em Morcegos

A raiva é uma zoonose infecciosa aguda, que possui uma grande importância para a saúde pública, é causada pelo vírus pertencente ao gênero *Lyssavirus*, família Rhabdoviridae que compromete o sistema nervoso central (FAUQUET et al., 2005, LIMA et al., 2005). É transmitida através da saliva em contato com a pele ou mucosa, particularmente por mordedura, lambedura ou arranhadura de um animal infectado (BRASIL, 2004). Algumas espécies de morcegos se destacam como vetores de algumas doenças, entre elas a raiva, no qual os hematófagos são os responsáveis pela transmissão quase total dos casos em bovinos e equinos, infectando milhares de animais anualmente (BREDT et al., 1996; KOTAIT et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2009).

No Brasil houve um maior direcionamento em estudos sobre raiva para as espécies de morcegos hematófagos, apesar dos não hematófagos serem portadores do vírus rábico (SODRÉ et al., 2010). Os casos de raiva transmitidos por morcegos insetívoros não são raros, sua transmissão ocorre devido a manipulação incorreta desses animais infectados com o vírus (UIEDA, 1995), a saber: os Molossídeos compartilham abrigos com espécies hematófagas. Os abrigos podem ser considerados ativos para a transmissão do vírus entre espécies de morcegos quando há presença de hematófagos ou quando há possível constatação de espécies positivas para o vírus. A presença dos morcegos hematófagos nos abrigos pode estar relacionada ainda às condições ambientais favoráveis como temperatura do ambiente, umidade relativa do ar e pouca luminosidade (BREDT et al., 1998). A

infecção pode ocorrer através de diferentes interações incluindo agressões por disputa de territórios entre essas espécies (CARNEIRO, et al., 2009).

Para a família Molossidae há relato de 11 espécies portadoras do vírus rábico no Brasil (SODRÉ et al., 2010). No entanto, dentre estes, não há registro para o estado do Maranhão (PÓVOAS et al., 2012) apesar do surto da raiva em 2005 em vários municípios maranhenses, com ocorrência de 24 casos humanos (Brasil, 2005; BARBOSA et al., 2007). Uma vez isolado o vírus da raiva em morcegos a identificação das espécies envolvidas é de fundamental importância (ALBUQUERQUE, 2012). Estudos moleculares em quirópteros têm proporcionado identificação bem como, caracterização de espécies (BURLAND; WILMER, 2001).

O diagnóstico laboratorial desta enfermidade é realizado através de várias técnicas, como: técnica histológica (coloração de Sellers), técnica de Imunofluorescência Direta (IFD), prova do isolamento rábico em camundongos (prova biológica) e prova do isolamento rábico em cultivo celular e entre outras (BRASIL, 2008). Dentre estas, a técnica de IFD vem sendo bastante utilizada como teste de diagnóstico para o isolamento do vírus rábico em espécies de animais, sendo recomendada pela Organização Mundial de Saúde, é um teste simples e rápido (CASTILHO, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar através da morfologia, morfometria, craniometria e dados moleculares os morcegos da família Molossidae de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses, bem como, realizar o diagnóstico laboratorial para o vírus rábico.

2.2 Objetivos específicos

Identificar as espécies de morcegos da família Molossidae de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses utilizando a morfologia, morfometria, craniometria e sequências de genes mitocondriais;

Inferir quanto às incertezas taxonômicas e a distribuição geográfica das espécies de morcegos da família Molossidae;

Detectar presença/ausência do vírus rábico em morcegos Molossídeos ocorrentes nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses.

3. MATERIAL E MÉTODOS

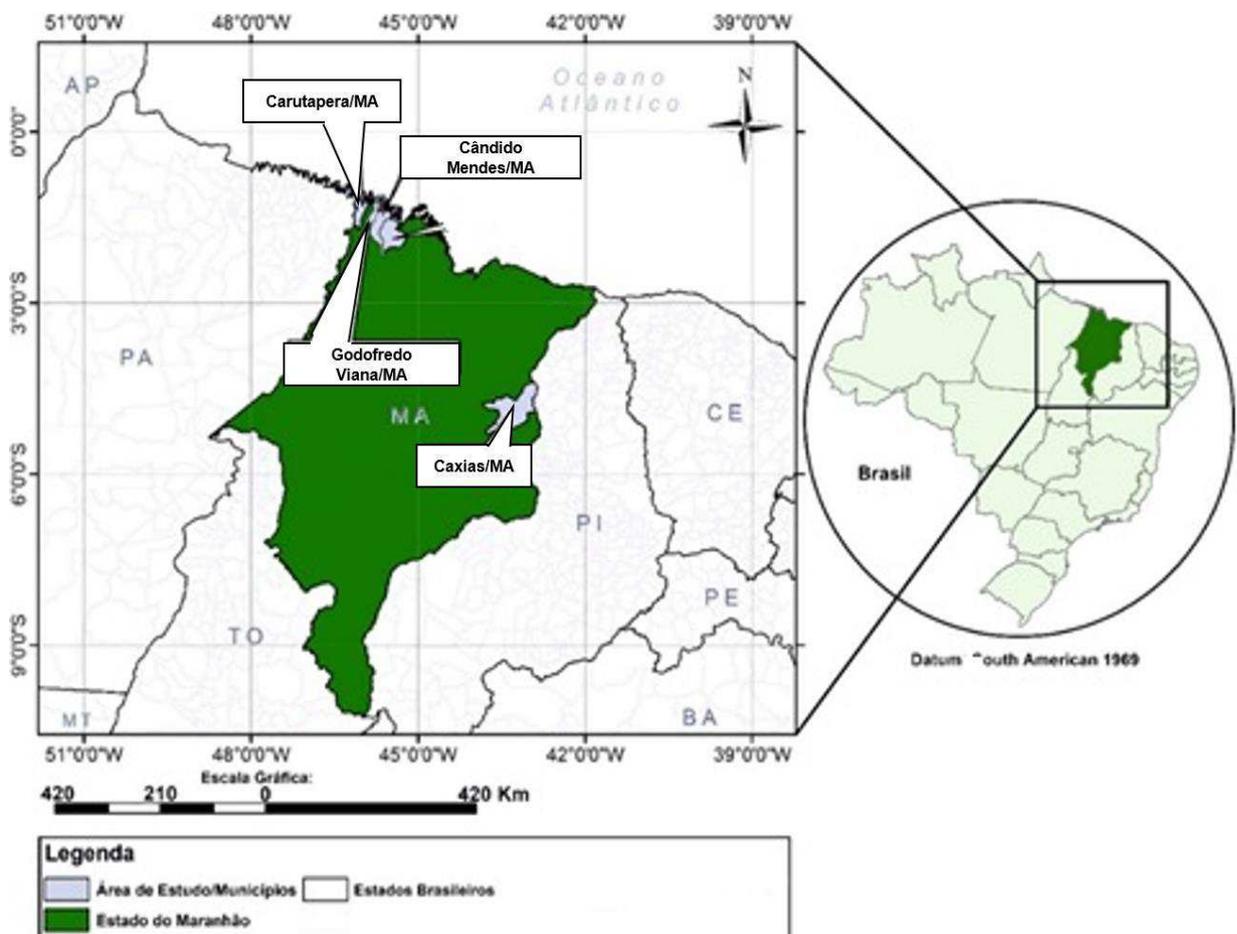
3.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado nos municípios maranhenses: Godofredo Viana, Carutapera, Cândido Mendes e Caxias (Tabela 1 e Figura 2).

Tabela 1. Municípios maranhenses e suas coordenadas geográficas

| Municípios maranhenses | Coordenadas geográficas |
|------------------------|------------------------------|
| Godofredo Viana | 1° 24' 43" S e 45° 46' 30" W |
| Carutapera | 1° 12' 25" S e 46° 1' 54" W |
| Cândido Mendes | 1° 27' 21" S e 45° 43' 32" W |
| Caxias | 4° 51' 32" S e 43° 21' 22" W |

Figura 2. Mapa do Maranhão evidenciando as áreas de estudo.



Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (2005).

Os municípios, Godofredo Viana; Carutapera e Cândido Mendes, compreendem a porção da Amazônia legal, estão localizados a oeste do território maranhense, onde a vegetação é ombrófila densa e aberta que reflete a

transacionalidade do território, possui uma grande variedade de espécies vegetais e animais, desde a década de 1960 sofre antropização com implantação das atividades da agropecuária, madeireira e mineração ampliando o desmatamento. A degradação do bioma Amazônia decorre principalmente em função do desmatamento, da falta de prática de manejo sustentável das áreas, das queimadas e da fragmentação do ecossistema. A degradação ambiental inclui a perda de biodiversidade, redução da ciclagem da água e reciclagem de nutrientes, redução da qualidade de vida, dentre outros (BRASIL, 2015).

O município de Caxias está localizado na porção leste maranhense apresenta fisionomia florestal muito úmida, alta e próximos aos cursos de água. A vegetação forma um gradiente de transição para as fisionomias de Cerrado (BEZERRA et al., 2012). A Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum (APA) pertence ao patrimônio Municipal de Caxias, foi criada pela lei nº 1464/2001, está situada nas coordenadas 04°53'30" S e 43°24'53" W, as margens da BR 316 e possui uma área de aproximadamente 3.500 hectares (ALBUQUERQUE, 2012). O clima da região é subúmido seco, com temperatura média de 27°C, a fitofisionomia é a floresta Estacional Semidecidual com predominância de babaçuais em alguns trechos (CONCEIÇÃO et al., 2012). Ocorrem dois tipos de vegetação, mata ciliar no entorno do riacho do Inhamum, com árvores de grande porte mostrando-se predominante e a vegetação do tipo cerrado ou chapadas caracterizadas por árvores tortuosas de pequeno porte, arbusto e gramíneas (CONCEIÇÃO et al., 2007; BARROS, 2012). Estudos e pesquisas na APA Inhamum vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas no intuito de conhecer a fauna e flora da região, as informações científicas geradas permitem promover a sustentabilidade e conservação das espécies presentes, bem como, a manutenção dos recursos hídricos existentes na área (BARROS, 2015).

3.2 Coleta, Preparação e Identificação do material biológico

Para coleta, preparação e identificação do material biológico ocorreram como descritas por Brasil (2012). Onde foram realizadas expedições em cada município, com duração de três noites consecutivas em pontos específicos. Para cada município as coletas tiveram durações de seis horas diárias de esforço (das 18:00 às 00:00 horas) para tanto usou-se seis redes de neblina de diferentes tamanhos (12 m x 3 m, 9 m x 3 m e 6 m x 3 m) (Figura 3). As redes foram dispostas perto de abrigos

(casas, árvores, riachos ou em trilhas) e foram fixadas com auxílio de hastes e barbantes. Foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPI's) como: luvas de couro ou de borracha, repelente de insetos, botas de borracha, roupa de campo e outros. Os espécimes coletados foram colocados em sacos de pano codificados. Foram anotados em fichas de campo os seguintes dados: horário de coleta, data e local, nome dos coletores, código do saco de pano, nome da família, espécie, sexo e estágio reprodutivo. Estes foram levados ao laboratório improvisado próximos aos locais de coleta, onde foram fotografados, ortotansados, etiquetados, retirado tecido muscular (armazenado em microtubos com álcool a 70%) para uso molecular e tecido encefálicos para o teste de (IFD). Logo em seguida foram conservados em gelo. Ao término das coletas, os espécimes foram transportados para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL) foram pesados e medidos. As medidas foram realizadas através de um paquímetro digital, foram aferidas as medidas de comprimento de: antebraço, orelha, trago, pés e cauda.

Figura 3. Em (A) Disposição das redes de neblinas abertas próximas a abrigo em (B) exemplar coletado em rede de neblina.



Fonte: GENBIMOL

Para a conservação e preparação dos exemplares, primeiramente foi injetado formol a 10% na cavidade abdominal, os mesmos, foram mantidos com a boca aberta para facilitar a identificação através da dentição, para isso foi inserido uma “bola” de algodão na boca do animal. Em seguida, os morcegos foram recobertos com a mesma solução por sete dias. Após esse período os animais foram armazenados em um recipiente contendo álcool 70%. As espécies foram identificadas com auxílio de bibliografia especializada (UIEDA et al., 2006; REIS et al., 2007; REIS et al., 2011; MIRANDA et al., 2011; BRASIL, 2012) e posteriormente

confirmada por especialistas. Os resultados aqui obtidos fazem parte de um projeto fomentado pela FAPEMA e licenciado pelo ICMBIO/SISBIO, licenças de nº 42670-3 e nº54384-1.

3.3 Técnicas Morfométricas e Craniométricas

Para as análises craniométricas e morfométricas, somente o gênero *Molossus* foi levado em consideração, pois este apresentou 56 espécimes adultos, sendo o mais representativo da família. Para a espécie *M. rufus* foi analisado oito machos e quatro fêmeas, para a espécie *M. molossus*, 13 machos e 31 fêmeas (Tabela 2).

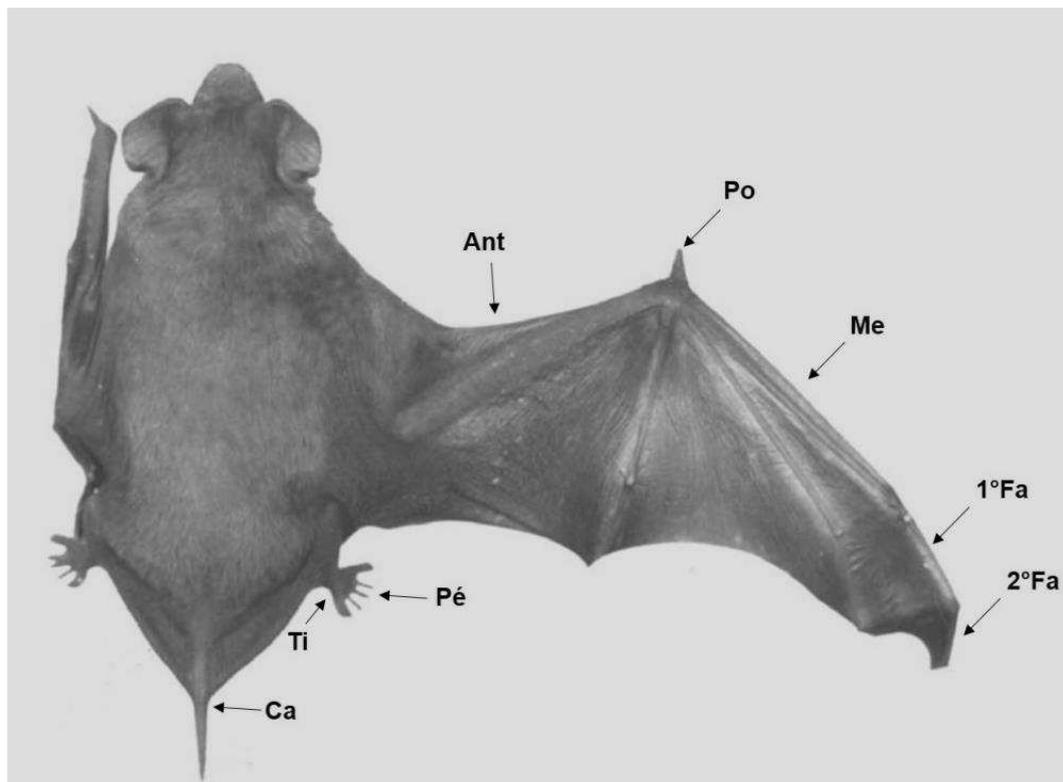
Tabela 2. Total de espécimes por localidade, espécie e sexo utilizados nas análises craniométricas e morfométricas

| Localidade | Bioma | Espécie | Macho | Fêmea | Total |
|-----------------|----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| Caxias | Cerrado | <i>M. rufus</i> | 8 | 4 | 12 |
| Godofredo Viana | Amazônia | <i>M. molossus</i> | 2 | 3 | 5 |
| Carutapera | Amazônia | <i>M. molossus</i> | 8 | 15 | 23 |
| Cândido Mendes | Amazônia | <i>M. molossus</i> | 3 | 13 | 16 |
| Total | 2 | 2 | 21 | 35 | 56 |

Foi realizada a retirada da estrutura craniana dos espécimes pela abertura bucal com o rebatimento da pele, a limpeza do crânio com o auxílio de larvas e adultos de insetos do gênero *Dermetes* (Coleoptera, Dermestidae), em um criadouro no GENBIMOL. Após a limpeza foram clareados com água oxigenada a 10%, posteriormente foram levados a estufa a uma temperatura de 30°C para secagem, em seguida, foram codificados e acondicionados individualmente em frascos limpos. Com auxílio de paquímetro manual, foram aferidas 15 medidas de comprimento externas (Figura 4) e 25 craniométricas (Figura 5), conforme Vizzoto e Taddei (1973) e Martins (2008): pé (**Pé**), cauda (**Ca**), antebraço esquerdo (**Ant E**), antebraço direito (**Ant D**), polegar (**Po**), III metacarpo (**III Me**), 1ª falange do terceiro metacarpo (**1ªFal- III**), 2ª falange do terceiro metacarpo (**2ªFal- III**), IV metacarpo (**IV Me**), 1ª falange do quarto metacarpo (**1ªFal- IV**), 2ª falange do quarto metacarpo (**2ªFal- IV**), V metacarpo (**V Me**), 1ª falange do quinto metacarpo (**1ªFal- V**), 2ª falange do quinto metacarpo (**2ªFal- V**), tíbia (**Ti**) comprimento total (**Ct**), comprimento côndilo-canino (**Cc**), comprimento basal (**Cb**), comprimento palatal (**Cpt**), Comprimento basal (**B**), comprimento da série de dentes superiores (**CM2/3S**), comprimento da série de dentes inferiores (**CM2/3I**), comprimento da mandíbula (**Cm**), Largura externa dos

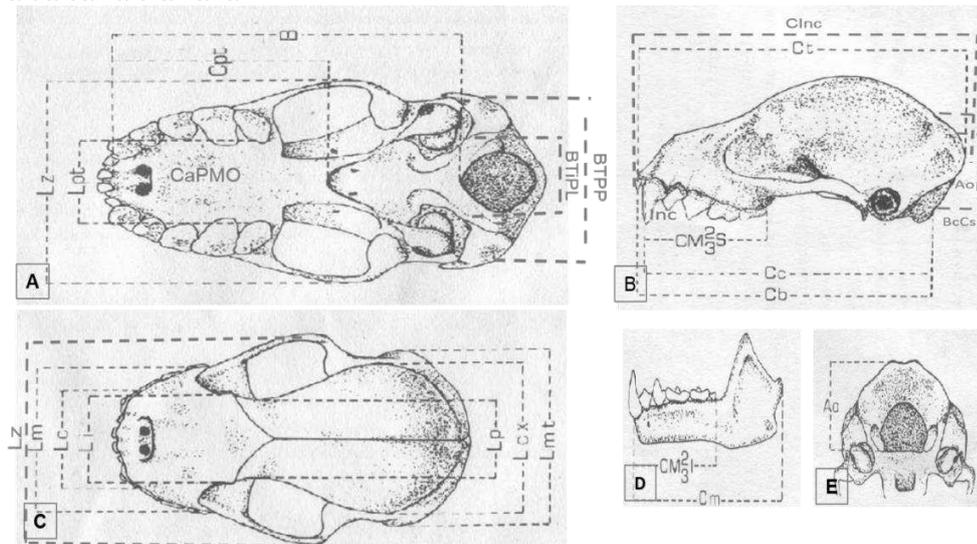
cingula-caninos (**Lc**), largura externa dos molares (**Lm**), largura interorbital (**Li**), largura posorbitária (**Lp**), largura zigomática (**Lz**), largura da caixa craniana (**Lcx**), largura mastóidea (**Lmt**), largura palatal (**Lpt**), altura da caixa craniana (**Acx**), altura do occipital (**Ao**), comprimento do canino ao incisivo (**CC+Inc**), comprimento do canino ao processo mastóideo oposto (**CaPMO**), altura da base do crânio, comprimento do nasal ao forâmen (**NaFo**), largura bula timpânica na porção mais larga (**BTil**), largura bula timpânica na porção mais próxima (**BTPP**), distância entre incisivo e o caninos (**InCa**), e a crista sagital (**BcCs**).

Figura 4. Vista dorsal da espécie de morcego Molossídeo, *Cynomops abrasus* (Temminck, 1826), mostrando os caracteres morfológicos



Fonte: Adaptado de Gregorin e Taddei (2002).

Figura 5. Medidas cranianas de quirópteros em (A) vista ventral, (B) lateral, (C) dorsal, (D) mandíbula e (E) altura da caixa craniana.



Fonte: Adaptado de Vizotto e Taddei (1983).

3.4 Análises Craniométricas e Morfométricas

3.4.1 Análises Multivariada

Os testes de suposições inerentes às bases estatísticas da análise multivariada foi realizada no software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 1993), pelo método “stepwise”, com utilização de medidas morfométricas e craniométricas, para determinar a contribuição de cada um dos caracteres, com o propósito de avaliar, através de análises multivariadas, a distinção entre as espécies e quais as medidas que mais contribuiriam para esta possível separação. Para análise da variação nos valores absolutos das medidas para machos e fêmeas foi realizado o teste de Mann-Whitney (U) destinado a comparar amostras independentes e não paramétricas.

3.4.2 Análises Discriminantes

Foram realizadas análises canônicas discriminantes entre as amostras de cada uma das duas espécies. Esta técnica maximiza a diferença entre os grupos e minimiza as diferenças dentro deles (REIS, 1988; REIS et al. 1990). A associação entre as variáveis foi testada pelo método de rotação ortogonal Varimax normalizado, que redistribuiu as variâncias dos primeiros fatores na busca de um padrão mais simples (MONTEIRO e REIS 1999; MINGOTI 2007).

A análise canônica também foi realizada para resumir a maior parte da informação original a um número mínimo de fatores em todos os grupos amostrais e originou um gráfico de dispersão das populações.

3.5 Técnicas Moleculares

O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification da PROMEGA seguindo as instruções do fabricante. Para amplificação dos genes rRNA 16S e COI foi empregada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) usando-se primers específicos (Figura 11 e Anexo B). Em seguida foi realizado o sequenciamento em um sequenciador automático de DNA ABI 3.500 (Applied Biosystems). Os protocolos de extração de DNA, PCR e reação de sequenciamento estão descritos nos anexos A, B e C.

3.6 Análises Moleculares

As sequências dos genes rRNA16S e COI foram editadas através do programa BIOEDIT, versão 7.0.5.2, (HALL, 1999) e alinhadas na ferramenta ClustalW Multiple Alingment. O número de sítios variáveis, conservados e informativos para parcimônia, matriz de divergência genética e árvores filogenéticas foram obtidas através do programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016). Para a identificação correta da espécie e análise de similaridade foram usadas as plataformas *BOLD Systems v3* (*The Barcode of Life Data Systems* - www.barcodinglife.org) e *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Como grupo externo (*outgroup*), foram usadas as sequências das espécies *Lasiurus blossevillii* (AY495479, JF448048.1) e *Lasiurus xanthinus* (AY495485, KR350090.1) oriundas do Genbank.

3.7 Técnica de Imunofluorescência Direta (IFD)

O diagnóstico laboratorial para o vírus da raiva ocorreu através da técnica IFD, realizada como descrito por Brasil (2008) no Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Maranhão, Campus São Luís. O protocolo com as etapas para o teste consta no Anexo D.

4. RESULTADOS

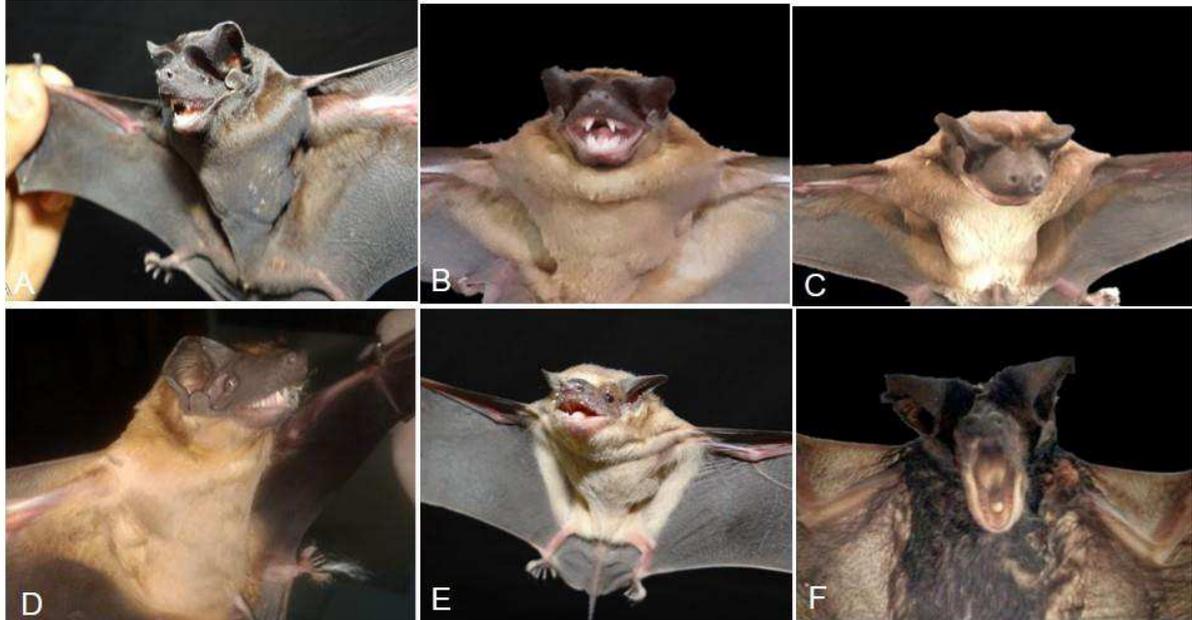
4.1 Dados morfológicos

Nesse estudo, 115 espécimes distribuídos em seis espécies e quatro gêneros, pertencentes à família Molossidae foram registrados para os biomas maranhenses (Tabela 3 e Figura 6).

Tabela 3. Espécies, biomas, localidades e n amostral da família Molossidae encontrados nos biomas maranhenses

| Espécies | Bioma | Localidade | N amostral |
|------------------------|----------|-----------------|------------|
| <i>M. rufus</i> | Cerrado | Caxias | 19 |
| <i>C. abrasus</i> | | | 3 |
| <i>C. planirostris</i> | | | 1 |
| <i>N. laticaudatus</i> | | | 2 |
| <i>M. temminckii</i> | | | 1 |
| <i>M. molossus</i> | Amazônia | Carutapera | 47 |
| | | Cândido Mendes | 33 |
| | | Godofredo Viana | 9 |
| Total | 2 | 4 | 115 |

Figura 6. Espécies de Morcegos pertencentes a família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses. Em (A) *M. rufus*, em (B) *M. molossus*, (C) *C. planirostris*, (D) *C. abrasus*, (E) *M. temminckii* e em (F) *N. laticaudatus*.



Fonte: GENBIMOL

4.1.1 *Molossus rufus* (Geoffroy, 1805)

A espécie *M. rufus* de ocorrência no bioma Cerrado maranhense (APA do Inhamum), apresentou pelos do dorso castanho escuro, quase preto ou castanho-avermelhado, com as porções basais um pouco mais claras. A base do uropatágio recoberta de pelos, orelhas arredondadas e unidas na linha média sobre a cabeça, fórmula dentária: i:1/1; c:1/1; pm: 1/2; m: 3/3=26 e antebraço variou de 47,71 a 48,69 mm. Dentre as espécies analisados para a APA do Inhamum *M. rufus* foi a que apresentou o maior número de espécimes. Quanto ao sexo foram nove fêmeas e dez machos, todas as fêmeas adultas e quanto aos machos, dois jovens e os demais adultos. No Brasil há registro para os Estados do Alagoas, Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (REIS et al., 2011).

4.1.2 *Molossus molossus* (Pallas, 1766)

A espécie *M. molossus* de ocorrência no bioma Amazônia, apresentou coloração castanho escuro ao marron-avermelhado, orelhas arredondadas e unidas na linha mediana sobre a cabeça, antítrego bem desenvolvido, presença da quilha na região mediana do focinho. Presença de pelos sobre o lábio superior. O comprimento do antebraço variou de 39 a 42mm, fórmula dentária: i: 1/1, c:1/1, pm:1/2, m:3/3=26. Foram encontrados 29 espécimes machos e 60 fêmeas, dos machos, três jovens e 26 adultos, quanto as fêmeas, dois jovens e 58 adultos. No Brasil esta espécie está amplamente distribuída com registro para ao estado de Acre, Amazônia, Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Mato grosso do Sul, Mato grosso do Norte, Pará, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Roraima, Rondônia, Rio grande do Sul, Santa Catarina, Paraíba e Tocantins (REIS et al 2007; REIS et al., 2013).

4.1.3 *Cynomops abrasus* (Temminck, 1826)

A espécie *C. abrasus* de ocorrência na APA do Inhamum foi identificada por apresentar as seguintes características: coloração da pelagem dorsal castanho escuro e ventral levemente mais clara, orelhas espessas e triangulares, narinas sem verrugas, fórmula dentária i: 1/2, c:1/1, pm: 1/2, m: 3/3=26 e antebraço que variou de 45,3 a 49,3 mm. Todos os espécimes foram fêmeas, dois adultos e um jovem. No

Brasil possui registro para os Estados do Amazonas, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (REIS et al., 2013).

4.1.4 *Molossops temminckii* (Williams e Genoways, 1980)

M. temminckii de ocorrência na APA do Inhamum apresentou pelagem dorsal variando de castanho claro a chocolate e a coloração ventral levemente mais clara e acinzentada. As orelhas delgadas, triangulares, e bem separadas entre si, narinas envolvidas por uma fileira de verrugas pequenas e pontiagudas, fórmula dentária i: 1/2, c: 1/1, pm: 1/2, m: 3/3 = 28; antebraço variando de 29,98 a 30,5 mm. Para essa espécie foi coletado um espécime fêmea adulto. No Brasil há registro para os Estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo, Tocantins e Maranhão (REIS et al., 2011; OLÍMPIO et al 2016).

4.1.5 *Nyctinomops laticaudatus* (E. Geoffroy, 1805)

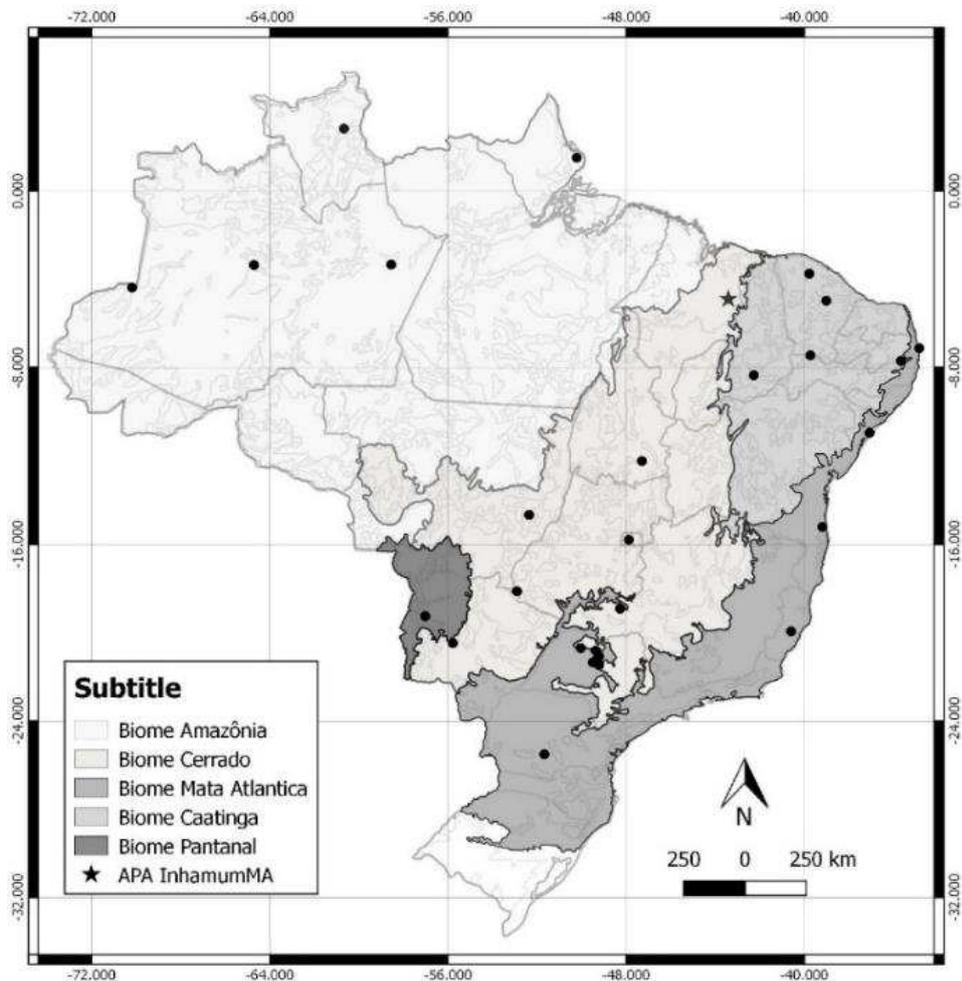
N. laticaudatus registrado para a APA do Inhamum apresentou pelagem dorsal castanho escuro e ventral levemente mais clara, orelhas projetadas para frente unidas na linha mediana sobre a cabeça, incisivos superiores distintamente separados entre si, fórmula dentária: i:1/2, c: 1/1, pm: 2/2, m: 3/3 o antebraço variou de 40, 64 a 45,6 mm. Dois espécimes fêmeas foram coletados para essa espécie ambos adultos. No Brasil há registro para os Estados do Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (REIS et al., 2011).

4.1.6 *Cynomops planirostris* (Peters, 1866)

C. planirostris de ocorrência na APA Inhamum, mostrou coloração da pelagem dorsal castanho avermelhado, pelagem ventral levemente mais clara, essa espécie é muito semelhante a *C. abrasus*, porém o crânio é menor. O comprimento do antebraço variou de 34,80 a 34,70mm, fórmula dentária: i:1/1, c:1/1, pm:1/2, m:3/3=26. Um espécime macho adulto foi coletado para essa espécie. No Brasil há registro para os estados de Espírito Santo, Mato Grosso, São Paulo, Pernambuco, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná, Bahia, Ceará, Sergipe,

Paraíba, Piauí, Amapá, Roraima, Amazonas (REIS et al., 2013; SANTOS et al., 2015). No entanto, não havia registro para o estado do Maranhão, bem como, para os biomas Cerrado e Amazônia maranhenses, o presente estudo registra a ocorrência dessa espécie para o estado do Maranhão, especificamente para o bioma Cerrado (Figura 7). Aumentando 411,30Km na distribuição geográfica para essa espécie.

Figura 7. Mapa de distribuição geográfica da espécie *C. planirostris* para o Brasil.



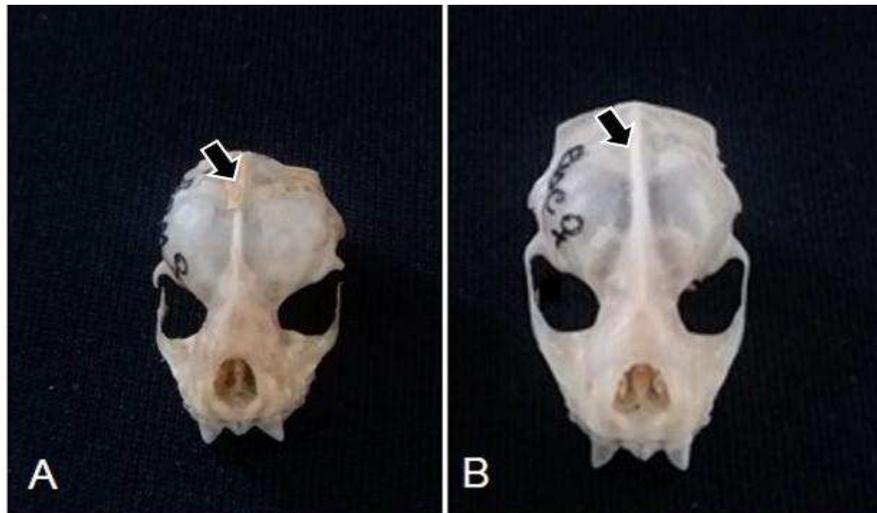
Fonte: Adaptado de Santos et al.2015

4.2 Análises Morfométricas e Craniométricas

Embora as espécies *M. rufus* e *M. molossus* serem bastante similares, podendo ser diferenciadas apenas pelo tamanho de alguns caracteres, como a diferença entre o tamanho dos crânios e da crista sagital, evidente nas duas espécies (Figura 8). Os resultados deste estudo mostraram diferenças morfométricas e craniométricas significativas para as espécies do gênero *Molossus*.

A comparação entre machos e fêmeas através do teste de Mann Whitney (U) detectou heterogeneidade na maioria dos caracteres utilizados.

Figura 8. Crânio das espécies *M. rufus* e *M. molossus* em (A) *M. molossus* em (B) *M. rufus* pertencentes aos biomas maranhenses.



Fonte: Autora

4.3 Análises Estatísticas

4.3.1 Análise Multivariada

Na análise estatística fatorial e de comunalidade foram selecionadas as medidas que permaneceriam na análise. O valor 0,7 foi utilizado para a mensuração do grau de significância de cada uma das características trabalhadas a partir do método de rotação por Varimax que redistribuiu as variâncias dos primeiros fatores na busca de um padrão mais simples. Todas as medidas selecionadas pela análise fatorial atenderam a níveis aceitáveis de explicação, tanto pelas cargas significativas, quanto pela alta comunalidade, ou seja, quantia de variância no compartilhamento com as demais medidas da análise (HAIR JUNIOR et al. 2009). Para os machos as medidas craniométricas e morfométricas originaram dois fatores, o fator um mostrou-se significativo com 10 variáveis para a morfometria, e 21 variáveis para a craniometria. Para as fêmeas o fator um, apresentou positivamente relacionado com quatro variáveis significativas para medidas morfométricas e 19 para medidas craniométricas, e o fator dois com três variáveis para medidas craniométricas (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado para medidas morfométricas para machos e fêmeas, valores amostrados > 0,7

| Machos | | | Fêmeas | | |
|------------------|-----------|----------|------------------|-----------|----------|
| Variáveis | Fator 1 | Fator 2 | Variáveis | Fator 1 | Fator 2 |
| Ant. E | -0.964830 | - | Ant. E | -0.818771 | - |
| Ant. D | -0.951118 | - | Ant. D | -0.833929 | - |
| Po | -0.940431 | - | III Me | -0.785430 | - |
| III Me | -0.932814 | - | IV Me | -0.768898 | - |
| 1° Fal. | -0.849412 | - | - | - | - |
| IV Me | -0.992547 | - | - | - | - |
| 1° Fal. | -0.922084 | - | - | - | - |
| V me | -0.839075 | - | - | - | - |
| 1° Fal. | -0.733759 | - | - | - | - |
| Ti | -0.746210 | - | - | - | - |
| Eigenvalue | 9.414058 | 1.898173 | Eigenvalue | 4.578164 | 2.141486 |
| % Total Variance | 62.76039 | 12.65449 | % Total Variance | 30.52109 | 14.27658 |
| Cumulative% | 62.76039 | 75.41487 | Cumulative% | 30.52109 | 44.79767 |

Tabela 5. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação de VARIMAX, normalizados para medidas craniométricas para machos e fêmeas, valores amostrados >7,0

| Machos | | | Fêmeas | | |
|------------------|----------|----------|------------------|----------|----------|
| Variáveis | Fator 1 | Fator 2 | Variáveis | Fator 1 | Fator 2 |
| Ct | -0.81377 | - | Ct | - | 0.863092 |
| Cb | -0.75968 | - | Cb | - | 0.824138 |
| Cc | -0.84340 | - | B | -0.76191 | - |
| B | -0.71663 | - | C-M/3I | 0.91096 | - |
| Cpt | -0.85544 | - | Cm | -0.94752 | - |
| C-M/3S | -0.82914 | - | Lc | 0.85507 | - |
| C-M/3I | -0.91547 | - | Lm | -0.90922 | - |
| Cm | -0.78568 | - | Lp | 0.94710 | - |
| Lm | -0.71819 | - | Lz | -0.72512 | - |
| Lp | -0.81695 | - | Lcx | - | 0.764754 |
| Lz | -0.89231 | - | Lmt | -0.97819 | - |
| Lcx | -0.79485 | - | Lpt | 0.79529 | - |
| Lmt | -0.90843 | - | Acx | -0.84970 | - |
| Acx | -0.82492 | - | CC+Inc | 0.94749 | - |
| CC+Inc | -0.80754 | - | Cca-PMO | -0.79136 | - |
| Cca-PMO | -0.95500 | - | NaFo | -0.91325 | - |
| NaFo | -0.94967 | - | BTiL | 0.96782 | - |
| BTiL | -0.74591 | - | BPTT | -0.95616 | - |
| BTPP | -0.84281 | - | InCa | 0.87890 | - |
| InCa | -0.84504 | - | Ct | - | 0.863092 |
| BcCs | -0.87988 | - | - | - | 0.824138 |
| Eigenvalue | 16.26369 | 3.25733 | Eigenvalue | 13.88197 | 4.41348 |
| % Total Variance | 65.05475 | 13.02933 | % Total Variance | 55.52788 | 17.65393 |
| Cumulative% | 65.05475 | 78.08407 | Cumulative% | 55.52788 | 73.18181 |

4.3. 2 Análise canônica discriminante

Para as espécies do gênero *Molossus*, a discriminação entre as variáveis pelo método de *stepwise* foi significativa, tanto para os machos $\lambda=00020$, $F= 26,8$ $=21.516$ $p< 0001$, quanto para as fêmeas com valores de $\lambda= 00430$, $F= 36,59$ $=8.8476$ $p< 0000$. Contudo, alguns caracteres demonstraram valores de λ parcial, cujas contribuições foram mais expressivas para a distinção entre os grupos, sendo altura do occipital (**Ao**) = 0,440 comprimento do canino ao processo mastóideo oposto (**CaPMO**) =0,482 para fêmeas, e comprimento do canino ao incisivo (**CC+Inc**) com 0,59 e a largura da bula timpânica na porção mais próxima (**BTTP**) com valor de = 0,84 para os machos.

Tomando por base medidas cranianas e morfométricas externas das espécies analisadas foram gerados gráficos de dispersão territoriais (Figuras 9 e 10). Tanto para machos quanto para fêmeas, verificou-se sobreposições das medidas entre os espécimes *M. molossus* pertencente ao bioma Amazônia. Estes, compartilham similaridade, pois estão agrupadas com mais proximidade a direita. Os espécimes de *M. rufus* pertencentes ao bioma Cerrado encontram-se a esquerda, indicando que houve discriminação entre as espécies.

Figura 9. Análises canônicas das variáveis craniométricas (A) e morfométricas (B) para as fêmeas do gênero *Molossus*. CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana; CM=Candido Mendes; CX = Caxias.

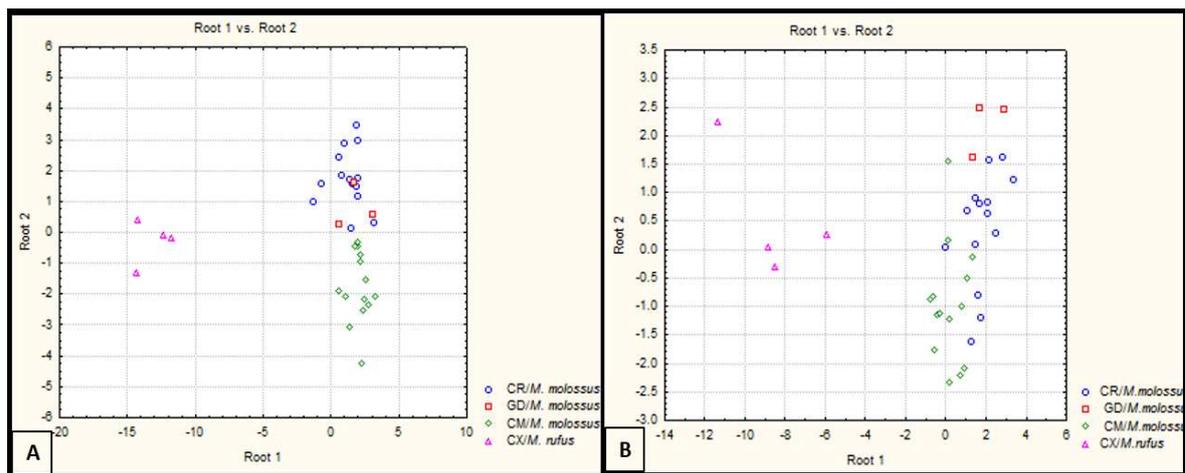
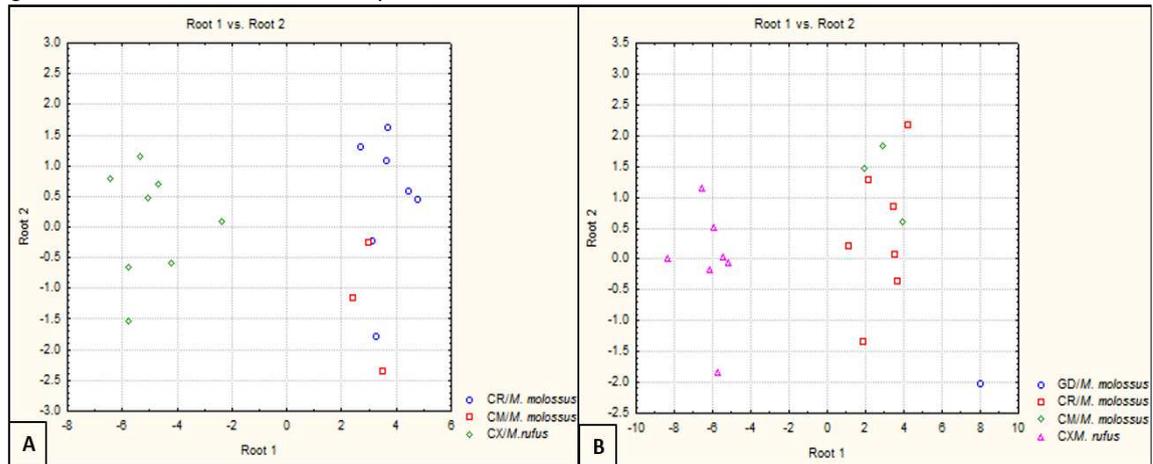


Figura 10. Análise canônica das variáveis craniométricas (A) e morfométricas (B) para os Machos do gênero *Molossus*. CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana; CM=Cândido Mendes; CX = Caxias.



4.4 Análises Moleculares

4.4.1 Gene rRNA 16S

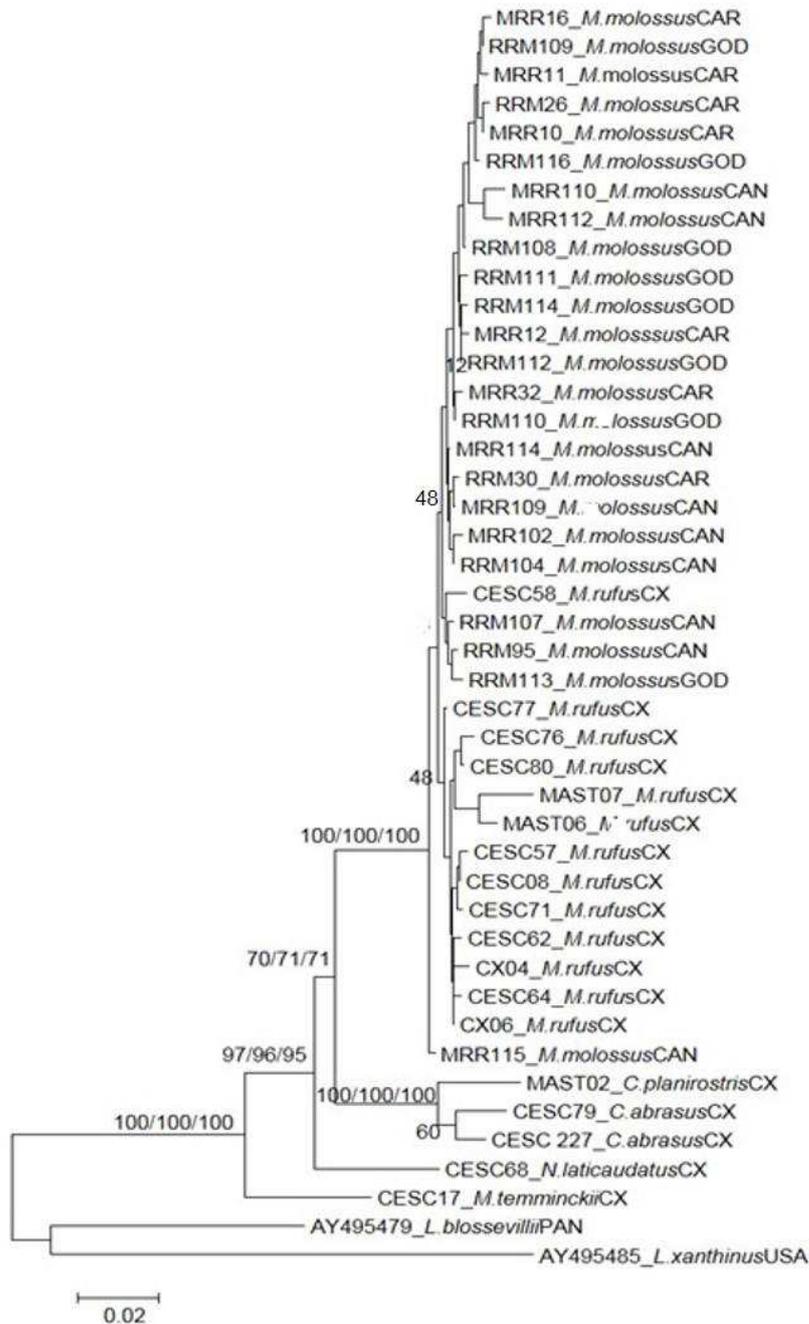
Para o gene rRNA 16S obteve-se um fragmento de 551 pares de bases para 102 sequências das espécies de morcego pertencentes a família Molossidae, sendo 78 oriundas do bioma Amazônia e 24 oriundas do bioma Cerrado (Tabela 6), onde 448 sítios foram conservados, 103 variáveis, 70 informativos para a parcimônia.

Tabela 6. Sequências do gene rRNA 16S pertencentes às espécies família Molossidae dos diferentes biomas maranhenses

| Espécies | Bioma | Localidade | N amostral |
|------------------------|----------|-----------------|------------|
| <i>M. rufus</i> | Cerrado | Caxias | 17 |
| <i>C. abrasus</i> | | | 3 |
| <i>C. planirostris</i> | | | 1 |
| <i>N. laticaudatus</i> | | | 2 |
| <i>M. temminckii</i> | | | 1 |
| <i>M. molossus</i> | Amazônia | Carutapera | 42 |
| | | Cândido Mendes | 27 |
| | | Godofredo Viana | 9 |
| Total | 2 | 4 | 102 |

As árvores filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML), Máxima Parcimônia (MP), foram geradas utilizando o algoritmo Tamura Nei, juntamente com Agrupamento de Vizinhos (NJ) mostraram topologias similares. A espécie *M. rufus* pertencentes ao bioma Cerrado formou um clado fortemente suportado (100% de *bootstrap*) com a espécie *M. molossus* pertencente ao bioma Amazônia formando grupo irmão com as espécies do gênero *Cynomops* (*C. abrasus* e *C. planirostris*) com 70% de *bootstrap*. As espécies *M. temminckii* e *N. laticaudatus* ocuparam uma posição basal em relação a todas as outras espécies (Figura 11).

Figura 11. Árvore filogenética pelo método Agrupamento de Vizinhos, com o algoritmo Tamura Nei, para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene rRNA16S. Os valores corresponde ao *bootstrap* de Agrupamento de Vizinhos, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, da esquerda para a direita respectivamente. CX = Caxias; CM = Cândido Mendes; CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana.



A média de divergência intraespecífica para o gene rRNA 16S variou de 0 a 1,2%. A divergência interespecífica para as Espécies *M. rufus* e *M. molossus* variou de 0.6 a 3.2%. (Dados não amostrados). Diante disso, a média de divergência interespecífica entre *M. molossus* e *M. rufus* variou de 1,3 a 1,6%. No entanto, a espécie *M. temminckii* apresentou uma divergência de 8,5% com *M. rufus* e de 8,3 a

8,5% com a espécie *M. molossus*. *C. abrasus* apresentou uma divergência de 6,8% com *M. rufus* 7,2 a 7,5% com *M. molossus*, e 9,6% com *M. temminckii*. A espécie *N. laticaudatus* apresentou uma divergência interespecífica de 6,6% com *M. rufus* e de 6,3 a 6,5% com *M. molossus*, 7,6% com *M. temminckii* e 8,0% com *C. abrasus*. A espécie *C. planirostris* apresentou uma divergência interespecífica de 7,5% com *M. rufus*, e de 7,8 a 8,1% com *M. molossus*, 10,7% com *M. temminckii*, 3,9% com *C. abrasus* e 8,1% com *N. laticaudatus* (Tabela 7).

Tabela 7. Matriz de distância genética nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura Nei, para as espécies pertencentes a família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses através do gene rRNA16S. Divergência interespecífica (abaixo da diagonal) e média intraespecífica (diagonal em negrito)

| Espécie | Média de Distância Genética | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1. <i>M. rufus</i> CX | 1,2 | | | | | | | |
| 2. <i>M. molossus</i> CR | 1,4 | 0,6 | | | | | | |
| 3. <i>M. molossus</i> CM | 1,3 | 0,6 | 0,6 | | | | | |
| 4. <i>M. molossus</i> GV | 1,6 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | | | | |
| 5. <i>M. temminckii</i> CX | 8,5 | 8,3 | 8,4 | 8,5 | n/c | | | |
| 6. <i>C. abrasus</i> CX | 6,8 | 7,3 | 7,2 | 7,5 | 9,6 | 1,4 | | |
| 7. <i>N. laticaudatus</i> CX | 6,6 | 6,4 | 6,3 | 6,5 | 7,6 | 8,0 | 0,0 | |
| 8. <i>C. planirostris</i> CX | 7,5 | 7,8 | 7,8 | 8,1 | 10,7 | 3,9 | 8,1 | n/c |

n/c= não calculado; CX = Caxias; CM = Cândido Mendes; CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana.

4.4.2 Gene COI

Para o gene COI obteve-se um fragmento de 645 pares de bases para 94 sequências das espécies de morcego pertencentes a família Molossidae, sendo 70 oriundas do bioma Amazônia e 24 oriundas do bioma Cerrado (Tabela 8), onde 450 sítios foram conservados, 195 variáveis, 126 informativos para a parcimônia. Para a identificação da espécie foi estimado o grau de similaridade das sequências nucleotídicas obtidas no presente trabalho com as sequências depositadas na plataforma BOLDSystems (*The Barcode of Life Data System*) (Tabela 9).

Tabela 8. Espécies, biomas, localidades e espécimes de morcegos pertencentes a família Molossidae analisados para o gene COI

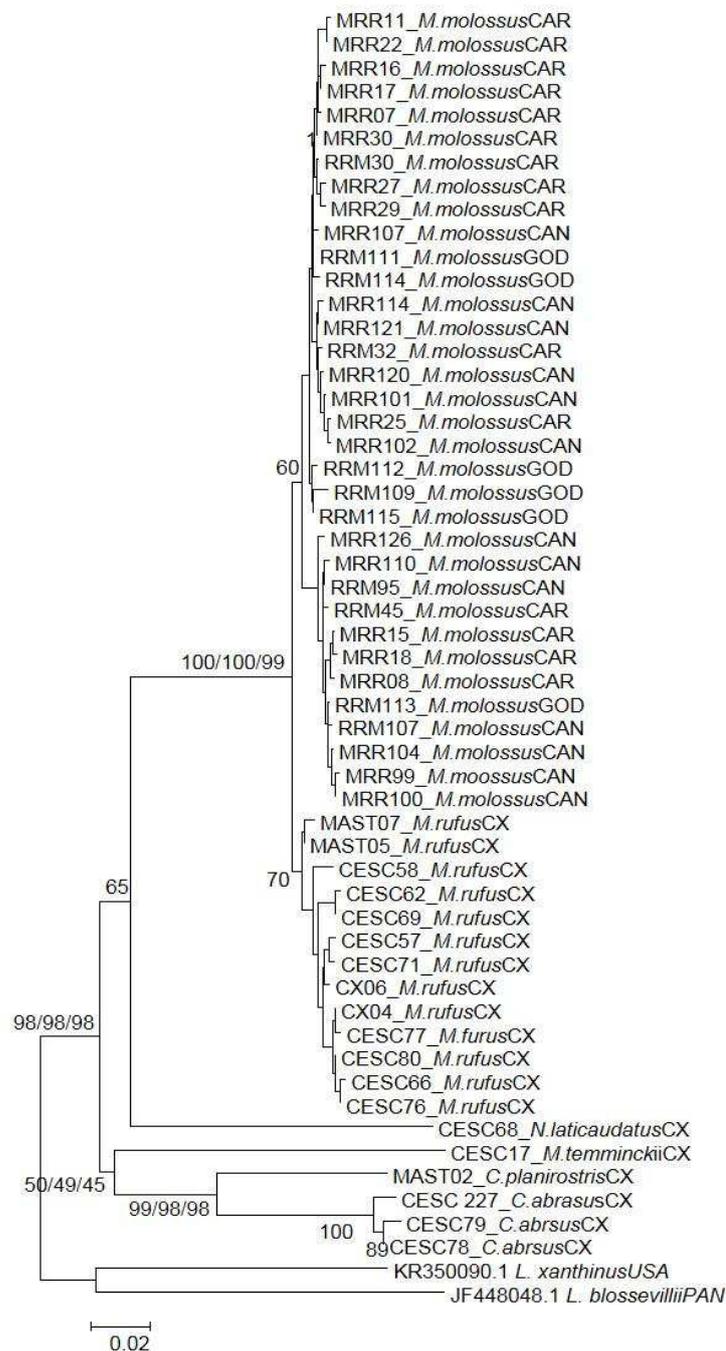
| Espécies | Bioma | Localidade | N amostral |
|------------------------|----------|-----------------|------------|
| <i>M. rufus</i> | Cerrado | Caxias | 18 |
| <i>C. abrasus</i> | | | 3 |
| <i>C. planirostris</i> | | | 1 |
| <i>N. laticaudatus</i> | | | 1 |
| <i>M. temminckii</i> | | | 1 |
| <i>M. molossus</i> | Amazônia | Carutapera | 37 |
| | | Cândido Mendes | 26 |
| | | Godofredo Viana | 7 |
| Total | 2 | 4 | 94 |

Tabela 9. Similaridades de sequências obtidas para as espécies pertencentes a família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses

| Códigos | Identificação Morfológica | Identificação Molecular | Similaridade% |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| CX 04 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 100,00 |
| CX06 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,61 |
| MAST 07 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,52 |
| MAST 05 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,52 |
| CEC 57 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,42 |
| CEC 58 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 100,00 |
| CEC 62 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,52 |
| CEC 66 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,52 |
| CEC69 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,00 |
| CEC 71 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,42 |
| CEC 76 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,37 |
| CEC 77 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,84 |
| CEC 80 | <i>M. rufus</i> | <i>M. rufus</i> | 99,84 |
| MRR 07 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,84 |
| MRR 08 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,90 |
| MRR 11 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,66 |
| MRR15 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,64 |
| MRR16 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,61 |
| MRR17 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,42 |
| MRR18 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,91 |
| MRR22 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,53 |
| RRM30 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,37 |
| RRM32 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,55 |
| RRM45 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 97,43 |
| MRR25 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,08 |
| MRR27 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,22 |
| MRR29 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 97,80 |
| MRR30 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,30 |
| MRR99 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,75 |
| MRR100 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 97,49 |
| MRR 101 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,04 |
| MRR102 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,17 |
| RRM107 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,00 |
| MRR104 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,06 |
| MRR107 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,81 |
| MRR110 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,07 |
| MRR114 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,84 |
| MRR120 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,68 |
| MRR121 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 100,00 |
| RRM95 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,84 |
| MRR126 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,53 |
| RRM111 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,81 |
| RRM109 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 98,51 |
| RRM112 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,22 |
| RRM113 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,69 |
| RRM114 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,61 |
| RRM115 | <i>M. molossus</i> | <i>M. molossus</i> | 99,69 |
| CEC68 | <i>N. laticaudatus</i> | <i>N. laticaudatus</i> | 99,05 |
| CEC78 | <i>C. abrasus</i> | <i>C. abrasus</i> | 99,00 |
| CEC79 | <i>C. abrasus</i> | <i>C. abrasus</i> | 98,00 |
| CEC227 | <i>C. abrasus</i> | <i>C. abrasus</i> | 98,00 |
| MAST02 | <i>M. planirostris</i> | <i>M. planirostris</i> | 99,00 |
| CEC17 | <i>M. temminckii</i> | <i>M. temminckii</i> | 98,00 |

Árvores filogenéticas foram obtidas e independentemente do método usado tiveram topologias similares revelando a monofilia para a família Molossidae. As espécies *M. rufus* e *M. molossus* agruparam-se fortemente (*bootstrap* de 100%). A espécie *C. planirostris* agrupou-se com *C. abrasus* com 98% de *bootstrap* (Figura12).

Figura 12. Árvore filogenética pelo método Agrupamento de vizinhos, com o algoritmo Tamura Nei, para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene COI. Os valores correspondem ao *bootstrap* de Agrupamento de Vizinhos, Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança, da esquerda para a direita respectivamente. CX = Caxias; CM = Cândido Mendes; CR = Carutapera; GV = Godofredo Viana.



A média de divergência intraespecífica para as espécies pertencentes a família Molossidae variou de 0,7 a 1,0%. A distância genética para as espécies do gênero *Molossus*, *M. rufus* e *M. molossus*, variou de 0,9 a 3,7 (Dados não amostrados). Quando estimada a média a divergência interespecífica para essas espécies variou de 2,2 a 2,4%. A espécie *N. laticaudatus* apresentou divergência de 16,9% com *M. rufus* e 16,3 a 16,5% com *M. molossus*. A espécie *C. abrasus* apresentou uma divergência de 17,8% com *M. rufus*; 17,2 a 17,3% com *M. molossus* e 19,3% com *N. laticaudatus*. *C. planirostris* apresentou uma divergência de 17,6% com *M. rufus*; 17,0 a 17,3% com *M. molossus*; 21,0% com *N. laticaudatus* e 11,5% com *C. abrasus*. A espécie *M. temminckii* apresentou uma divergência interespecífica de 19,3% com *M. rufus*; 18,9 a 19,0 % com *M. molossus*; 24,7% com *N. laticaudatus*; 20,1% com *C. abrasus* e 11,5% com *C. planirostris* (Tabela 10).

Tabela 10. Matriz de distância genética nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura Nei, para as espécies de morcego pertencentes a família Molossidae de ocorrência em biomas maranhenses através do gene COI. Divergência interespecífica (abaixo da diagonal) e intraespecífica (diagonal em negrito)

| Espécie | Média de Distância Genética | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 1. <i>M. rufus</i> CX | 1,0 | | | | | | | |
| 2. <i>M. molossus</i> CR | 2,2 | 0,8 | | | | | | |
| 3. <i>M. molossus</i> CM | 2,4 | 0,8 | 0,8 | | | | | |
| 4. <i>M. molossus</i> GV | 2,3 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | | | | |
| 5. <i>N. laticaudatus</i> CX | 16,9 | 16,5 | 16,3 | 16,4 | n/c | | | |
| 6. <i>C. abrasus</i> CX | 17,8 | 17,3 | 17,2 | 17,2 | 19,3 | 1,0 | | |
| 7. <i>C. planirostris</i> CX | 17,6 | 17,3 | 17,0 | 17,2 | 21,0 | 11,5 | 1,0 | |
| 8. <i>M. temminckii</i> CX | 19,3 | 19,0 | 19,0 | 18,9 | 24,7 | 20,1 | 11,5 | n/c |

n/c: Não calculado; CX = Caxias; CM = Cândido Mendes; CR = Carutapera; GD = Godofredo Viana.

4.5 Vírus Rábico em Morcegos Molossídeos

O diagnóstico para o vírus da raiva mostrou-se negativo para as espécies analisadas independentemente de serem não hematófagas (Anexo E).

5. DISCUSSÃO

5.1 Identificação Morfológica e Molecular

As características morfológicas das espécies da família Molossidae para os biomas maranhenses estão de acordo com a literatura (GREGORIN e TADDEI 2002; REIS et al., 2007; REIS et al., 2011; REIS et al., 2013) por tanto, considerando essas características, são válidas as espécies: *M. rufus*, *M. molossus*, *C. abrasus*, *M. temminckii*, *N. laticaudatus* e *C. planirostris*. Como caracteres diagnósticos os Molossídeos apresentam um uropatágio espesso, diferente dos membros das famílias Vespertilionidae, Natalidae, Thyropteridae e Furipteridae. A cauda dos Molossídeos se estende geralmente em um terço ou mais de seu comprimento total; a pelagem é geralmente aveludada, as orelhas são bem desenvolvidas, espessas e providas de uma quilha interna proeminente na maioria das espécies; outros caracteres individuais são a presença de pelos diminutos rígidos e curvos, estes, definem inequivocamente os morcegos Molossídeos (GREGORIN e TADDEI 2002).

Este estudo registrou a ocorrência de *C. planirostris* para o Estado, esta espécie ocorre em todos os biomas brasileiros, exceto os Pampas (Santos et al., 2015). Para o Cerrado maranhense a APA do Inhamum tem apresentado uma grande diversidade de morcegos apesar dos estudos ainda serem incipientes, Olímpio et al. (2016), por exemplo, adicionou 13 novos registros embora com ausência de *C. planirostris*. Isso pode ser explicado pelo fato dos morcegos Molossídeos voarem acima da copa das árvores dificultando assim a coleta de suas espécies

Embora a Amazônia seja o bioma de maior riqueza de espécies do país, o bioma ainda é pouco amostrado para quirópteros, com poucas áreas relativamente estudadas, apenas 23,9% da Amazônia dispõe de registros para o grupo. Bernad et al. (2011), registra para este bioma, na região maranhense a ocorrência de 15 espécies, de Molossídeos. Neste estudo, para a Amazônia maranhense foi registrado apenas a ocorrência de uma espécie para a família Molossidae: *M. molossus*.

Os Molossídeos possuem o hábito alimentar insetívoros e no bioma Amazônia maranhense evidenciou-se uma rica diversidade de insetos, no entanto só foi registrada uma espécie de Molossídeo. Uma hipótese é que a Amazônia maranhense apesar de ser um bioma com uma grande quantidade de alimentos ofertados constitui-se de uma mata muito fechada, com elevada densidade, árvores

altas, dificultando o voo e a captura de algumas espécies de morcegos como os Molossídeos, que voam acima da copa das árvores. Já no Cerrado maranhense (APA do Inhamum) onde esperava-se uma menor diversidade de espécies devido a quantidade de alimento ofertada pelo bioma, foi coletado cinco das seis espécies de Molossídeos. No entanto, este bioma constitui-se de vegetação aberta, rasteira e pequenas árvores espessas, com menos obstáculos, o que pode ter contribuído para a grande diversidade de espécies encontradas. Além do mais, espécies de Morcegos de pequeno porte como *M. molossus* se adaptariam e viveriam melhor as condições de biomas como a Amazônia, e espécies maiores como *M. rufus* as condições do ambiente como o Cerrado.

Com o uso da ferramenta molecular foi possível caracterizar e identificar as espécies, para o gene rRNA 16S e COI evidenciou-se uma divergência intraespecífica baixa quando considerado cada espécie como um táxon. Quando observado a variação interespecífica verificou-se uma divergência alta entre os gêneros, mas especificamente baixa nas espécies do gênero *Molossus*. Este resultado está de acordo com a literatura para este gênero (MARKESIN et al., 2008; CLARE et al., 2011). Observou-se ainda que as espécies *M. temminckii* e *N. laticaudatus* ocuparam posição mais basal em relação a todas as outras espécies, há relatos de que cariótipos dessas espécies apresentam um grau de homologia menor quando comparadas com outros Molossídeos (MORIELLE e VERSUTE et al. 1996).

A análise através do gene COI para as espécies *C. abrasus* e *C. planirostris* corroboram com os de Moras et al. (2016), em um estudo usando genes mitocondriais COI e Cit b, onde o agrupamento para as espécies do gênero *Cynomops* foi observado, e como grupo mais próximo *Molossops*, apesar da história taxonômica de *Cynomops* ser complexa para alguns autores (PETERS et al., 2002; GREGORIN e TADDEI, 2002; REIS et al., 2011). *Molossops* já foi considerado como subgênero de *Cynomops*, no entanto, com base em análises de parcimônia e de dados de enzimas de restrição, Peters et al. (2002), reconheceu *Cynomops* como gênero válido, e forneceu evidências adicionais para o reconhecimento de *C. paranus* e *C. mexicanus* como espécies distintas, de *C. planirostris* e *C. greenhalli*, respectivamente (MORAS et al., 2016; REIS et al., 2017).

5.2 Complexo *M. rufus* x *M. molossus*

Neste estudo através de dados craniométricos e morfométricos foi possível identificar as espécies *M. rufus* de ocorrência para o bioma Cerrado e *M. molossus* para o bioma Amazônia. Tais análises foram realizadas separadas por sexo, devido ao maior número de variáveis com diferenças significativas. Foi observada entre machos e fêmeas divergências quantos as médias cranianas e corpóreas, onde os machos apresentaram o maior número de medidas para discriminar as espécies. De acordo com Gregorin e Taddei (2000); Reis et al. (2007) há dimorfismo sexual para a família Molossidae, uma vez que os machos são maiores que as fêmeas, apresentando diferenças no tamanho corporal. Nos machos, o comprimento total do crânio varia de 16,0 a 19,4 mm, a largura zigomática de 10,0 a 11,7 mm. Nas fêmeas o comprimento total do crânio varia de 15,5 a 18, mm e a largura zigomática de 9,5 a 11,1mm, estas variações estão de acordo com este estudo.

A análise discriminante mostrou que nas fêmeas a diferenciação para o grupo estaria primeiramente relacionada ao Ao e CaPMO e para os machos CC+Inc e BTTP, dados estes corroborado com os reportados por Vissoto e Taddei (1973), como sendo caracteres altamente fundamentais para separar espécies, onde a espécie *M. rufus* apresenta o crânio mais robusto do que *M. molossus* que apresenta um crânio menor e mais alongado do que *M. rufus*. Dolan (1989), López-González e Presley (2001) concluíram que os crânios de *Molossus* são extremamente difíceis de distinguir exceto pelo tamanho. Embora as espécies aqui estudadas podem ser diferenciadas pelo tamanho de alguns caracteres morfológicos, a espécie *M. rufus* do bioma Cerrado apresentou-se maior do que *M. molossus* do bioma Amazônia, concordando com a literatura visto que a espécie *M. rufus* é considerada uma das maiores espécies dentro do gênero.

Desde os tempos de Darwin que existe um grande interesse em saber a distribuição geográfica das espécies e os padrões associados a esta. Quando há constatação de que população de uma mesma espécie está distribuída em diferentes biomas e que algumas características estão associadas ao tipo de habitat em que se encontram é possível comparações entre caracteres morfológicos, ecolocalização, aspectos celulares e dieta. Neste estudo as espécies *Molossus* foram encontradas em biomas diferentes, mas mesmo assim foi possível verificar que *M. molossus* e *M. rufus* se diferenciam. Por exemplo: além do tamanho dos crânios, da crista sagital e do tamanho corporal, a coloração da pelagem os

diferenciaram, uma vez que *M. rufus* possui coloração enegrecida e *M. molossus* uma coloração com o tom de cinza ou marrom-avermelhado.

Pimenta et al. (2014), em uma análise morfométrica e craniométrica para as espécies *M. molossus*, *M. rufus* e *M. coibensis* de ocorrência no bioma Mata Atlântica verificaram que apesar de *M. rufus* e *M. molossus* apresentarem tamanhos semelhantes, foram distinguidas morfologicamente para tais análises e que os morcegos da Mata Atlântica apresentaram-se maiores do que os morcegos pertencentes a outros biomas relacionando isso ao tipo de dieta encontrado em cada bioma. O trabalho realizado por Rattrimomanarivo et al. (2009) com Molossídeos em Madagascar revelou claras diferenças entre as populações de *Chaerephon leucogaster* (Grandidier, 1869). Tais discrepâncias se deram entre ambientes distintos o que demonstra que o ambiente pode influenciar nas características de uma espécie (SOUZA, 2011), isso foi evidenciado neste estudo entre as espécies *M. rufus* e *M. molossus*, pois *M. rufus* apresentou-se bem maior em relação a *M. molossus*.

Quando estimada a média de distância genética entre as espécies do gênero *Molossus*, para *M. rufus* e *M. molossus* verificou-se valores baixos variando de 1,3 a 1,6% com o gene rRNA 16S e de 2,2 a 2,4% com o gene COI. No entanto de acordo com os critérios propostos por Bradley e Baker (2006), para o gene COI, valores de divergência genética abaixo de 2% são indicativos de divergência intraespecífica e valores entre 2 a 11% são frequentemente indicativos de variações interespecíficas, o que foi observado para esse estudo, uma vez que as espécies *M. rufus* e *M. molossus* apresentaram uma média de divergência acima de 2%. No entanto, esta divergência é tão baixa quanto a média intraespecífica encontrada para algumas espécies de morcegos. Clare et al. (2006) em uma análise através do gene COI encontrou índices de divergência genética interespecífica para Filostomídeos de 2,18%. Morielle-Versute et al. (1996) identificaram extensa similaridade quanto ao cariótipo destas duas espécies. Essas observações de baixa divergência genética, cariótipos similares e difícil diagnose morfológica são fortes indicativos que este gênero precisa ser melhor estudado, considerando uma distribuição amostral mais ampla a fim de buscar os limites de distribuição das espécies, bem como, a sua taxonomia.

Para González-Ruiz et al. (2011) a complexidade taxonômica é devida as similaridades morfológicas, as interpretações entre diferenças inter e intraespecífica,

ao elevado nível de dimorfismo sexual e a falta de conhecimento dos limites de distribuição geográfica das espécies. Parte das diagnoses de várias espécies dentro do gênero certamente é, em algum nível, inaplicáveis, fazendo com a que a taxonomia atual de *Molossus* seja insatisfatória. Em alguns casos a identificação precisa só é possível com o uso de caracteres cranianos e dentários o que torna a identificação dentro do grupo mais difícil (LOUREIRO, 2014). De acordo com Gager et al., (2016) poucos estudos aplicam informações moleculares para abordar questões relativas à taxonomia do gênero *Molossus*.

Dolan (1989), em uma ampla revisão taxonômica reconheceu sete espécies para o gênero *Molossus* sendo elas: *M. molossus*, *M. aztecus*, *M. rufus*, *M. pretiosus*, *M. coibensis*, *M. bondae* e *M. sinaloae* e sinonimizou *M. trinitatus* como *M. sinaloae*, e a subespécie *M. pretiosus macdougalli*, Goodwin (1956), foi considerada como sinônimo de *M. rufus*. Considerou *M. aztecus* como espécie válida, ao contrário de Freeman (1981). *Molossus cherriei*, *M. barnesi* e a subespécie *M. aztecus lambi* foram sinonimizadas com *M. coibensis*. Posteriormente, outros estudos voltaram a reconhecer oito espécies com a revalidação de *M. barnesi* (SIMMONS e VOSS, 1998; SIMMONS, 2005).

Em um estudo conduzido por Jennigs (2000), o número de espécies para o gênero *Molossus* foi reduzido para cinco: *M. ater*, *M. bondae*, *M. molossus*, *M. pretiosus* e *M. sinaloae*. As espécies, *M. coibensis* e *M. aztecus* não foram reconhecidas como válidas. Lopéz-González e Presley (2001) concluíram que o nome *M. currentium* tem precedência sobre *M. bondae*. Contudo, estudos de variação individual são escassos e o reconhecimento dos táxons baseado nas diagnoses fornecidas permanece impreciso e incerto. Para o Brasil há ausência de estudos taxonômicos e de amplas revisões para o gênero. No país existem registros de seis espécies do gênero: *M. molossus*, *M. aztecus*, *M. pretiosus*, *M. rufus*, *M. currentium*, e *M. coibensis*, (DOLAN, 1989; GREGORIN e TADDEI, 2000; REIS ET AL., 2007; EGER, 2008; GREGORIN et al., 2011).

Dolan (1989), propõe várias relações de semelhanças entre espécies de *Molossus*, no qual relata em seu estudo o complexo do gênero, destacando a similaridade entre tamanho e pelagem. O gênero é definido por uma série de características anatômicas, tais como: orelhas de tamanho mediano e levemente triangulares, antitrágo arredondado e destacado da borda basal da orelha, incisivos superiores em linha com os caninos e afilados e convergentes, lábios superiores

lisos, sem sulcos ou verrugas, mas com uma ilhota de pelos curtos, negros e apicalmente espatulado abaixo das narinas, crista sagital bem desenvolvida, principalmente nos machos (REIS et al., 2007; GREGORIN et al., 2011). Parte desta variação já foi estudada e analisada, mas as análises se restringem, em sua maioria, a amostras provenientes de faixas estreitas das distribuições das espécies ou apenas a pequenos grupos de espécies dentro do gênero (JENNINGS et al., 2000; LÓPES-GONZALEZ e PRESLEY, 2001; SOUZA, 2011). Neste estudo ampliou-se a faixa de distribuição para o gênero *molossus*, no entanto nesta faixa só foi evidenciada duas espécies das seis registradas para o Brasil, onde a diagnose craniométrica e moleculares foram usadas para distinguir as espécies.

5.3 Vírus Rábico em Molossídeos

Apesar de trabalhos relatando a ocorrência de diagnóstico positivo para o vírus da raiva em espécies de morcegos pertencentes a família Molossidae, neste estudo o resultado do teste de IFD mostrou-se negativo para o vírus da raiva nas espécies de Molossídeos. Esses dados estão de acordo com os mostrados por Póvoas et al. (2014), em um estudo sobre a raiva em quirópteros no estado do Maranhão, onde as espécies não hematófagas apresentaram-se negativas. No entanto diferenciou de Silva et al. (2014) que isolou o vírus da raiva para a espécie de morcego *M. rufus* através da técnica de IFD e prova biológica, no estado do Nordeste em Pernambuco.

No Brasil, durante o período de 1980 a 1991, foram registrados 991 casos de raiva, 5,2% dos casos tiveram o morcego como transmissor do vírus rábico (SCHNEIDER et al., 2009). Dados publicados pela Secretaria de Vigilância e Saúde (SVS), do Ministério da Saúde (MS) mostram que entre janeiro e agosto de 2008, houve apenas um caso de raiva humana no Brasil, ocorrido no município de Godofredo Viana, no estado do Maranhão. Entre populações de morcegos hematófagos e não hematófagos analisados, foram registrados a ocorrência de 75 quirópteros portadores do vírus rábico (BRASIL, 2008).

Os resultados negativos para o vírus da raiva evidenciado nesse estudo, pode ser explicado pelas medidas de controle de população de morcegos hematófagos da espécie *Desmodus rotundus* realizadas pela Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED) através do programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH), que desenvolve ações específicas, além de contar

com parcerias com a Secretaria de Estado da Saúde, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) e Prefeituras Municipais

6. CONCLUSÃO

Os caracteres morfológicos e moleculares registram a ocorrência de seis espécies para a família Molossidae, sendo elas: *M. rufus*, *C. abrasus*, *N. laticaudatus*, *M. temminckii* e *C. planirostris* para o bioma Cerrado e *M. molossus* para bioma Amazônia;

A espécie *C. planirostris* é registro novo para o estado do Maranhão;

As análises craniométricas e morfométricas, apontam a existência de dois *status* taxonômicos para *Molossus*: *M. rufus* para o bioma Cerrado e *M. molossus* para o bioma Amazônia;

As medidas craniométricas foram as que mais contribuíram para discriminar as espécies, especificamente as dos machos com maior número de variáveis;

As informações geradas através dos marcadores rRNA 16S e COI corroboraram com as identidades morfológicas, craniométricas e morfométricas;

As amostras de tecido encefálico submetidas ao teste de IFD para verificar a presença ou ausência do vírus rábico apresentaram resultados negativos.

REFERENCIAS

ALBUQUERQUE, P.; SILVA, L. A. M.; CUNHA, M. C.; SILVA, C.J.; MACHADO, J. L. M.; MELO, M. L.; ALENCAR, V. I. B.; Vigilância epidemiológica da raiva em Morcegos no Município de Moreno, Pernambuco, Brasil. **Revista Biociências**, Taubaté, v. 18, nº.2, p. 5 - 13, 2012.

BARBOSA, T.F.S.; ROSA, E.S.T.; MEDEIROS, D.B.A.; BEGOT, A.L.; LIMA, R. J. S.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.T.N. Epidemiologia Molecular do vírus da raiva no estado do Pará no período de 2000 a 2005: Emergência e transmissão por morcegos hematófagos (*Desmodus rotundos*). **Caderno de Saúde e Coleta**, Rio de Janeiro, v15, nº 3, p. 329-348, 2007.

BARROS, M. C. (Org.) et al. **Biodiversidade da Área de Proteção Ambiental do Inhamum**. São Luís: EUMA, 142p. 2012.

BARROS, M. C.; FRAGA, E.C.; GONÇALO, M. C. Área de Proteção ambiental municipal do Inhamum: Caracterização e Contextualização para manejo e desenvolvimento sustentável. In: NETA, R. N. F. (Org). **Áreas de Proteção Ambiental do Maranhão**. São Luis: UEMA, cap. 17, p. 295-301, 2015.

BEZERRA, K. C.; OLIVEIRA, R.J. F.; CONCEIÇÃO, E; PAVAN, D.; FRAGA, E. C.; BARROS, M.C. In: BARROS et al. **Biodiversidade na Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum**, 1º ed. Caxias MA, editora: UEMA, 2012.

BRETT, A.; ARAÚJO, F.A.A.; CAETANO-JUNIOR, J.; RODRIGUES, M.G.R.; YOSHIKAWA, M.; SILVA, M.M.S. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, Brasília, 117p. 1998.

BIANCONI, G. V.; MIKICH, S. B.; PEDRO, W. A. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do Município de Fênix, Noroeste do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, nº. 4, p. 943-945, 2004.

BRASIL. Geografia do Maranhão. **Maranhão**, 2015.

BRASIL. **Manual de diagnóstico laboratorial da raiva**, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde, Departamento de vigilância Epidemiológica, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**: SVS-Surto de Raiava humana Transmitida por morcegos no município de Portel - Pará, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no estado do Maranhão**. 2005.

BRASIL. Secretaria estadual de saúde. Centro Estadual de Vigilância em Saúde. **Guia de Manejo e Controle de Morcegos: técnicas de Identificação Capturas e Coletas**. Porto Alegre, CEVS/ RS, 2012.

BRADLEY, R.D, BAKER R.J, Speciation in mammals and the Genetic Species Concept. *J Mammal* 87: 643-662, 2006.

BERNARD, E.; TAVARES, V.C.; SAMPAIO, E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. **Biota Neotropica**. vol. 11, no. 1. 2011.

BRETT, A. F. A.; ARAÚJO, F. A.; CARDOSO, M.; SILVA, M. M. S.; HAYASHI, M. M. HARMANI, N. M. S.; MASSUNAGA, P. N. T.; BURER, S. P. PORTO, V. A. R. UIEDA, W. **Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle**. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. 1996.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudo de Biologia Ambientee Diversidade** v. 34, nº83, p.157-163, 2012.

BURLAND, T. M.; WILMER, J. M. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of the bat populations. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v.76, nº.3, p.389-409, 2001.

CASTILHO, J. G.; LAMAMOTO, K.; YOSHITAKA, J. O. L.; SCHEFFER, J.C.; JUNIOR, P.C.; OLIVEIRA, N. R.; MACEDO, C. I.; ACHKAR, S. M.; CARRIERI, M.L.; KOTAIT, I. Padronização e aplicação da técnica de isolamento do vírus da raiva em células de neuroblastoma de camundongo (N2A) Patterning and appliance of virus isolation techniques in mice neuroblastoma cells (N2A). **Boletim epidemiológico Paulista**, v. 4, nº.47, p. 12-18, Novembro, 2007.

CARNEIRO, N.F.F.; CALDEIRA, A. P. C.; ANTUNES, L.A.; CARNEIRO, V.F.; CARNEIRO, G.F. Raiva em morcegos *Artibeus lituratus* em Montes Claros, Estado de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(4):449-451, jul-ago, 2009.

CLARE, E.L. LIM, B. K.; ENGSTROM, M.D.; EGER, J.L.; HEBERT, P.D. **DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana**. *Molecular Ecology Notes* (2006).

CLARE, E. L.; LIM, B.K.; FENTON, M. B.; HEBERT, P. D. N. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **Ploese One**. July 2011. Volume 6. 2011.

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics** v. 19, n. 7, p. 370-75, 2003.

CONCEIÇÃO, G. M.; FERNANDES, R. S.; BRITO, E. S.; DE PAULA-ZÁRATE, E. L. Diversidade Florística de Pteridófitas da Área de Preservação Ambiental do

Inhamum, Caxias, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 411-413, jul. 2007.

CONCEIÇÃO, G. M.; RUGGIERI, A. C.; SIVA, E. O.; NUNES, de C. S.; GALZERANO, L. NERES, L. P. Flórua fanerogâmica da Área de Proteção Ambiental Municipal Inhamum, Caxias MA, Brasil. In: BARROS, M. C. (Org). **Biodiversidade da Área de Proteção Ambiental Municipal Inhamum**, São Luis: UEMA, cap. 02. p. 22-24, 2012.

DOLAN, P. G. 1989. Systematics of Middle American mastiff bats of the genus *Molossus*. Special Publications, **Texas Tech Museum University**, 29: 1-71.

FABIAN, M. E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. In N. R. Reis, A. L. PERACCHI, E. A. PEDRO.; LIMA I. P. (eds.), **Morcegos do Brasil**, Londrina, p. 149-166, 2007.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. Virus taxonomy. In: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, **Academic Press**, p. 630-634, 2005.

FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R, VRIJENHOEK R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology Biotechnology**. Oct; 3(5): 294-9, 1994.

FREEMAN. A multivariate study of the family Molossidae (mammalia, chiroptera): morphology, ecology, evolution. **Mammalogy Papers: University of Nebraska State Museum**. v.3, n. 3. 1981.

GAGER, Y.; TARLAND, E.; LIECKFELDT, D.; MÉNAGE, M.; BOTERO-CASTRO, F.; ROSSITER, S. J.; KRAUS, R. H. S.; LUDWIG, A.; DECHMANN, D. K. N. The Value of Molecular vs. Morphometric and Acoustic Information for Species Identification Using Sympatric Molossid Bats. **Plos one**. v.11, n.3, 2016.

GONZALEZ-RUIZ, N., J. RAMÍREZ-PULIDO e J. ARROYO-CABRALES. A new species of mastiff bat (Chiroptera: Molossidae: *Molossus*) from Mexico. **Mammalian Biology**, 76: 461–469. 2011.

GREGORIN, R; V.A. TADDEI. Chave artificial para a identificação de Molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **Mastozoología Neotropical** v.9, n°.1, p. 13-32. 2002.

GREGORIN, R., GONÇALVES E., AIRES, C. C. & CARMIGNOTTO, A. P. 2011. Mocegos (Mammalia: Chiroptera) da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins: composição específica e considerações taxonômicas. **Biota Neotropical**, 11. (Disponível em www.biotaneotropica.org.br/v11n1/pt/fullpaper?bn03811012011+pt).

HAIR Jr., J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E. & TATHAM, R.L. Análise multivariada de dados. 6.ed. Porto Alegre, Bookman, 688p. 2009. a HALL, T.A. Bio Edit: **a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis**. Department of Microbiology. North Carolina State University, 1999.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 270:313–322, 2003a.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWARD, J. R. Barcoding animal life: Cytochrome c Oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences**, 270:96–99, 2003b.

JENNINGS B. J., BEST, T. L. RAINEY, J. C, BURNETT, S. E. 2000. *Molossus pretiosus*. **Mammalian Species**, 635: 1–3.

KOTAIT, I.; CARRIERI, M.L.; CARNIELI JÚNIOR, P.; CASTILHO, J.G.; OLIVEIRA, R. DE N.; MACEDO, C.I.; FERREIRA, K.C.S.; ACHKAR, S.M. Reservatórios silvestres do vírus da raiva: um desafio para a saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, n. 40, p.1-10, 2007.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054. 2016.

KUNZ, T. H.; LUMSDEN, L. F. Ecology of cavity and foliage roosting bats. In: **BatEcology**. THOMAS, H. KUNZ e M. BROCK FENTON (Eds.).The University of Chicago Press, Chicago, 2003.

LIMA, E.F.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S.; GOMES, A.A.B.; LIMA, F.S. Sinais clínicos, distribuição das lesões no sistema nervoso central e epidemiologia da raiva em herbívoros na região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n°. 4, p. 250-264, 2005.

LÓPEZ-GONZÁLEZ C. e PRESLEY S. J .Taxonomic Status of *Molossus bondae* J. A. Allen, 1904 (Chiroptera: Molossidae), with description of a new subspecies. **Journal of Mammalogy**, 82 (3): 760–774. 2001.

LOUREIRO, L.O. Sistemática de *Molossus* (mammalia: chiroptera: molossidae) com ênfase nas espécies ocorrendo no brasil. **Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia**. Instituto de Ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

MACDONALD, L. D. Bats. in: **the Encyclopedia of Mamals**. Andromeda Oxford Limited, Oxfords Shire, United Kingdom, 2001.

MARCHESIN S.R.C., M.R. BEGUELINI, K.C. FARIA, P.R.L. MOREIRA & E. MORIELLE-VERSUTE Assessing genetic variability in bat species of Emballonuridae, Phyllostomidae, Vespertilionidae and Molossidae families (Chiroptera) by RFLP-PCR. **Genetics and Molecular Research** 7 (4): 1164-1178, 2008.

MARTINS, F. M. **Filogeografia intraespecífica do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae)**. Tese (Doutorado) – Instituto

de Biociências da Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia – Genética. 153 p. 2008.

MIRANDA, J. M. D.; BERNARDI, I. P.; PASSOS, F. C. Chave **ilustrada para determinação dos morcegos da Região Sul do Brasil**. Curitiba, 2011.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 297p. 2007.

MONTEIRO, L. R e S F REIS. **Princípios de morfometria geométrica**. Ribeirão Preto, Editora Holos, 198p. 1999.

MORAS, L. M.; TAVARES, V.C.; PEPATO, A.R.; SANTOS, F.R.; GREGORIN, R. Reassessment of the evolutionary relationships within the dog-faced bats, genus *Cynomops* (Chiroptera: Molossidae). **Zoologica Scripta**, 9 January. 2016

MOREIRA, P. R. L. **Análise de Marcadores Moleculares RAPD em espécies de Morcegos dos Gêneros *Eumops Molossus*, *Eptesicus*, *Myotis* e *Aetibeus* (Chiroptera, Mammalia)**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual, José do Rio Preto -SP, 2004

MORIELLE-VERSUTE, E, VARELLA-GARCIA, M. TADDEI, V. A. **Karyotypic patterns of seven species of molossid bats (Molossidae, Chiroptera)** *Cytogenetic Cell Genet* . 72:26-33. 1996.

MUNIZ, F. H. A vegetação de transição entre a Amazônia e o Nordeste: Diversidade e estrutura. **Serie e Agroecologia** - UEMA. São Luís. 2006.

NOGUREIRA, M. R.; LIMA, I. P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V.C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Journal of species lists and distribution**, 2014.

NOWAK, R. M. **Walker's Bats of the World**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 278, 1994.

OLÍMPIO, P. M.; VENTURA, M. C. S.; MASCARENHAS, M. J. O.; NASCIMENTO, D.C. N.; ANDRADE, F. A. G.; FRAGA, E.C.; BARRO, M.C. Bat fauna of the Cerrado savanna of eastern Maranhão, Brazil, with new species occurrences. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 3. 2016.

OLIVEIRA, J. A.; CRISPIM, B. A.; MARTINS, N. M.; SILVA, A.O.; ROSA, P. L.; ROCHA, M. P.; GRISOLIA, A.B. Sequências de gene mitocondrial para identificação de espécies animais. **Revista colombiana ciência animal** v.5, n°. 2, p.396-407, 2013.

PAGLIA, A. P.; GUSTAVO A. B. da FONSECA. ANTHONY B. R.; GISELA H.; LUDMILLA M. S. A.; ADRIANO G. C.; YURI L. R. L.; LEONORA P. C.; SALVATORE S.; Maria C. M. K.; Sérgio L. M.; VALÉRIA, C. T.; RUSSELL, A.; MITTERMEIER e JAMES L. P. **Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil/ Annotated Check list**

of Brazilian Mammals. 2ª Edição, Occasional Papers In Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. 76pp, 2012.

PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN.; W. O.; STICE, L.; GRBOWSKI, G. **The simple fool's guide to PCR**, v. 2.0. University of Hawaii, Honolulu, 1991.

PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; FILHO, H. O. Ordem Chiroptera. In: N. R. Reis, A. L. PERACCHI, W. A. PEDRO; I. P. LIMA (eds.). **Mamíferos do Brasil**. Governo do Paraná/SEMA/ SBZ, Curitiba, p. 155–234, 2006.

PETERS, S. L.; LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D. Systematics of dog-faced bats (Chiroptera) by RFLP-PCR. **Journal Genetics and Molecular Research**. S. P. Brasil, 2008. (*Cynomops*) based on molecular and morphometric data. **J. Mammal.**, v. 83, n. 4, p. 1097-1110, 2002.

PIMENTA, V.; FONSECA, B. S.; HOPPE, J. P. M.; DITCHFIELD, A. D. First occurrence of *Molossus coibensis* Allen, 1904 (Chiroptera, Molossidae) in Atlantic Forest. *Chiroptera Neotropical* 20(1): 1237-1242, July 2014.

PÓVOAS, R.D.; CHAVES, P.N.; BEZERRA, D. C.; PINHEIRO, M.F.N.; Raiva em quirópteros no estado do Maranhão um estudo retrospectivo. **Revista brasileira Ciência e Veterinária**, v. 19, nº.3, p. 163-166, 2012.

RATRIMOMANARIVO, F.H.; GOODMAN, S.M.; STANLEY, W.T.; NAIDOO, T.; TAYLOR, P.J.; LAMB, J.; Geographic and phylogeographic variation in *Chaerephon leucogaster* (Chiroptera: Molossidae) of Madagascar and the western Indian Ocean islands of Mayotte and Pemba. **Acta Chiropterologica** 11: 25-52. 2009.

REIS S.F.L.M. Pessoa, e R.E. Strauss. Application of size free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. **Revista Brasileira de Genética** 13: 9-520. 1990.

REIS S.F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**. 4: 571-580. 1988.

REIS, N. R; PERACCHI, A. L; LIMA, I. P; NOGUEIRA, M. R; FILHO, H. O. Ordem Chiroptera. in: **Mamíferos do Brasil**, Londrina, cap.07. p -155-439, 2011.

REIS, N.R dos; PERACCHI, A. L; PEDRO, W. A; LIMA, I. P. Sobre Morcegos do Brasil. In: **Morcegos do Brasil**. Londrina: edição do autor, p.18-19, 2007

REIS, N.R; PERACCHI, L.A; PEDRO, A. W. Ordem Chiroptera. In: N. R. Reis, A. L. PERACCHI, W. A. PEDRO; I. P. LIMA. **Mamíferos do Brasil**. Paraná: edição do autor, p. 155–234. Curitiba, 2006.

REIS, N. R; PERACCHI, A. L; FREGONEZI, M.N; SHIBATTA, O. A. **Morcegos do Brasil: Guia de Campo**. 1.ed. Rio de Janeiro, Technical Books, p.177-2005, 2013.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R. **Marcadores Moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de Espécies de interesse Zootécnico**. Embrapa Cerrado, Planaltina, D. F, 2009.

SANTOS, T.C.M.; LOPES, G. P.; NETO, A.S.C.; VALSECHI, J.; MARQUEZ-AGUIAR, A. New records of *Cynomops planirostris* (Peters, 1865) (Chiroptera, Molossidae) for the state of Amazonas and its updated distribution in Brazil. **Check List** v.11, n. 6, Novembro, 2015.

SOUZA, D. A. S.; Análise Morfométricas de *Molossus molossus* (Chiroptera Molossidae) ao longo de um gradiente latitudinal no Brasil. **Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**. Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

SCHNEIDER, M. C; ROMIJN, P. C; UIEDA, W; TAMAYO, H; SILVA da, D. F; BELOTTO, A; SILVA da, J. B; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? **Revista. Panam Salud Publica**, v.25, n.º.9, 2009.

SCHNEIDER, M. C; ROMIJN, P. C; UIEDA, W; TAMAYO, H; SILVA da, D. F; BELOTTO, A; SILVA da, J. B; LEANES, L. F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: An emerging zoonotic disease in Latin America? Rev. **Panam Salud Publica**, 2009.

SILVA, L. A. M.; FILHO, T. P. S.; SILVA, R. R.; SILVA, E. M. V. G.; MACHADO, J. L. M. Isolamento do vírus rábico em *Molossus rufus* (E. Geoffroy,1805) (Chiroptera: Molossidae) no nordeste do Brasil. **Revista Biociências**, v.20, n.º 2, p. 1-4, 2014.

SIMMONS, N.B. Order Chiroptera, p. 312-529. *In*: D.E. WILSON & D.M. REEDER (Eds). **Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore, Johns Hopkins University Press, 3 ed, [s.i.], 2142p. 2005.

SODRÉ, M.M.; GAMA, A.R.; ALMEIDA, M.F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Revista do instituto de Medicina Tropical**, v. 52, n.º2, p. 75-78, 2010.

SPRADLING, A. C., BELLEN, H. J., LEVIS, R. W., LIAO, G., HE, YUCHUN., CARLSON, J. W., TSANG, G., HOLM, M. E., ROBIN, H.P., SCHULZE, K. L. HIESINGER, P.R., RUBIN, G.M., HOSKINS, R.A., HIESINGER, P.R. **The BDGP Gene Disruption Project** June 1, vol. 167 no. 2761-781, 2004.

STATSOFT INC. (Tulsa, Estados Unidos). STATISTICA 3.0. **Tulsa**, v. 1. 1993.

TADDEI, V. A. Os morcegos. Pp.249-283. *In*: **Insetos e outros invasores de residências** (Mariconi, F. A. M., coord.). "Biblioteca de Ciências Agrárias Luis de Queirós", USP, Piracicaba, SP, 1ª ed., 460 pp, 1999.

TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T. F. S.; CARRIERI, M. L.; BRANDAO, P. E.; PINHEIRO, A. S.; BEGOT, A. L.; WADA, M. Y.; DE OLIVEIRA, R. C.; GRISARD, E. C.; FERREIRA, M.; DA SILVA LIMA, R. J.; MONTEBELLO, L.;

MEDEIROS, D. B. A.; SOUZA, R. C. M.; BENSABATH, G.; CARMO, E. H.; VASCONCELOS, P. F. C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerging Infection Disease*. v. 12, n. 8, p. 1197 - 1202, 2006.

UIEDA, W.; ESTER, M.; SANTOS, C. F. **Chave de Campo para Identificação de Morcegos Brasileiros**, v. 100, nº 4, p. 1-3, 2006.

UIEDA, W.; ESTER, M.; SANTOS, C. F. **Chave de Campo para Identificação de Morcegos Brasileiros**, vol. 100, no. 4, p. 1-3. n, 2006.

UIEDA, W.; HARMANI, N. M.S.; SILVA, M.M.S. Raiva em Morcegos Insetívoros (Molossidae) no Sudeste do Brasil. *Revista saúde pública* v. 29, nº 5, p. 393-397, 1995.

VIZZOTO, L. D.; TADDEI, V.A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Revista da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. São José do Rio Preto—Boletim de Ciências*. n. 1, p. 1-72, São José do Rio Preto. 1973.

WADA, M. Y.; BEGOT, A. L.; NORONHA, S. L. B.; ALMEIDA, I. F.; LIMA, R. J. S.; SANTOS, L. B. C.; MONTEIRO A.; CRUZ, R. S.; SILVA, I. N. O.; SOARES, D. S.; PINHEIRO, A. S.; MORAES, J. R. F.; TENÓRIO, A. S.; PEREIRA, A. G. G.; PENHA, T. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; BARROS, V. L. S.; VASCONCELOS, P. F. C.; BARBOSA, T. F. S. B.; KOTAIT, I.; SOUZA, J. C. P.; GITTI, C. B.; UIEDA, W.; CARMO, E. H.; OLIVEIRA, R. C.; HATCH, D. L.; SILVA, E. D.; MUNHOZ, E. Surto de raiva humana transmitida por morcegos no Município de Portel-Pará, março/abril de 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. v. 4, n. 6, p. 1 - 5, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification da PROMEGA seguindo as instruções do fabricante que consiste nas seguintes etapas:

- Retirou-se um fragmento de 20mg tecido;
- Preparou-se solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl), em quantidade proporcional as amostras;
- Misturou-se a solução manualmente;
- Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos, tomando-se o cuidado para não congelar;
 - Para cada µl de cada amostra, usou-se 300 µl para cada um dos tubos;
 - Colocou-se 15 µl de proteinase K e deixou-se a amostra em banho maria (ou shak) a 65° C até degradar todo o tecido;
 - Adicionou-se 10 µl de RNase e levou-se à estufa a 37° C por 30 minutos;
 - Após retirar as amostras da estufa adicionou-se 150 µl do reagente Protein Precipitation;
 - Agitou-se delicadamente os tubos manualmente;
 - Agitou-se no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes por 5 segundos;
 - Levou-se as amostras ao freezer por cinco minutos, tomando o cuidado para não congelar;
 - Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
 - Adicionou-se 600 µl de Isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo.
 - Retirou-se o tubo da centrífuga e retirou-se o sobrenadante; colocando-o junto com Isopropanol;
 - Agitou-se gentilmente os tubos para homogeneizar;
 - Centrifugou por 10 minutos a 15.000 rpm;
 - Descartou-se o isopropanol e colocou-se o tubo papel absorvente;
 - Em seguida adicionou-se 500 µl de álcool 70% nos tubos, agitou-se gentilmente e visualizou-se o pellet;
 - Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
 - Descartou-se o álcool;

- Submeteu-se as amostras a um spin;
- Retirou-se o excesso de álcool tomando cuidado para não remover o pellet;
- Colocou-se o tubo aberto na estufa por 10 minutos;
- Colocou-se 50 µl de solução DNA Rehydration ou TE;
- Depois colocou-se em overnight e posteriormente no freezer;
- Visualizou-se o DNA em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3 µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 3µl de DNA.

ANEXO B -TÉCNICA DE PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Para amplificação dos genes rRNA 16S e COI foi empregada a técnica de PCR, em um volume final de 25 µl utilizando os seguintes reagentes:

- 4 µl de DNTPs (1,25 M) (nucleotídeos);
- 2,5 µl de solução tampão (10X);
- 0,5 µl de solução de MgCl₂ (50 mM);
- 1 µl de DNA (250 ng /ul);
- 0,25 µl de cada primer (200 ng/ µl);
- 0,2 µl da enzima Taqpolimerase (5u/µl);
- Água de injeção para completar o volume final da reação.

A amplificação gênica ocorreu em um termociclador e o protocolo para amplificação dos genes rRNA 16S e COI, consistiu nos seguintes parâmetros vide tabela 1 e 2. Os produtos da PCRs foram visualizados em gel de agarose a 1% e os positivos foram purificados usando o a enzima ExoSap IT conforme fabricante.

Tabela 11. Genes e primers utilizados neste estudo, com seus respectivos autores

| Genes | Primers | Autores |
|---------|---|----------------------------|
| rRNA16S | 16SL 1987:5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3' 16SH 2609:5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3' | Palumbi et al. (1991) |
| COI | LCO 1490: 5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG 3' HCO 2198:5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3' | Folmer et al. (1994) |
| COI | CO1 5285F:5' CCYCTGTNYTTAGATTTACAGTCTA 3' CO1 6929R:5' ACAARGTTATGTAATDDTTTACTA 3' | Spradling et al. (2004) |

Tabela 12. Condições de PCR para o isolamento dos genes (rRNA16S e COI)

| Genes | Desnaturação inicial | Ciclos | Desnaturação | Anealling | Extensão | Extensão final |
|---------|----------------------|--------|--------------|-----------|-----------|----------------|
| rRNA16S | 94°C/5' | 30 | 94°C/1' | 50°C/1' | 72°C/2' | 72°C/7' |
| COI | 94°C/5' | 35 | 94°C/1' | 55°C/50" | 72°C/1,5' | 72°C/7' |
| COI | 94°C/5' | 30 | 94°C/45" | 55°C/50" | 72°C/1" | 72°C/5' |

Logo em seguida foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA usando-se o método didesoxiterminal (SANGER et al. 1977), após a reação os produtos foram precipitados e submetidos ao sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies) onde ocorreu a eletroforese.

ANEXO C- REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA

Sequenciamento de DNA Os produtos de PCRs purificados foram submetidos à reação de sequência pelo método de Sanger et al. (1977) com os seguintes reagentes e parâmetros:

- 3,9µl de H₂O;
- 1,05 µl de Buffer;
- 0,35µl de Primer (0,8 pmol/µl);
- 1 µl de DNA;
- 0,7 µl de Big Dye.

Uma temperatura inicial de 96° C por 1 minuto, 35 ciclos com 96° C por 15 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos. Os produtos da reação de sequência foram precipitados seguindo as etapas abaixo:

- Submeteu-se a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adicionou-se 2,5 µl de EDTA (125 mM);
- Vedou-se a placa e submeteu-se a um spin;
- Adicionou-se 30 µl de Etanol 100%;
- Vedou-se a placa e misturou-se invertendo 4-5x;

- Envolheu-se a placa em papel alumínio e deixou-se em repouso à temperatura

ambiente por 15 minutos;

- Centrifugou-se a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverteu-se bruscamente a placa descartou-se o álcool e secou-se sobre

papel absorvente;

- Centrifugou-se a placa invertida por 15 s a 1.150 rpm;

- Adicionou-se 30 µl de Etanol a 70%;

- Vedou-se a placa;

- Centrifugou-se a 3.440 rpm por 15 s;

- Inverteu-se bruscamente, descartou-se o álcool e secou-se sobre o papel

absorvente;

- Centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;

- Deixou-se a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para

evaporação do excesso de álcool;

- Colocou-se Formamida (10µl), aqueceu-se e levou-se a placa ao termociclador

a 94°C por cerca de 3 minutos e colocou-se a mesma no sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies) onde ocorreu a eletroforese.

ANEXO D - TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

O diagnóstico laboratorial para o vírus da raiva foi empregado através da técnica da IFD. Foi realizado como descrito por Brasil (2008), consistiu das seguintes etapas;

- Fez-se duas impressões de lâmina;
- Fez-se um esfregaço do encéfalo com auxílio de um palito;
- Colocou-se as lâminas imersas em acetona por 30 minutos;

- Retirou-se da acetona deixou-se secar por 10 minutos;
 - Adicionou-se o CVS/CCN em cada uma das impressões;
 - Colocou-se na estufa por 30 minutos;
 - Colocou-se na câmara úmida por 10 minutos;
 - Lavou-se com SST duas vezes, sendo que na segunda lavagem deixa-se por 10 minutos;
 - Lavou-se duas vezes com água destilada;
 - Colocou-se para secar a temperatura ambiente;
 - Gotejou-se glicerina em cada uma das marcações;
 - Colocou-se a lamínula.
-
- Realizou--se a leitura no microscópico em luz ultravioleta.

ANEXO E- RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)