

Relatório Técnico

RELATÓRIO FINAL

Introdução

Quirópteros em Carajás

A região da Serra dos Carajás apresenta mais de 1,5 mil cavernas (Piló et al., 2018). Quanto à biodiversidade, os ambientes de caverna são muito relevantes pela especificidade de sua fauna. Estas cavernas apresentam uma riqueza única de troglóbios (animais de ocorrência restrita ao ambiente subterrâneo), com uma quantidade considerável de espécies vulneráveis (Piló et al., 2018). Entre os grupos de interesse estão os morcegos, representando o segundo maior grupo de mamíferos em número de espécies (Wilson, Reeder, 2005). A Amazônia abriga uma rica diversidade de quirópteros, com 146 espécies em nove famílias e 64 gêneros, onde pelo menos 46 espécies têm, até o momento, ocorrência restrita ao bioma amazônico (Bernard et al., 2011). Eles possuem importância ecológica para a manutenção de processos ecossistêmicos em florestas tropicais como dispersores de sementes, agentes de polinização e reguladores de populações de insetos (Kalka, Kalko, 2006). Os quirópteros são sensíveis a diferentes níveis de perturbação ambiental (Asher, 2009), sendo um grupo chave para o monitoramento e conservação de ambientes de florestas tropicais. Eles estão entre os poucos vertebrados que utilizam de maneira eficiente e permanente as cavernas como abrigo, compreendendo um grupo de grande relevância ecológica, pois são essenciais à manutenção de muitos ecossistemas subterrâneos (Piló et al., 2018).

Segundo Tavares et al. (2012), na Flona de Carajás ocorrem oito famílias, 46 gêneros e 75 espécies de morcegos, das quais 23 habitam cavernas, grutas e abrigos, sendo três espécies registradas exclusivamente em cavidades (*Lamproncycteris brachyotis*, *Phyllostomus latifolius* e *Dermanura* sp.). Cerca de 30% das espécies endêmicas da Amazônia estão em Carajás. Uma certa quantidade de táxons não foi determinada precisamente, provavelmente sendo espécies novas (Tavares et al., 2012). Existem cavernas com populações imensas de morcegos com importante impacto ambiental, as *bat caves*. Por outro lado, existem espécies raras ou pouco amostradas, algumas em condição vulnerável como os morcegos *Furipterus horrens*, *Natalus macrourus* e *Lonchorhina aurita*, que apresentam grande dependência de ambientes cavernícolas (Piló et al., 2018). Estudos sistemáticos, taxonômicos e

genéticos destes organismos devem ser considerados urgentes, pois possibilitarão a descrição de sua riqueza efetiva em Carajás (Tavares et al., 2012), permitindo o estabelecimento de políticas de conservação para esta fauna.

Banco de células da biodiversidade

Um banco de células é composto por culturas primárias de fibroblastos, estabelecidas a partir de amostras de tecidos, normalmente biópsias de pele. Em condições assépticas as biópsias são coletadas e processadas no laboratório para se estabelecer a cultura. Posteriormente as células são congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantidas por anos em baixas temperaturas. Isso permite as estocagens de amostras por longos períodos, tornando desnecessária nova coleta na natureza. Esta preservação de células de espécies raras ou vulneráveis fornece um registro biológico permanente de sua informação genética.

A necessidade de conservar recursos genéticos *ex situ* sob a forma de culturas celulares congeladas recebeu recentemente maior atenção com o desenvolvimento das técnicas de análise do genoma. Porém bancos de células não são frequentes e bancos de espécies vulneráveis são ainda menos comuns, o que os coloca no topo das prioridades científicas (Ryder, 2002). Preocupados com as taxas de extinção alarmantes das espécies, diversos cientistas propõem a ampliação de repositórios de células, pois poderão vir a ser a chave para a conservação das espécies, uma vez que é preservado material vivo destas espécies. As células em cultura são uma excelente fonte para extração de DNA. Comparada à extração de DNA em exemplares de museu, o DNA em células vivas adquire um valor adicional, pela possibilidade de isolar DNA de altíssima qualidade (padrão VGP) pois a estocagem em células vivas supera qualquer outro método para preservação desta molécula (Corthals, Desalle, 2005), já que é preciso de células vivas para o cross-link do DNA. Esse repositório de informação genética permite o estudo detalhado do genoma das espécies, servindo como base para o conhecimento da biodiversidade. Este conhecimento é fundamental para o desenvolvimento de políticas de conservação. É também um recurso valiosíssimo para ser usado no futuro com novas metodologias de manipulação genômica e celular que venham a se desenvolver. Como exemplo de usos atuais, pode-se destacar a definição precisa de espécies e subespécies presentes na localidade (taxonomia), seu grau de

similaridade genética com outras espécies próximas e sua história evolutiva (filogenia) ou ainda a definição de estratégias eficientes de reprodução em cativeiro (genômica da conservação) (Wildt, 2000). Com as perspectivas de avanço nos próximos anos em cultura celular e análise genômica, este material torna-se um tesouro inestimável para a ciência. Por exemplo, recentemente no Japão foi desenvolvida tecnologia que permite estocar as linhagens celulares não apenas por anos, mas virtualmente de modo infinito (Fukuda et al., 2016).

O Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará possui um banco de células com linhagens primárias de fibroblastos de vertebrados da Amazônia. Neste Centro o Laboratório de Citogenética dispõe de toda a estrutura para cultura celular e estocagem por ultracongelamento. Este Laboratório é Fiel Depositário junto ao CGen (MMA), para amostras de tecidos vivos da biodiversidade de Amazônia. A ampliação deste banco é grande relevância para a conservação *ex situ* de amostras de espécies, raras, vulneráveis ou ameaçadas de extinção.

Análise citogenética.

Uma abordagem relevante para a classificação taxonômica é o uso da análise genética como ferramenta auxiliar para uma melhor identificação das espécies e seus padrões filogeográficos (Granjon, Dobigny, 2003). Os rearranjos cromossômicos são eventos raros, com taxa mínima de homoplasia, o que torna a análise citogenética importante para o estudo da sistemática e da biodiversidade. A maioria das espécies de quirópteros possui cariótipos altamente conservados no gênero, mas com intensa variação intergenérica, o que permite sua caracterização por bandeamento G, mas torna a comparação entre gêneros quase impossível (Rodrigues et al., 2000; Ribeiro et al., 2003).

A análise citogenética moderna incorporou técnicas da área molecular, originando a “citogenômica”. A Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), permite definir a localização física de um segmento de DNA (uma “sonda”) no cariótipo da espécie em estudo. A sonda apresenta uma marcação fluorescente para sua visualização ao microscópio (Pieczarka, Nagamachi, 2004). É possível definir regiões de homologia entre cariótipos distintos e assim detectar os rearranjos cromossômicos, bem como

mapear genes de interesse, superando a limitação que o bandeamento G apresenta em vários grupos, incluindo os morcegos.

Nosso grupo desenvolveu sondas de cromossomos inteiros de morcegos Phyllostomidae da Amazônia (*Carollia brevicauda* e *Phyllostomus hastatus*, Pieczarka et al., 2005), o que possibilitou o mapeamento genômico comparativo entre os cariótipos das diferentes espécies, permitindo encontrar as diferenças cromossômicas mesmo entre cariótipos muito reorganizados (Noronha et al., 2009, 2010; Sotero-Caio et al., 2011; Pieczarka et al., 2005, 2013; Ribas et al., 2013, 2015; Gomes et al., 2016, 2018; Benathar et al., 2019). No presente projeto pretendemos utilizar estas ferramentas para comparar os cariótipos de diversas espécies de morcegos de Carajás, em especial aquelas espécies relevantes ecologicamente e as vulneráveis, para conhecermos melhor sua biodiversidade.

O grupo de pesquisadores do CEABIO é especializado em pesquisa citogenômica. Aos dados citogenéticos serão acrescentadas as análises de DNA, Barcode e sequenciamento, a serem realizadas pelo grupo do Dr. Guilherme de Oliveira, do ITV, com o qual trabalhamos em colaboração, portanto sem a necessidade de repassar recursos para estas análises.

Objetivo Geral

Estudo da biodiversidade genômica de morcegos das cavernas da Flona Carajás, com ênfase em espécies com poucos registros de captura ou em condição vulnerável.

Objetivos específicos

- Coletar exemplares de morcegos em cavernas da Flona Carajás para ter uma amostra representativa de quirópteros das cavernas.
- Ampliar o banco de fibroblastos do Laboratório de Citogenética da UFPa no que concerne aos morcegos.
- Caracterizar os cariótipos de espécies através de bandeamentos G, C e NOR.
- Fazer o mapeamento genômico comparativo através de pintura cromossômica com sondas de cromossomos totais de *Phyllostomus hastatus*, *Carollia brevicauda* e *Myotis* para estabelecer as homeologias entre espécies e gêneros.

- Comparar os padrões de hibridização obtidos para definir os rearranjos cromossômicos ocorridos nas diferenciações destes gêneros.
- Fornecer amostras de exemplares de morcegos para o grupo de pesquisa do ITV que irá realizar a análise molecular.
- Definir por análise citogenética e molecular se os espécimes coletados constituem espécies separadas das demais populações de outras regiões.

Metodologia

Coletas de quirópteros

As amostras do presente trabalho serão obtidas a partir de coletas em cavidades e seu entorno, localizadas na Serra Sul da FLONA de Carajás. Nossa proposta é a de acompanhar os estudos ecológicos que serão implementados em 2021-22 pela equipe do ITV-DS em cavidades da Serra Sul (S11A, B, C e D), promovendo sinergia com os dados que serão gerados por eles. Assim, a precisão de quais cavernas demandará alinhamento com a equipe do ITV-DS de Belém.

A captura de indivíduos das espécies-alvo será realizada através de 2 estratégias: i) a captura no interior da cavidade utilizando puçás; ii) captura utilizando redes de neblina (mist-nets) e/ou armadilhas de harpa (harp-traps). Na primeira estratégia as capturas ocorrerão durante o dia, e terão o tempo de duração necessário para capturar todos os indivíduos desejados. Na segunda estratégia, por outro lado, as capturas ocorreram no horário de emergência das espécies na cavidade (17:30 – 20:30) posicionando as armadilhas na entrada ou no exterior próximas à entrada da cavidade, sem bloqueá-la completamente. As armadilhas serão checadas em intervalos máximos de 5 minutos, nunca sendo deixadas completamente desatendidas. Todas técnicas mencionadas serão executadas por membros de uma equipe compostas por membros do CEABio e ITV-DS/VALE, com experiência de mais de 10 anos em capturas de morcegos no bioma Amazônia, bem como em ambiente cavernícola, e seguirão as orientações apresentadas em Kunz et al. (2009).

Serão realizadas 3 coletas, com um intervalo de 6 meses entre elas. Os morcegos capturados serão mantidos em sacos de contenção e posteriormente manipulados para as medidas biométricas. Será coletado apenas um casal por espécie e os demais indivíduos serão soltos nos mesmos locais de coleta. Todas técnicas

implementadas para a captura e manuseio dos morcegos capturados durante este estudo seguirão as normas estabelecidas pela American Society of Mammalogists (Sikes & Gannon, 2011).

A meta é ter uma amostra representativa da quiropterófauna cavernícola da região, mas buscaremos particularmente espécies com poucos registros de captura e/ou conhecidamente cavernícola, como *Furipterus horrens*, *Natalus macrourus*, *Lonchorhina aurita*, espécies de *Pteronotus* e *Thyroptera*, *Lamproncycteris brachyotis*, *Phyllostomus latifolius* e *Dermanura sp.* Os animais serão processados localmente e as preparações cromossômicas e as biópsias de pele serão enviadas para o Laboratório de Citogenética do Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, no PCT-Guamá, em Belém, onde os procedimentos laboratoriais serão efetuados.

O coordenador deste projeto possui uma licença de coleta permanente fornecida pelo ICMBio – SISBIO (Licença 13248). Além disso, nosso laboratório está cadastrado junto ao CGEN como Fiel Depositário de amostras biológicas (CGEN 052/2004) e a pesquisa desenvolvida no Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO), foi aprovada pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal do Pará (Autorização 68/2015). Os exemplares serão depositados na coleção de mamíferos do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Cultura primária de fibroblastos

De cada animal será obtida uma biópsia de pele, em condições assépticas. Isto é possível escolhendo-se uma região do corpo que possua poucos pelos. Os pelos serão raspados e a região será limpa e lavada com álcool 70%. Com o auxílio de um "punch" para biópsia e/ou uma tesoura cirúrgica será obtida uma biópsia de aproximadamente 1 cm² que será acondicionada em um frasco contendo 5 ml de meio de cultura "Dubelcco" MEM, com 20% de SBF e duas vezes a quantidade normal de antibióticos.

No laboratório do Banco de Células a biópsia será submetida à técnica da cultura celular primária. Sob o fluxo laminar, em uma placa de Petri estéril o tecido é lavado várias vezes em tampão PBS para a retirada de possíveis contaminantes. A seguir é lavado em meio Dubelcco MEM com 20% de soro bovino fetal e duas vezes a quantidade normal de antibióticos (Pen-Strep). A seguir é levado a outra placa de Petri com 1 ml de meio Dubelcco, pH 7.2 com concentração normal de antibióticos e

enriquecido com 20% de soro bovino fetal. Nesta placa a biópsia será cortada em pequenos pedaços e macerada até o material ficar reduzido a uma pasta. A esta pasta serão adicionados 9 ml de meio Dubelcco e o material colocado em duas garrafas de cultura. As garrafas serão incubadas em estufas a 37°C por uma semana, sem serem movidas.

Após este período cada garrafa será aberta, sempre em ambiente estéril, e serão adicionados 2 ml de meio. Após 48 horas o meio existente na garrafa será retirado, assim como todo o material que não estiver aderido a parede da garrafa, sendo substituído por 5 ml de meio fresco. A esta altura é possível verificar se ocorreu adesão de fibroblastos à parede da garrafa. O meio de cultura será trocado a cada 48 horas. Aproximadamente duas semanas após o início do cultivo, as células deverão atingir o nível de monocamada, sendo então necessário o repique para outras garrafas. Para o congelamento (10 a 12 dias após o início do cultivo), as células serão retiradas da garrafa através de tripsinização. Após centrifugação estéril (1000 rpm por 10'), o sedimento será ressuspensionado em 1 ml de SBF 95% e DMSO 5%, acondicionado em frascos resistentes a baixa temperatura e colocado na geladeira (4°C) por 30 minutos, em seguida em freezer (-20°C) por mais 30 minutos, após em freezer -80°C e finalmente em nitrogênio líquido (-196°C).

Análise citogenética

Os cromossomos metafásicos serão obtidos através da técnica de extração de medula óssea ou por cultura de fibroblastos. As técnicas de bandeamentos G, C e NOR, serão realizadas de acordo com Scheres (1972), Sumner (1972) e Howell & Black (1980), respectivamente. As sondas de cromossomos totais de Phyllostomidae foram geradas no Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics, da Universidade de Cambridge, Reino Unido, a partir de linhagens de fibroblastos das espécies *Phyllostomus hastatus* (2n = 32) e *Carollia brevicauda* (2n = 20 nas fêmeas, 21 nos machos), ambas pertencentes à Família Phyllostomidae. As linhagens foram desenvolvidas no Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil. Também serão usadas sondas de *Myotis* para as outras famílias de morcegos, sondas gentilmente cedidas pelo Dr. Fengtang Yang, do Sanger Institute, Reino Unido. A hibridização *in situ* das sondas de

cromossomo total será realizada de acordo com Yang et al. (1997). Brevemente, 14 µL de solução de hibridização (50 % formamida, 1 X SSC, 10% dextran sulfato) e 1 µL do produto marcado do PCR serão desnaturados a 65°C, colocados sobre lâminas com metáfases desnaturadas e montados com lamínulas de 22 X 22 mm. As metáfases terão sido previamente desnaturadas em 70 % formamida, 2 X SSC a 65°C por 1 minuto. O material será incubado por 72 horas a 37°C. Após a hibridização e lavagem de estringência as sondas serão detectadas com avidina (Vector Laboratories) ligada a FITC ou Cy3 (Amersham). Imagens digitais serão obtidas no CEABIO em um microscópio Axiophot, através de uma câmera CCD Zeiss AxioCam, com controle da câmera e a obtenção da imagem digital através do software Axiovision e/ou um microscópio Nikon H550S com software Nis-Elements. As imagens serão editadas no software Adobe Photoshop e utilizadas para definir os mapeamentos efetuados. Os resultados finais serão apresentados em tabelas de homeologia e em cariótipos com bandeamento G das espécies estudadas, tendo ao lado de cada par a definição de qual sonda o hibridizou.

Resultados

Trabalho de campo

Foram realizadas três campanhas para coleta de morcegos de interesse do presente projeto. A primeira ocorreu no período de 27/10/2021 a 02/11/2021, na Serra Sul; a segunda ocorreu de 22 a 28/03/2022 na Serra Norte e a terceira de 12/11/2022 a 21/11/2022, novamente na Serra Sul. No total foram coletados 33 espécimes, pertencentes às espécies *Furipterus horrens*, *Lichonycteris degener*, *Peropteryx kappleri*, *Natalus macrourus*, *Pteronotus personatus*, *Pteronotus cf. rubiginosus*, *Lonchorhina aurita*, *Carollia perspicillata*, *Diphylla ecaudata*, *Desmodus rotundus*, *Myotis albescens*, *Anoura geoffroyi*, *Lionycteris spurreli* e *Glossophaga soricina*. Na parte final do relatório há uma tabela (tabela 2) com dados de cada exemplar coletado ao longo de cada campanha, bem como uma descrição geral dos dados genéticos obtidos.

Resultados obtidos

Com relação aos resultados obtidos, organizamo-los no presente relatório de acordo com os produtos propostos a serem gerados pelo projeto:

1) Linhagens celulares dos exemplares coletados, congeladas para uso:

Para todos os animais coletados foram realizadas biópsias e enviadas para o laboratório de citogenética do CEABIO afim de desenvolver linhagens celulares dos exemplares. Dos 33 espécimes, duas culturas não cresceram e seis contaminaram com bactérias, totalizando 8 resultados negativos e 25 positivos, o que dá um índice de rendimento positivo de 76%. A tabela 1 mostra cada exemplar coletado e o resultado relativo à cultura.

Tabela 1: Exemplares das espécies coletadas e o respectivo resultado quanto à cultura de fibroblastos.

Espécie	Cultura positiva
1ª campanha	
<i>Furipterus horrens</i>	Sim
<i>Lichonycteris degener</i>	Não
<i>Diphylla ecaudata</i>	Sim
<i>Desmodus rotundus</i>	Sim
<i>Peropteryx kappleri</i>	Sim
<i>Natalus macrourus</i>	Sim
<i>Natalus macrourus</i>	Sim
<i>Pteronotus cf. rubiginosus</i>	Não
<i>Lonchorhina aurita</i>	Sim
<i>Lonchorhina aurita</i>	Não
2ª campanha	
<i>Peropteryx kappleri</i>	Sim
<i>Pteronotus personatus</i>	Sim
<i>Pteronotus cf. rubiginosus</i>	Sim
<i>Carollia perspicilatta</i>	Não
<i>Natalus macrourus</i>	Sim
<i>Natalus macrourus</i>	Sim
<i>Myotis albescens</i>	Não
<i>Myotis albescens</i>	Sim
<i>Lonchorhina aurita</i>	Sim
<i>Lonchorhina aurita</i>	Sim
<i>Anoura geoffroyi</i>	Não
<i>Lonchorhina aurita</i>	Não
<i>Peropteryx kappleri</i>	Sim
3ª campanha	
<i>Natalus macrourus</i>	Sim
<i>Furipterus horrens</i>	Sim
<i>Anoura geoffroyi</i>	Sim

<i>Lionycteris spurreli</i>	Sim
<i>Glossophaga soricina</i>	Sim
<i>Anoura geoffroyi</i>	Sim
<i>Lionycteris spurreli</i>	Sim
<i>Lionycteris spurreli</i>	Não
<i>Lionycteris spurreli</i>	Sim
<i>Lonchorhina aurita</i>	Sim

2) Relatório com mapeamento genômico e análise dos dados relativos às espécies.

O presente relatório é o produto previsto no projeto. Todas as espécies coletadas foram cariotipadas (vide item 3 abaixo) e estão sendo analisadas por FISH, conforme previsto no projeto (vide item 4 abaixo). Nos casos onde já existem dados na literatura das mesmas espécies, mas de outras regiões, os resultados cariotípicos não parecem diferir significativamente.

3) Imagens com cariótipos das espécies.

Do total de 33 espécimes, conseguimos resultados positivos em 27, um índice de sucesso de 82%, considerado excelente. Como foi conseguida, em alguns casos, a coleta de mais de um exemplar por espécie, apenas *Lichonycteris degener* e *Carollia perspicillata* não apresentaram resultados, inclusive quanto à cultura. A seguir estão as imagens de cariótipos e metáfases obtidos.

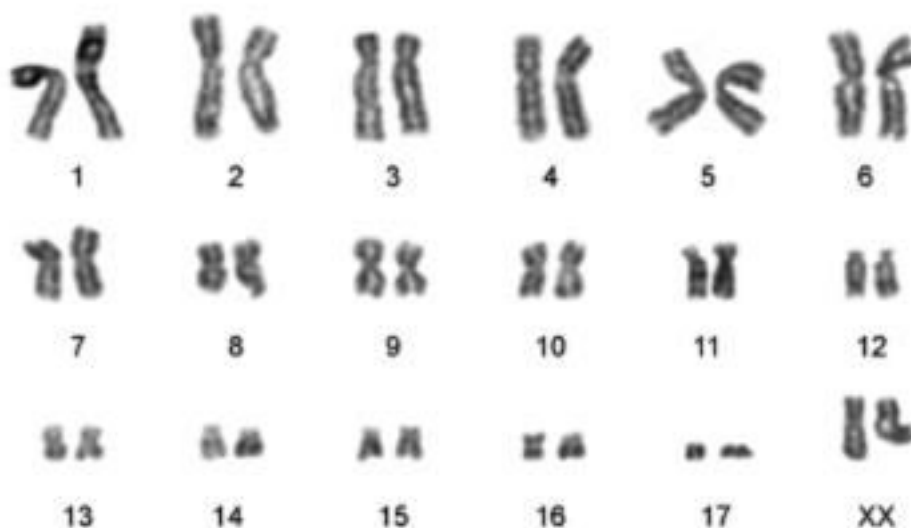


Figura 1: Cariótipo de *Furipterus horrens*.

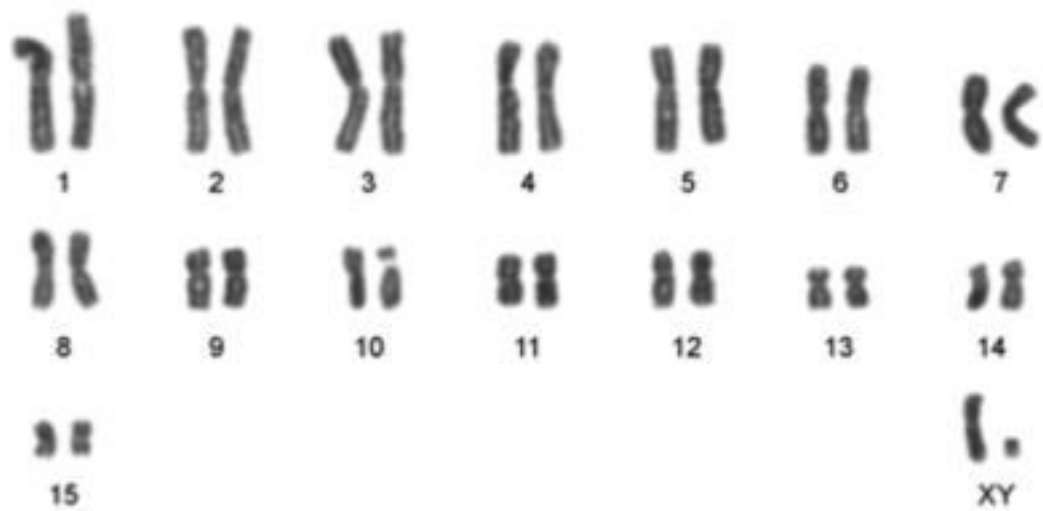


Figura 2: Cariótipo de *Diphylla ecaudata*.

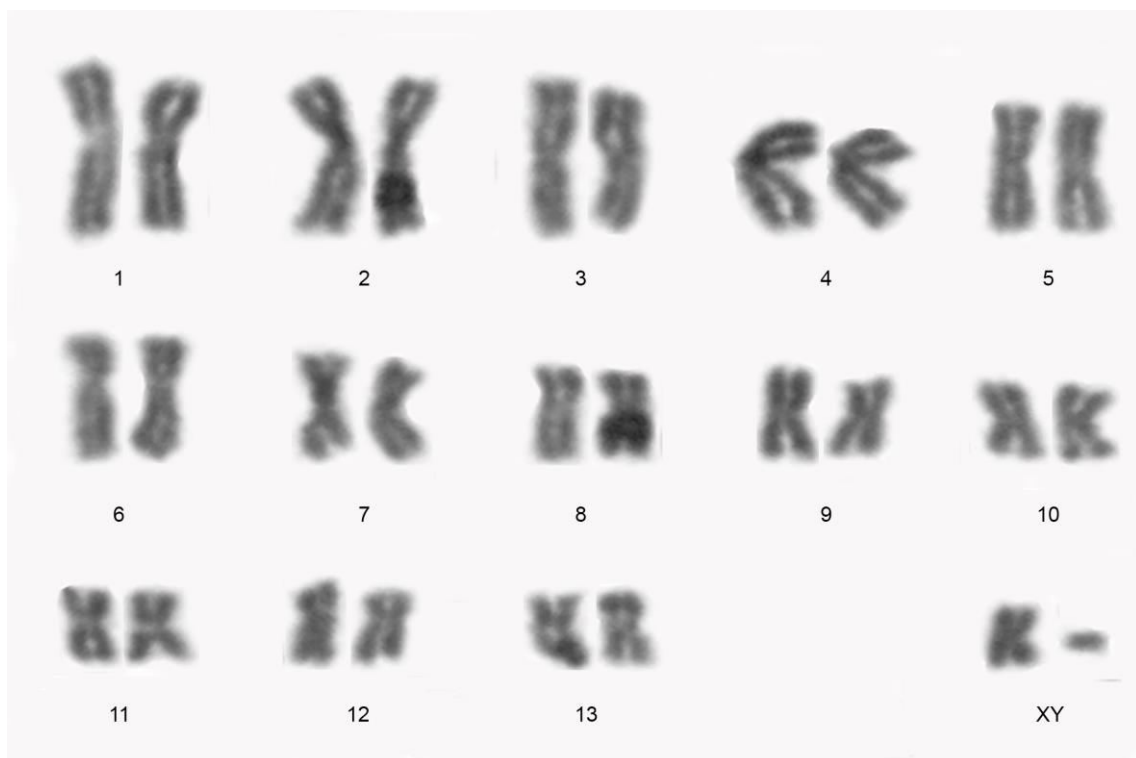


Figura 3: Cariótipo de *Desmodus rotundus*.



Figura 4: Cariótipo de *Peropteryx kappleri*.

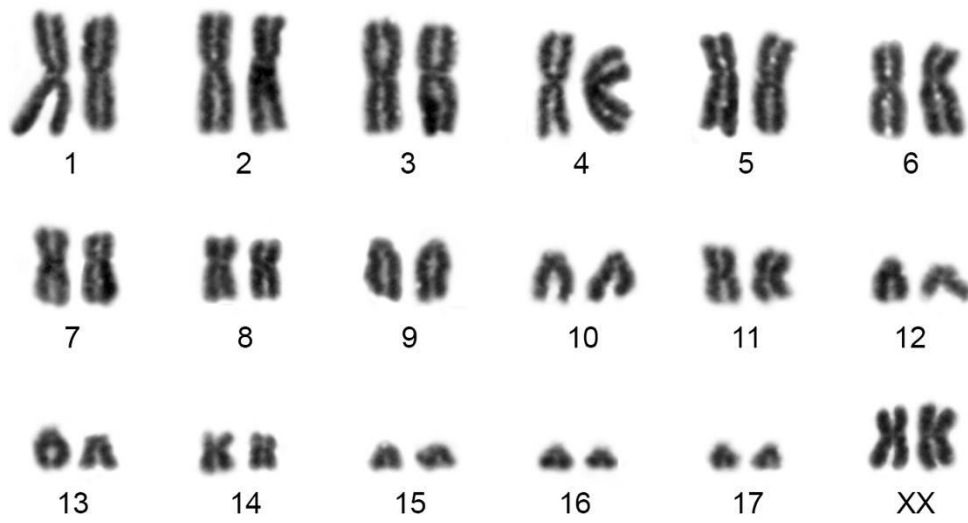


Figura 5: Cariótipo de *Natalus macrourus*.

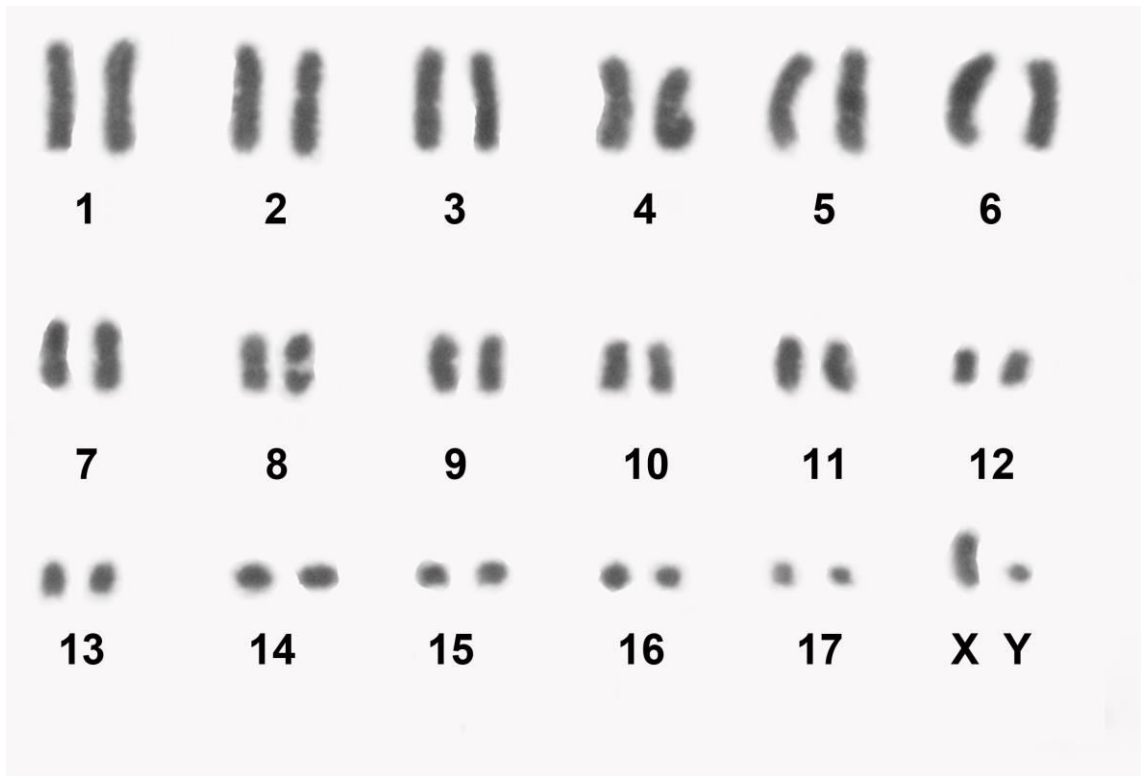


Figura 6: Cariótipo de *Pteronotus cf. rubiginosus*.

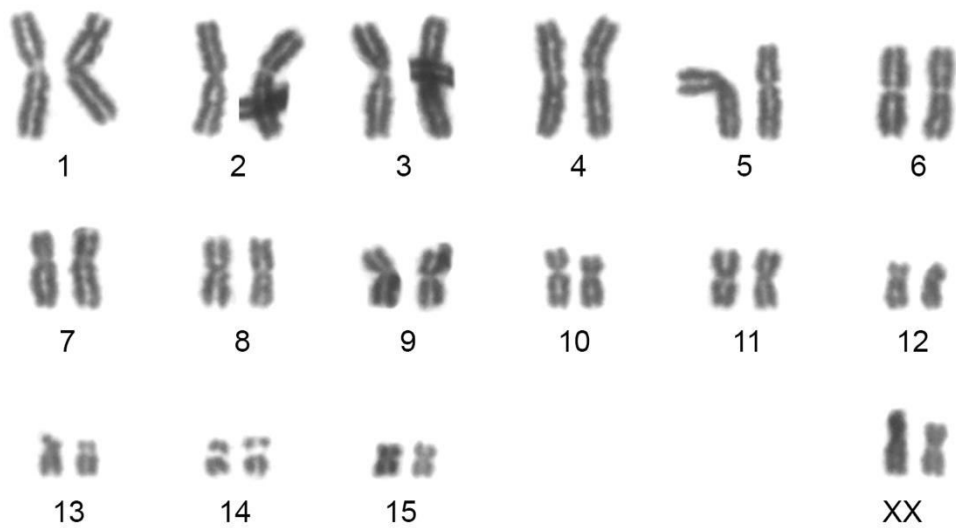


Figura 7: Cariótipo de *Lonchorhina aurita*.

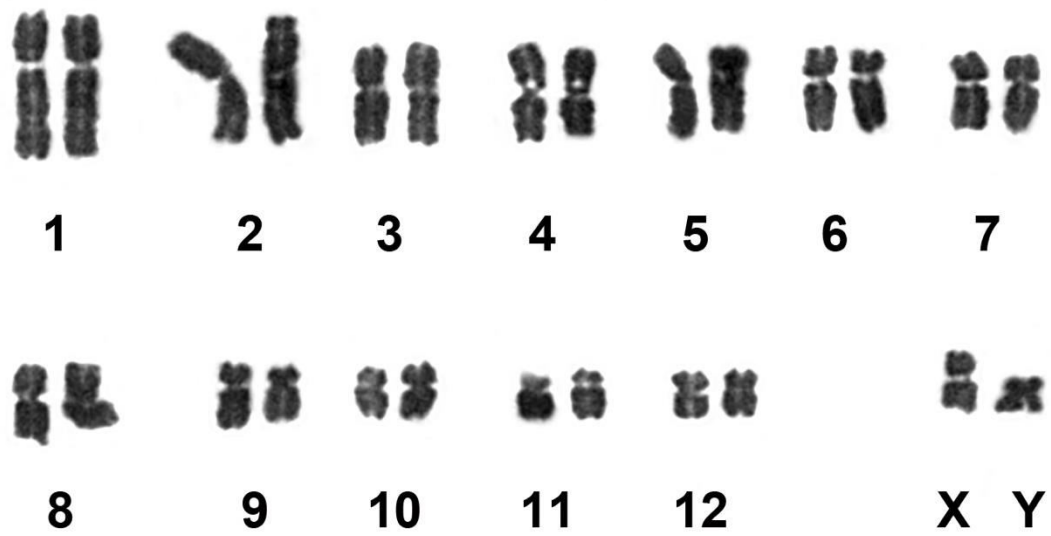


Figura 8: Cariótipo de *Peropteryx kappleri*.

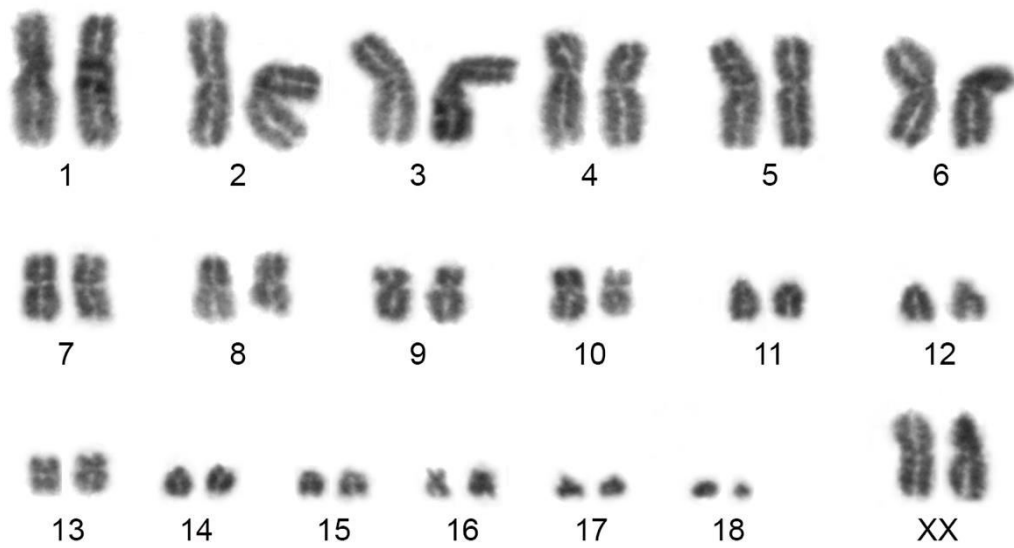


Figura 9: Cariótipo de *Pteronotus personatus*.

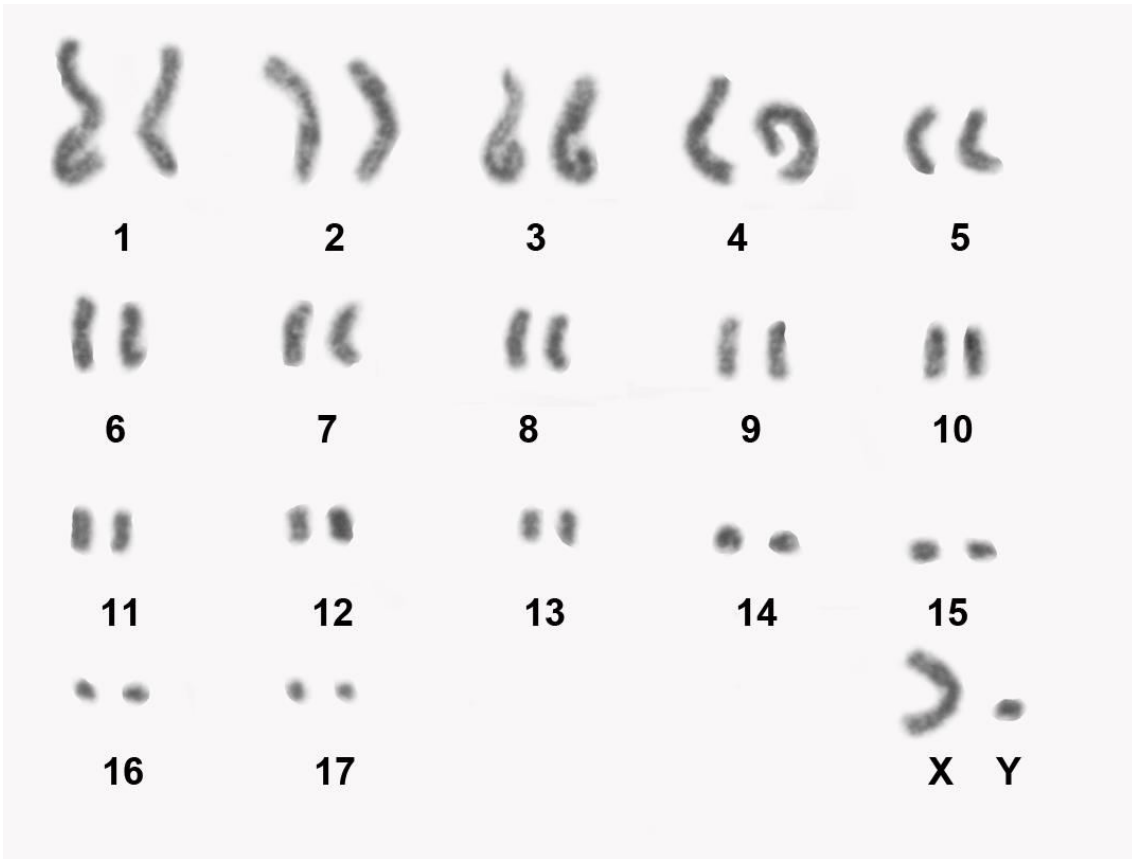


Figura 10: Cariótipo de *Pteronotus cf. rubiginosus*.



Figura 11: Metáfase de *Myotis albescens* (em análise).

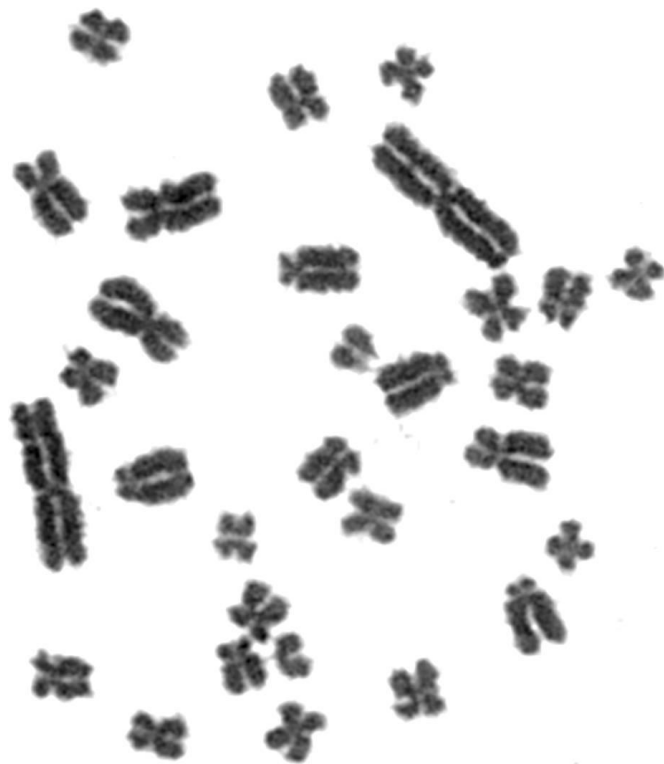


Figura 12: Metáfase de *Myotis albescens* (em análise).

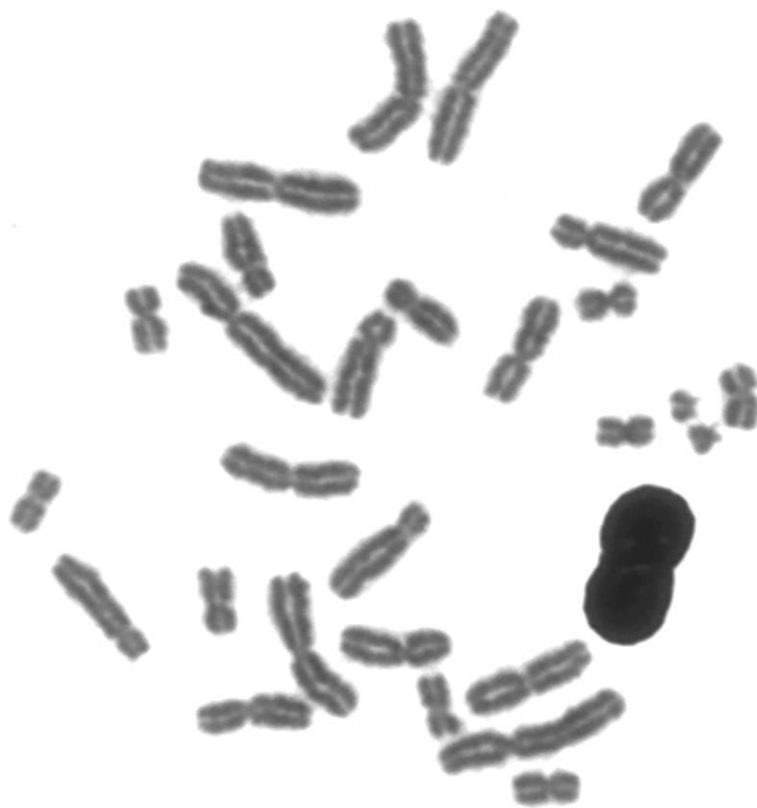


Figura 13: Metáfase de *Lionycteris spurreli* (em análise).

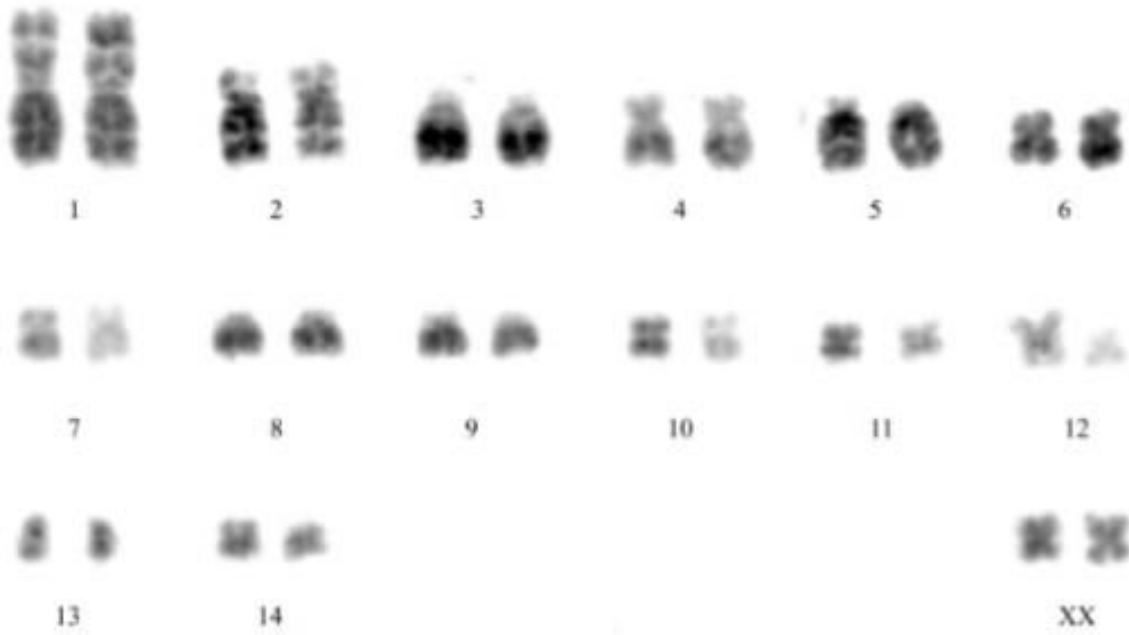


Figura 14: Cariótipo com bandeamento G de *Anoura geoffroyi*.

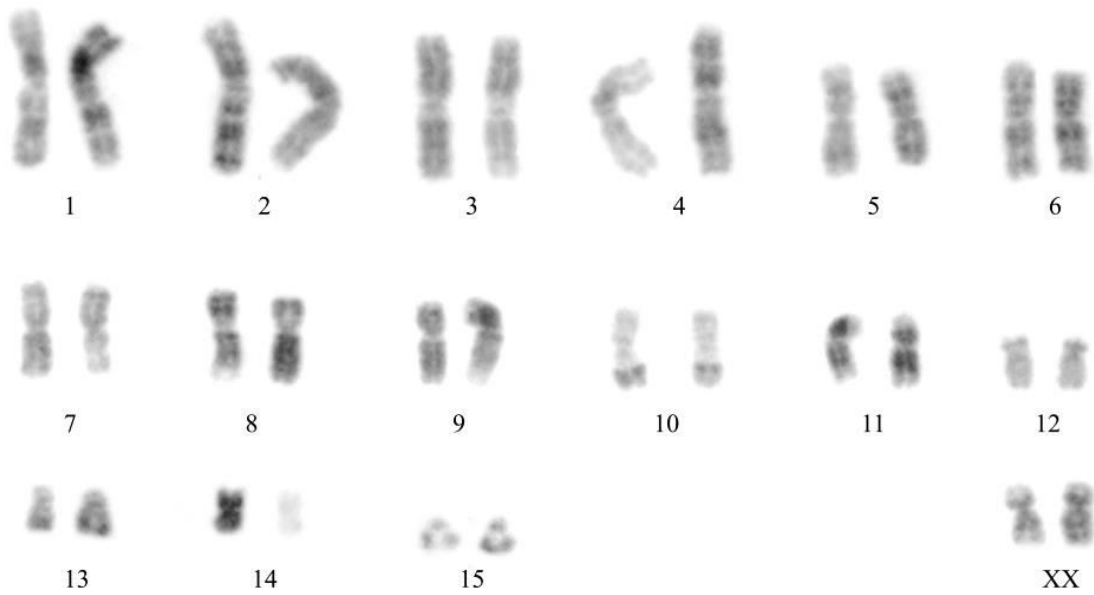


Figura 15: Cariótipo com bandeamento G de *Glossophaga soricina*.

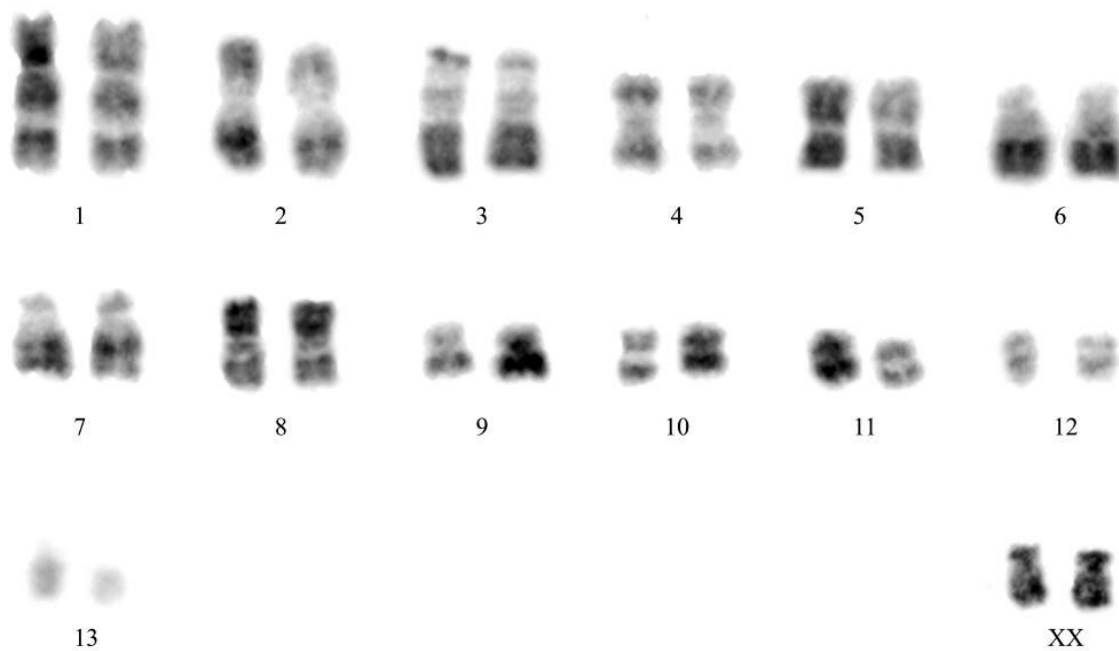


Figura 16: Cariótipo com bandeamento G de *Lionycteris spurreli*

4) Imagens com mapeamento genômico.

Nas imagens abaixo podem ser observados exemplos de mapeamento do gene 18S e das regiões teloméricas. Estes resultados indicam que as metáfases foram obtidas em boas condições e estão e podem passar pelo processo de hibridização *in situ* fluorescente. Após mapear estas sequências nas demais espécies, realizaremos a pintura cromossômica com sondas de cromossomos totais de *Phyllostomus hastatus*, *Carollia brevicauda* e *Myotis*. O processo completo de trabalho de pintura cromossômica com uma pessoa dedicada integralmente demora de 3 a 4 meses por espécie.

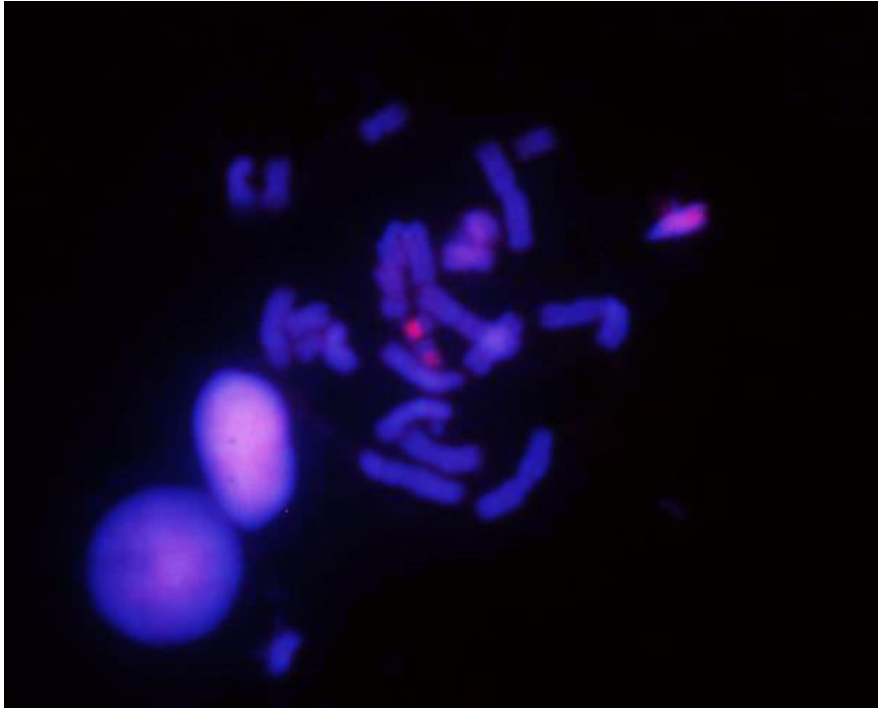


Figura 17: Metáfase de *Lonchorhina aurita* (azul) com mapeamento da sonda do gene 18S (vermelho).

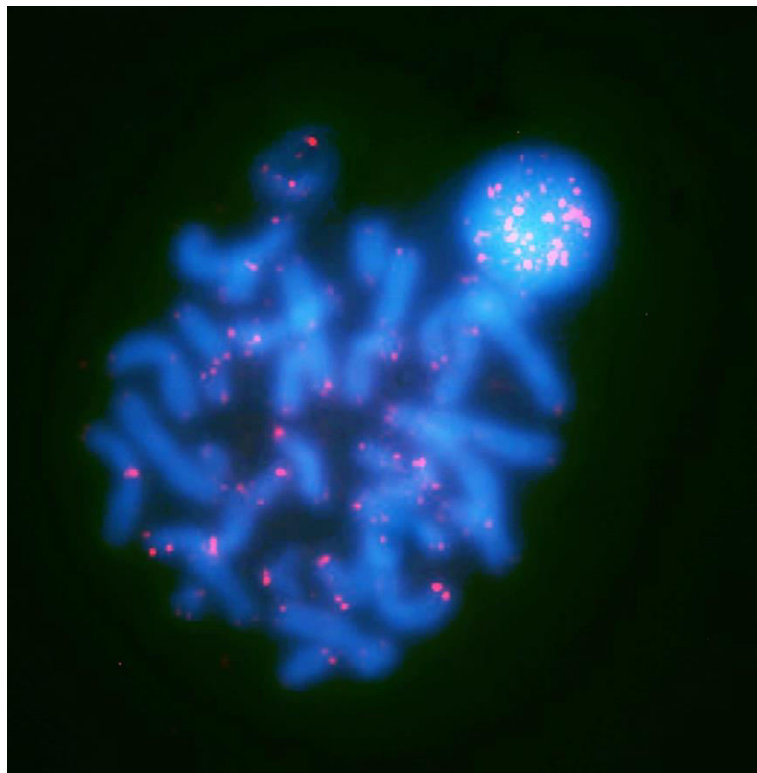


Figura 18: Metáfase de *Natalus macrourus* (azul) com mapeamento de sondas teloméricas (vermelho).

5) Artigos científicos publicados em revistas de impacto.

Redigimos um primeiro artigo científico, “Cave-dwelling bats of Carajás National Forest: new cytogenetics data of threatened species”, com a descrição geral dos dados obtidos durante este projeto. O manuscrito foi submetido à revista *Animals*. O mesmo se foi rejeitado por aquela revista e, portanto, estamos submetendo à revista *Ecology and Evolution*. Este resultado geral também foi apresentado em um painel no 68º Congresso Brasileiro de Genética (que ocorreu em setembro de 2023) intitulado “Cave bats of Carajás National Forest: new cytogenetic data of *Furipterus horrens* and *Natalus macrourus*”. Também se iniciou o desenvolvimento do projeto de pesquisa PIBIC “Morcegos de cavernas: conhecer para preservar sua diversidade genética”, aprovado para uma bolsa do CNPQ, que se tornará o Trabalho de Conclusão de Curso do discente receptor da bolsa.

6) Possibilidade de geração de um livro agregando as informações sobre as espécies coletadas.

A quantidade de resultados obtidos permite realizar a publicação de um livro sobre as espécies, sua distribuição, seus dados genéticos (cromossômicos e moleculares) e dados ecológicos, que estão sendo gerados pela equipe do ITV, sob a coordenação do Dr. Leonardo Trevelin.

Discussão

1) Linhagens celulares dos exemplares coletados, congeladas para uso:

O índice de sucesso de 78% é um resultado muito bom, pois as amostras vindas de campo frequentemente apresentam problemas de contaminação. Todas as culturas positivas foram replicadas em algumas garrafas de cultivo e depois congeladas em nitrogênio líquido para preservação.

2) Relatório com mapeamento genômico e análise dos dados relativos às espécies.

Na medida em que os cariótipos forem sendo analisados em detalhes com a realização das técnicas previstas, eles poderão ser comparados com os dados da literatura na determinação das relações evolutivas dentro dos respectivos gêneros.

Uma primeira análise demonstra que algumas espécies aqui estudadas nunca foram analisadas cromossomicamente, uma informação muito importante para o estudo de morcegos brasileiros.

3) Imagens com cariótipos das espécies.

Este é um trabalho ainda em andamento, sendo necessário continuar a análise das metáfases ainda não montadas e realizar os bandeamentos cromossômicos clássicos. Alguns resultados de bandeamento G também são apresentados. O tempo necessário para a análise estar completa deverá ser de um a dois anos de trabalho.

4) Imagens com mapeamento genômico.

Os trabalhos com mapeamento genômico se mostraram bastante promissores. Estamos realizando mapeamento de sequências 18S e teloméricas e iniciamos os mapeamentos com sondas de cromossomos totais em *Anoura geoffroyi*. Além das imagens neste relatório, segue um arquivo anexo (Anexo 2) com mapeamento de outras espécies coletadas e metáfases de *Anoura geoffroyi* com mapeamento de sondas de cromossomos totais de *Phyllostomus hastatus* (PHA) e *Carollia brevicauda* (CBR).

5) Artigos científicos publicados em revistas de impacto.

Após a publicação do artigo geral mencionado em Resultados, publicaremos artigos para cada espécie, com o detalhamento das técnicas de bandeamento e FISH. Estes dados poderão ainda ser agregados aos resultados da análise molecular a ser obtida pela equipe do Dr. Guilherme Oliveira do Instituto Tecnológico Vale (ITV). De acordo com o tempo necessário para a análise citogenética e principalmente de pintura cromossômica, os primeiros artigos devem sair entre o final do presente ano e início do próximo. Espécies cujo cariótipo nunca foi descrito (por exemplo, *Pteropteryx kappleri*) merecerão um artigo à parte. Nos casos de espécies cujos cariótipos já foram previamente descritos os dados serão agrupados por família ou subfamília, quando for o caso.

6) Possibilidade de geração de um livro agregando as informações sobre as espécies coletadas.

Estamos aguardando os resultados do ITV para agregar aos nossos dados e gerar a redação de um livro, cuja possibilidade foi aventada no projeto inicial. Esta publicação não precisará aguardar as publicações dos trabalhos de cada espécie, pois será uma publicação de caráter mais geral. Ele deverá entrar em redação ao longo do segundo semestre e estar pronto em 2024. Ainda não iniciamos a redação deste livro.

ANEXO 1

PROJETO CARAJÁS - MORCEGOS DA CAVERNA – 1ª CAMPANHA (SERRA SUL)							
Protocolo de campo	Data da coleta	Local de coleta	Espécie	2n	NFa	Sexo	Estágio Reprodutivo
CC-01	29/10/2021	S11_0007	<i>Furipterus horrens</i>	34	60	Fêmea	Adulto
CC-02	29/10/2021	S11_0007	<i>Lichonycteris degener</i>	-	-	Macho	Adulto
CC-03	29/10/2021	S11_0007	<i>Diphylla ecaudata</i>	32	60	Macho	Adulto
CC-04	30/10/2021	S11_0007	<i>Desmodus rotundus</i>	28	52	Fêmea	Adulto
CC-05	01/11/2021	Caverna desmoronada	<i>Peropteryx kappleri</i>	26	48	Fêmea	Adulto
CC-06	01/11/2021	S11D_0083	<i>Natalus macrourus</i>	36	56	Fêmea	Adulto
CC-07	01/11/2021	S11D_0083	<i>Natalus macrourus</i>	36	56	Macho	Adulto
CC-08	01/11/2021	S11D_0083	<i>Pteronotus cf. rubiginosus</i>	-	-	Macho	Jovem
CC-09	01/11/2021	S11D_0083	<i>Lonchorhina aurita</i>	32	60	Fêmea	Jovem
CC-10	01/11/2021	S11D_0083	<i>Lonchorhina aurita</i>	32	60	Macho	Jovem
PROJETO CARAJÁS - MORCEGOS DA CAVERNA – 2ª CAMPANHA (SERRA NORTE)							
CC-11	24/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 174	<i>Peropteryx kappleri</i>	26	48	Fêmea	Subadulta
CC-12	24/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 174	<i>Pteronotus personatus</i>	38	60	Fêmea	Jovem
CC-13	24/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 174	<i>Pteronotus cf. rubiginosus</i>	38	60	Fêmea	Adulta
CC-14	24/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 174	<i>Carollia perspicilata</i>	-	-	Macho	Adulto
CC-15	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 174	<i>Natalus macrourus</i>	36	56	Macho	Indefinido
CC-16	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Natalus macrourus</i>	36	56	Fêmea	Indefinido
CC-17	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Myotis albescens</i>	-	-	Fêmea	Indefinido
CC-18	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Myotis albescens</i>	44	50	Macho	Indefinido
CC-19	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Lonchorhina aurita</i>	32	60	Macho	Indefinido
CC-20	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Lonchorhina aurita</i>	32	60	Fêmea	Indefinido
CC-21	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Anoura geoffroyi</i>	-	-	Fêmea	Indefinido

CC-22	25/03/2022	Serra Norte, N1 - Carajás - Caverna 168	<i>Lonchorhina aurita</i>	-	-	Macho	Adulto
CC-23	27/03/2022	Serra Norte, N4E - Carajás - Caverna 62	<i>Peropteryx kappleri</i>	26	48	Macho	Indefinido

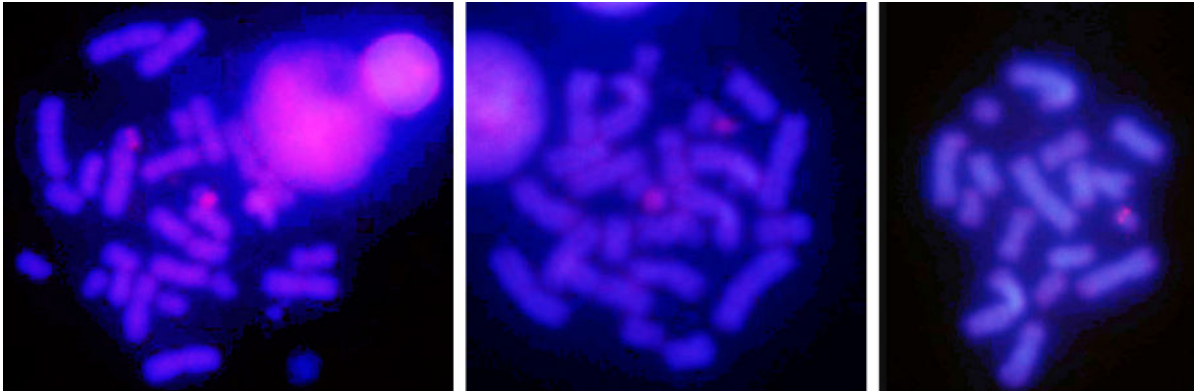
PROJETO CARAJÁS - MORCEGOS DA CAVERNA – 3ª CAMPANHA (SERRA SUL)

CC-24	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Natalus macrourus</i>	36	56	Fêmea	Adulta
CC-25	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Furipterus horrens</i>	36	60	Fêmea	Jovem
CC-26	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Anoura geoffroyi</i>	30	58	Fêmea	Adulta
CC-27	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Lionycteris spurreli</i>	28	50	Fêmea	Adulta
CC-28	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Glossophaga soricina</i>	32	60	Fêmea	Adulto
CC-29	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Anoura geoffroyi</i>	30	58	Macho	sub adulta
CC-30	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Lionycteris spurreli</i>	28	50	Fêmea	Jovem
CC-31	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Lionycteris spurreli</i>	28	50	Fêmea	Adulta
CC-32	18/11/2022	S11C - Caverna 0153	<i>Lionycteris spurreli</i>	28	50	Fêmea	Adulta
CC-33	20/11/2022	S11D - Caverna 0043	<i>Lonchorhina aurita</i>	32	60	Fêmea	Adulta

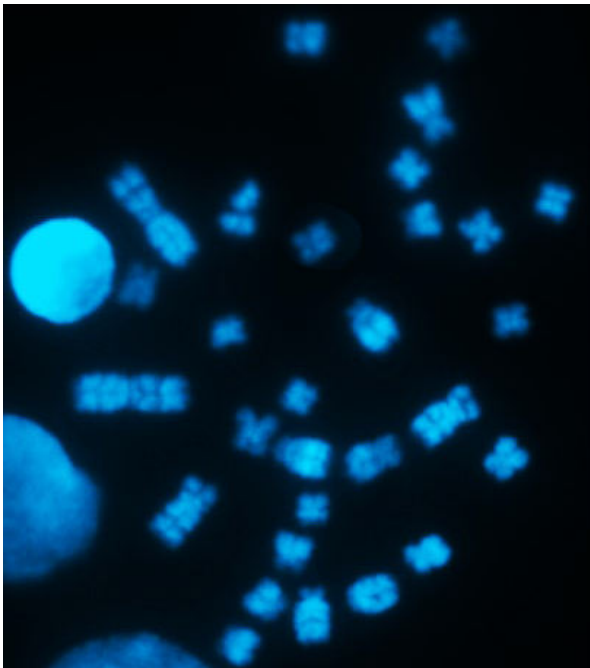
ANEXO 2

Imagens de análise por fluorescência do material obtido

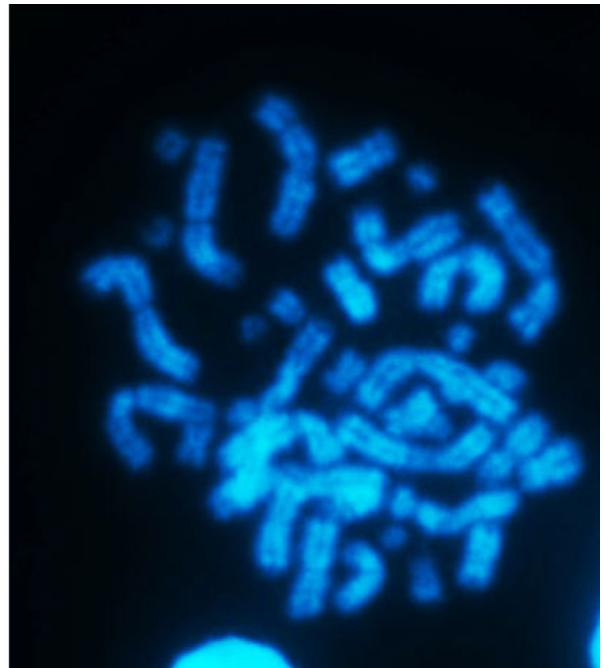
Lonchorhina aurita, mapeamento do gene 18S



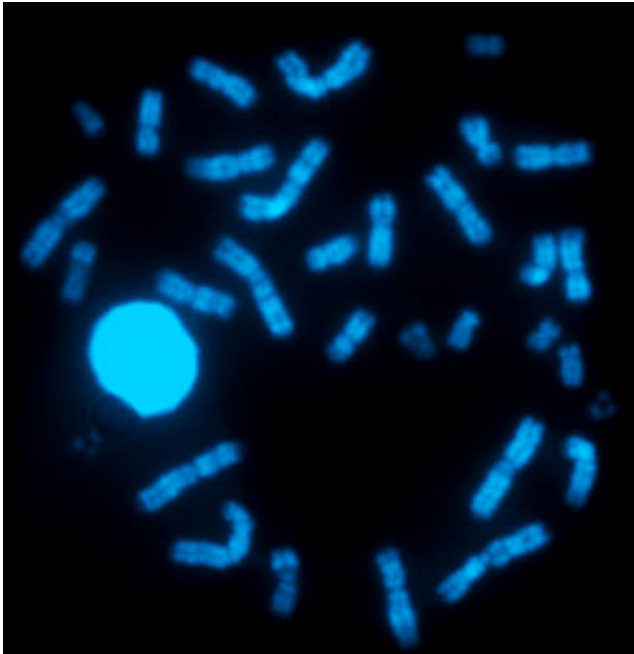
Actinomicina:



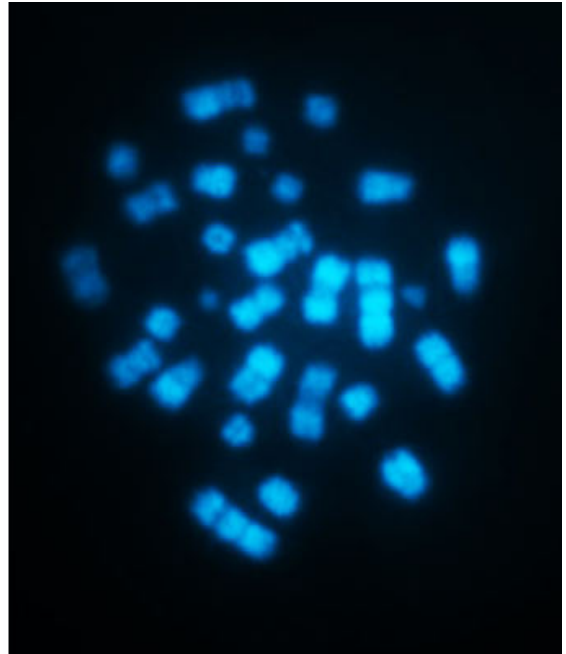
Anoura geoffroyi



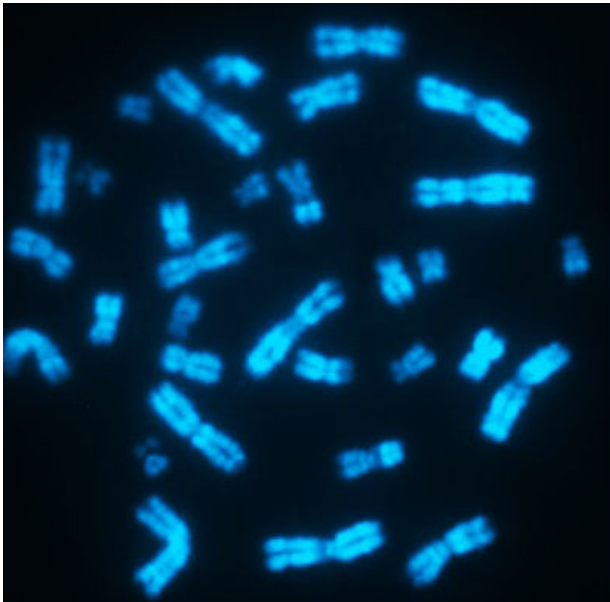
Furipterus horrens



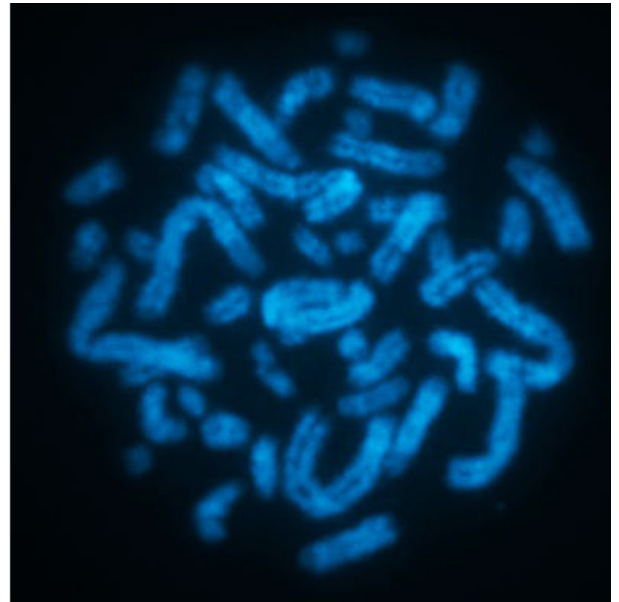
Glossophaga soricina



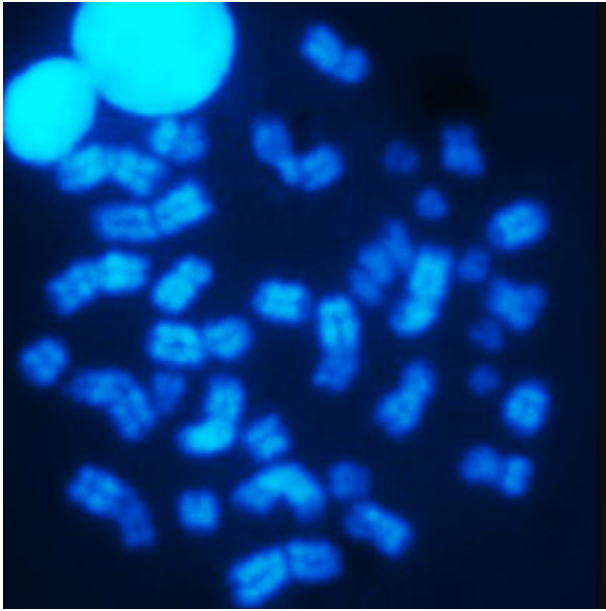
Lionycteris spurreli



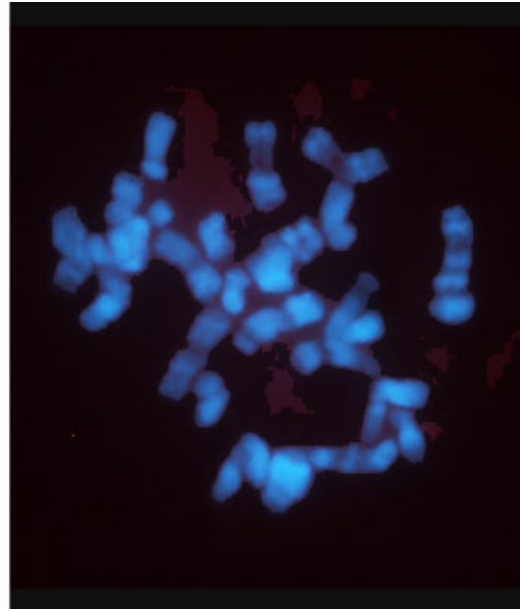
Lonchorhina aurita



Myotis albescens



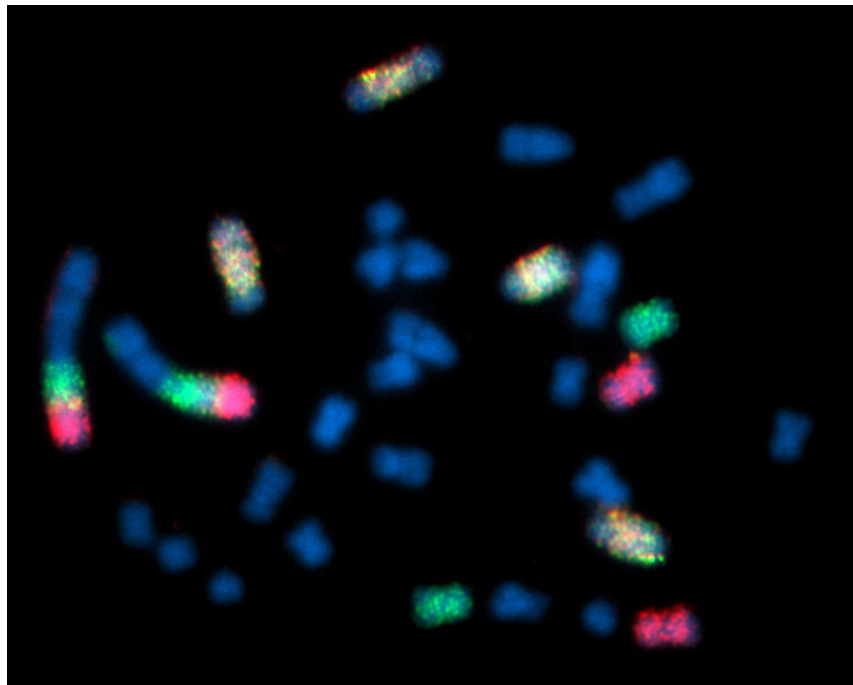
Natalus macrourus



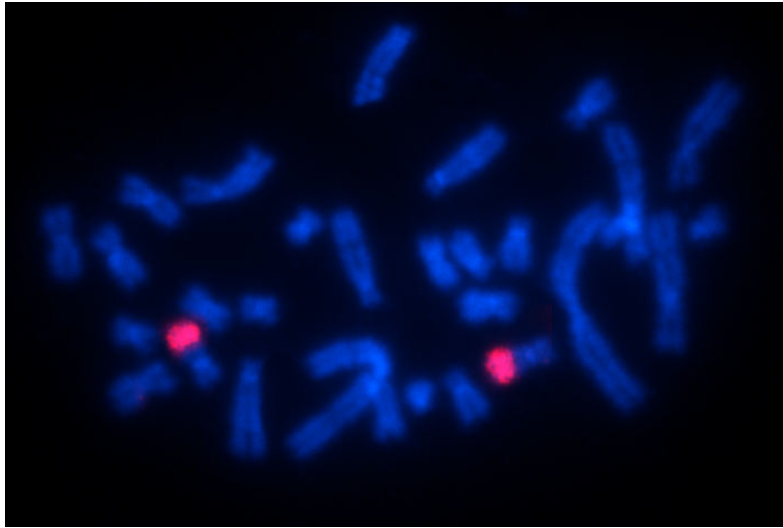
Peropteryx kappleri

Pintura cromossômica em *Anoura geoffroyi*

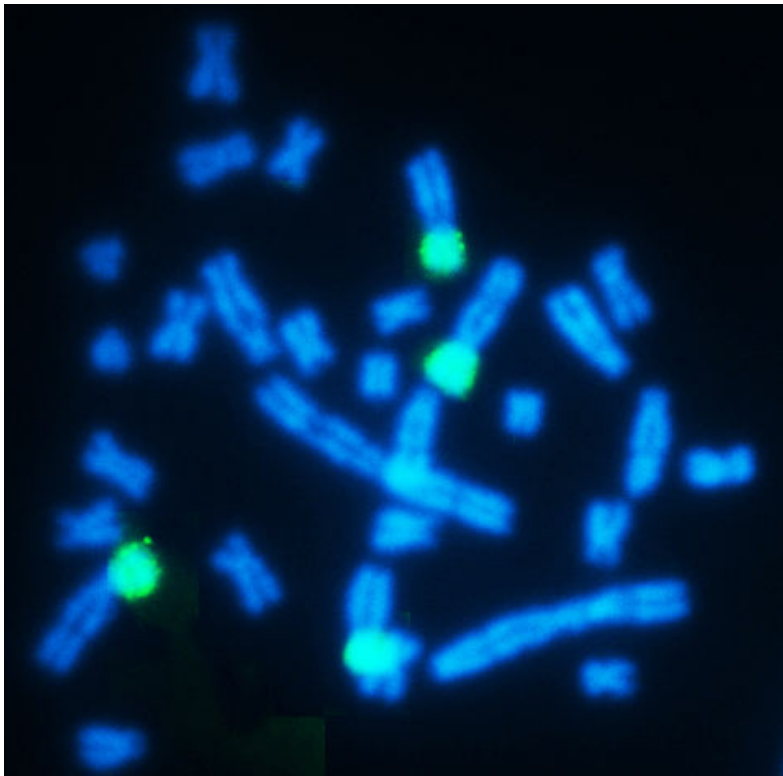
Sondas de cromossomo total de *Phyllostomus hastatus*



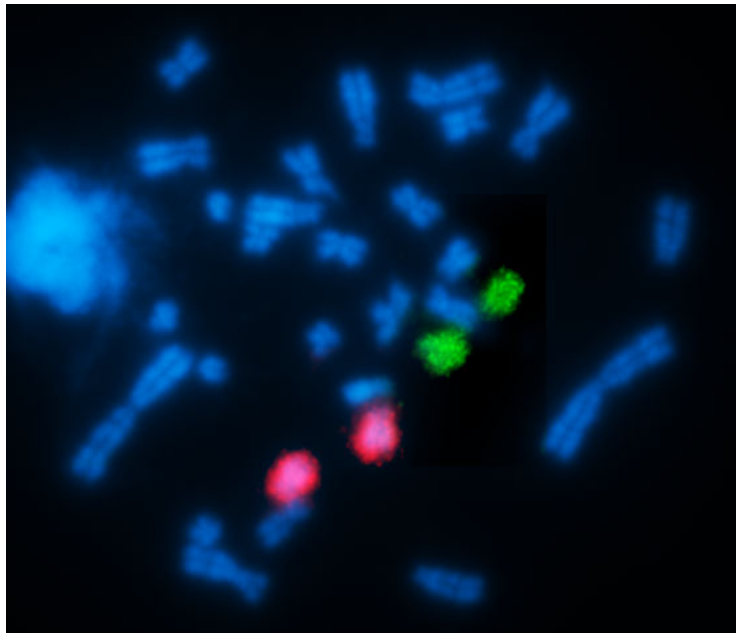
Sondas PHA2 (verde) e PHA3 (vermelho)



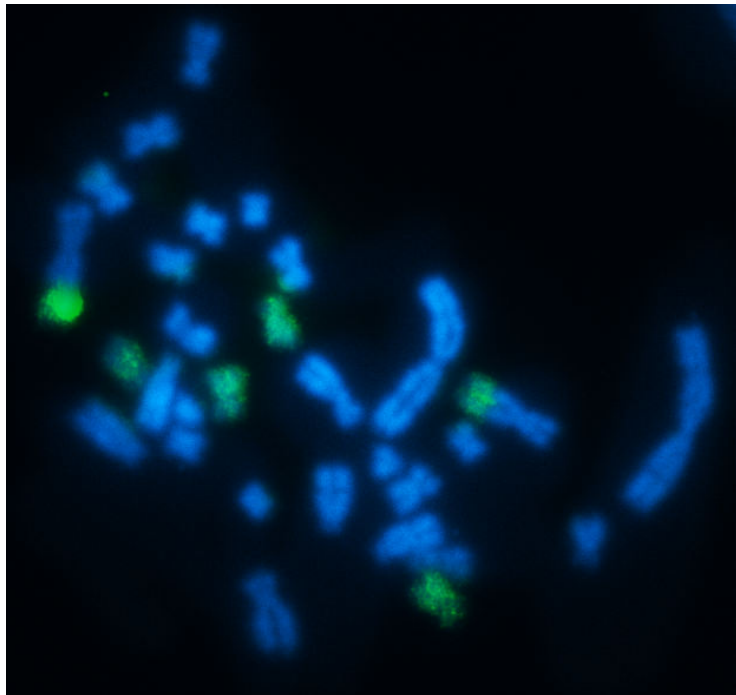
Sonda PHA6



Sonda PHA8

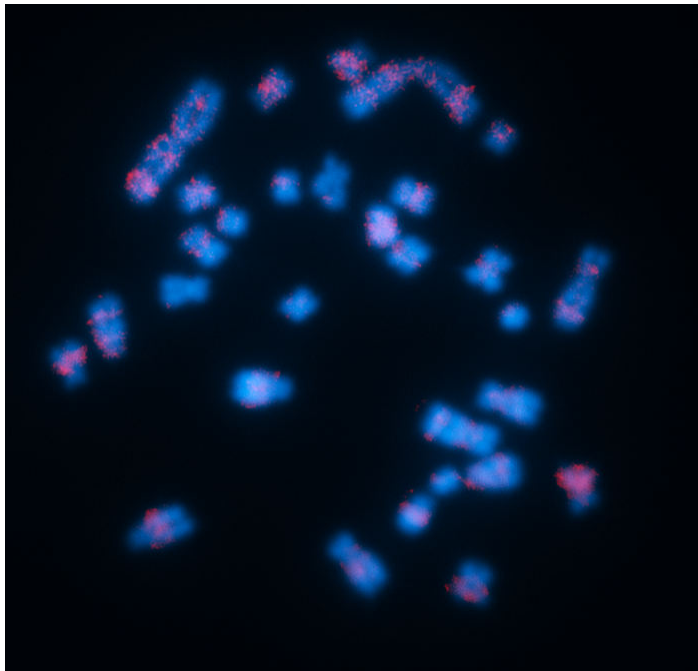


Sondas PHA12 (verde) e PHA9 (vermelho)

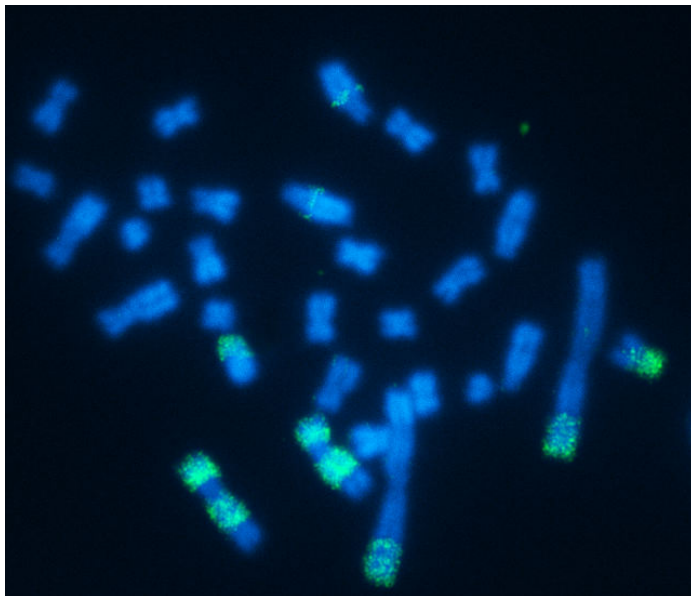


Sonda PHA15

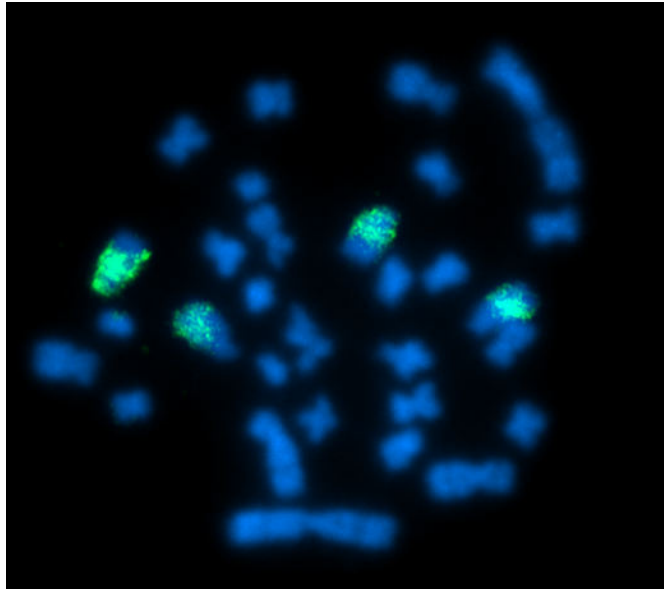
Sondas de cromossomo total de *Carollia brevicauda*



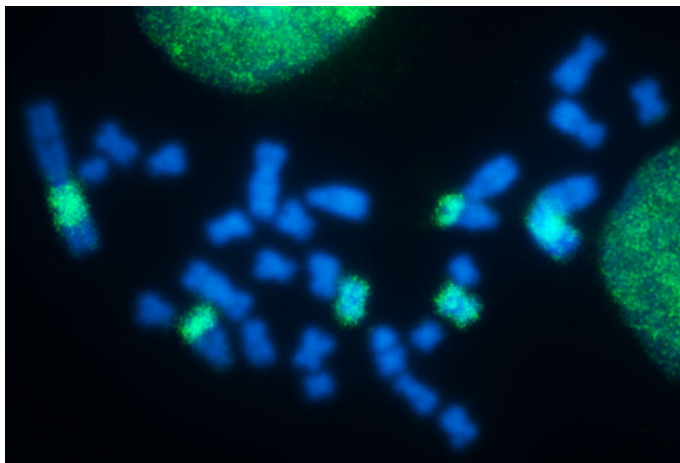
Sonda CBR1



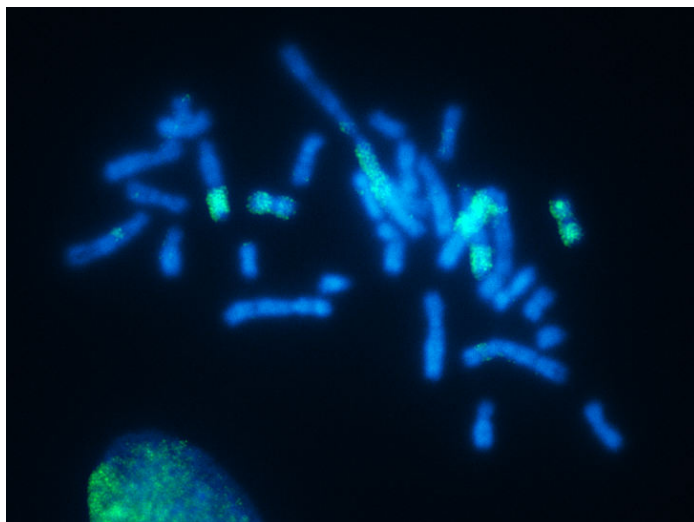
Sonda CBR3



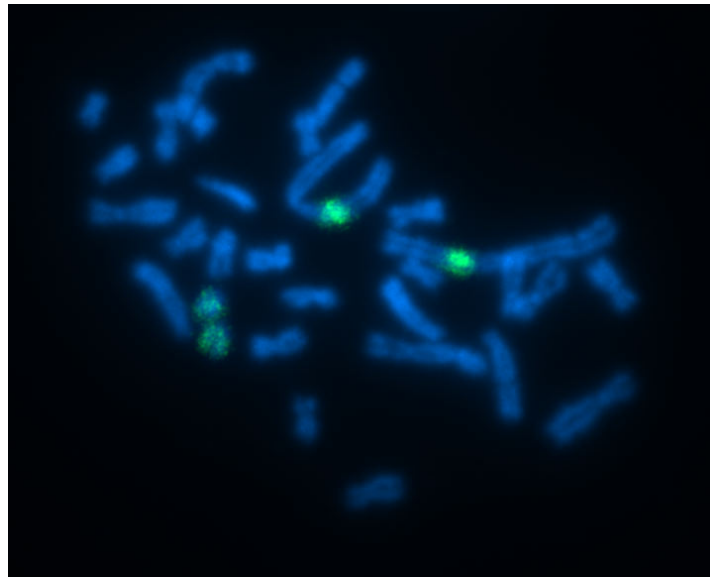
Sonda CBR4



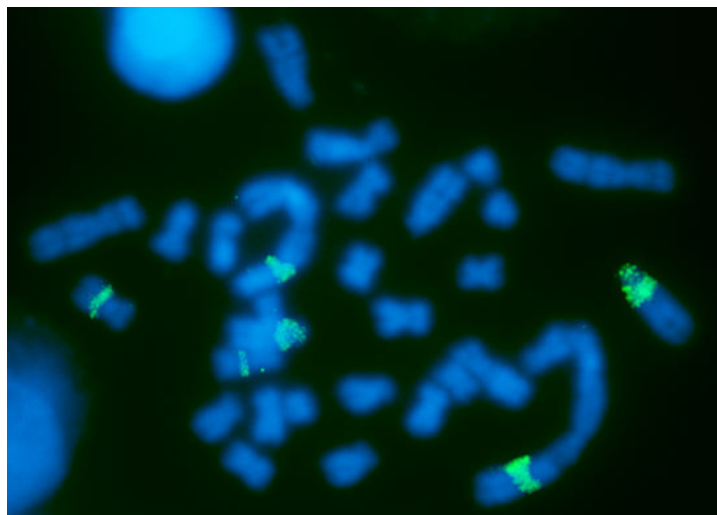
Sonda CBR5



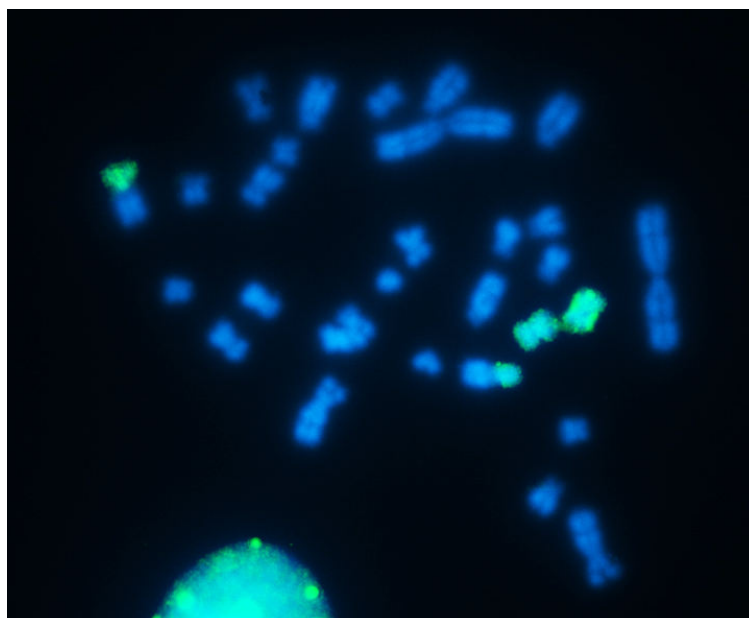
Sonda CBR7



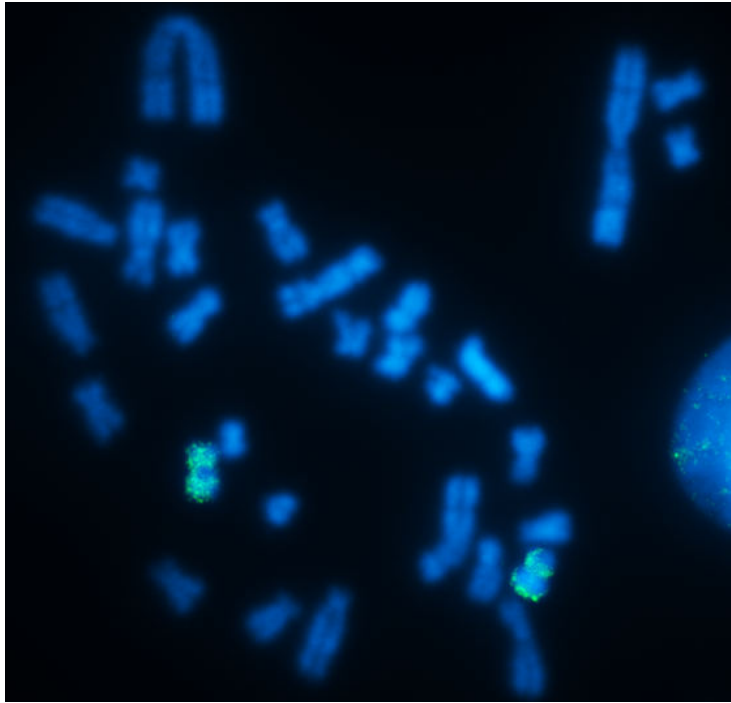
Sonda CBR8



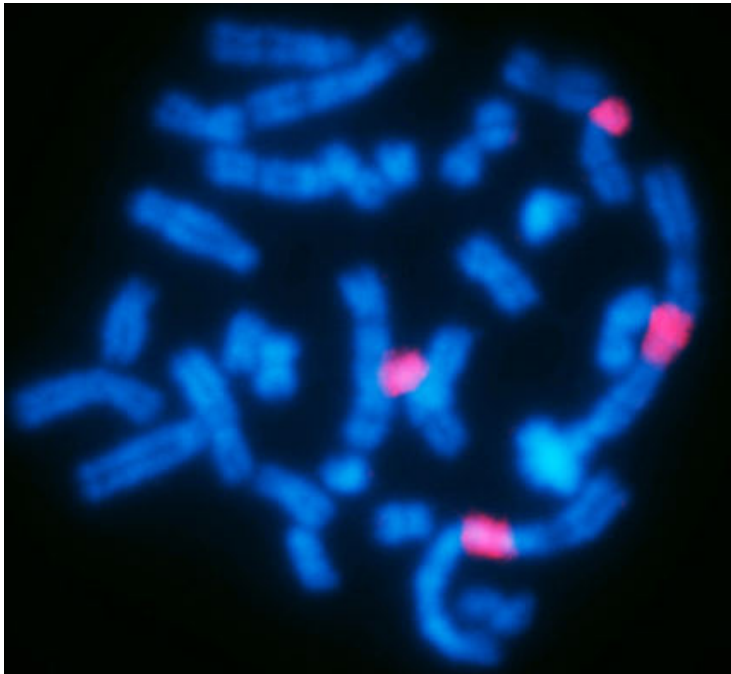
Sonda CBR9



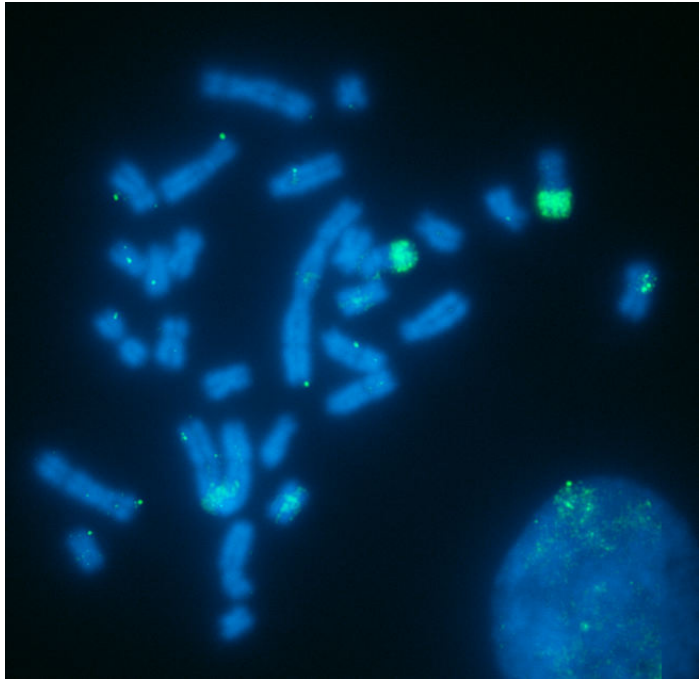
Sonda CBR10



Sonda CBR12



Sonda CBR14



Sonda CBR15