

GISELY TOLEDO BARONE

**Um estudo sobre a filogenia de Chiroptera e sua coevolução com
vírus da raiva**

São Paulo
2022

GISELY TOLEDO BARONE

Um estudo sobre a filogenia de Chiroptera e sua coevolução com vírus da raiva

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4258
FMVZ

Barone, Gisely Toledo
Um estudo sobre a filogenia de Chiroptera e sua coevolução com vírus da raiva / Gisely Toledo Barone. – 2022.
133 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Raiva. 2. Chiroptera. 3. Coevolução. 4. Filogenia. 5. Códons. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 18 de julho de 2022

CEUA N 5612221018

(ID 009406)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Paulo Eduardo Brandão

Área: Doenças Infecciosas

Título da proposta: "Um estudo sobre a filogenia de Chiroptera e sua co-evolução com vírus da raiva".

CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 18/março/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 18/março/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Para comparar a adaptação de utilização de uso de códons entre morcegos e outros possíveis hospedeiros, o modelo murino será adotado. Camundongos albino sulço serão submetidos à inoculação intracerebral, com 0,3mL do sobrenadante da suspensão 20% de SNC de quiróptero positivo para RABV. Serão realizadas 10 passagens em camundongos, com 02 indivíduos por passagem, totalizando 20 camundongos. Todo o processo de inoculação será após anestesia inalatória com halotano. Os animais serão observados e avaliados diariamente, sendo submetidos à eutanásia assim que apresentarem qualquer sintomatologia neurológica, com uso de anestésico injetável (tiopental) por via intraperitoneal. O SNC será retirado e feita extração do RNA viral, RT-PCR e sequenciamento dos genes N e G".

Comentário da CEUA: O uso de tiopental, via intraperitoneal, é extremamente irritante ainda que associado ao uso de lidocaína. Solicita-se ao pesquisador que o protocolo de eutanásia seja revisto baseando na NR 37 do CONCEA. Overdose de isoflurano ou uso de cetamina + xilazina, seguidos ou não por deslocamento cervical, são alternativas.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARONE, Gisely Toledo

Título: **Um estudo sobre a filogenia de Chiroptera e sua coevolução com vírus da raiva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao Du, amor e companheiro de jornada, obrigada por estar ao meu lado. Sempre.

À Larissa, nossa vida, obrigada por nos escolher.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo Eduardo Brandão, pela orientação e constante parceria.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste trabalho.

Muito obrigada!!!

“Se quiser chegar a outro lugar, você deve correr pelo menos duas vezes mais rápido que isso!”

(Hipótese da Rainha Vermelha - Leigh Van Valen, 1973)

RESUMO

BARONE, G. T. **Um estudo sobre a filogenia de Chiroptera e sua coevolução com vírus da raiva**. 2022. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A raiva é uma encefalite viral aguda e quase sempre fatal, tem distribuição global e causa cerca de 59 mil mortes/ano, principalmente em crianças de países em desenvolvimento. Provocada pelo *Lyssavirus rabies* (RABV) - vírus de genoma RNA, formado por cinco genes (N, P, M, G e L), é um dos mais antigos patógenos já descritos pela humanidade, capaz de acometer todos os mamíferos, mas mantém os morcegos (Chiroptera) como hospedeiro reservatório. Os quirópteros são os únicos mamíferos com capacidade para voar, o que os possibilita percorrer grandes distâncias e facilita a disseminação de vírus, como o RABV. Com o intuito de comparar a taxonomia morfológica e molecular de quirópteros, foi realizado o sequenciamento parcial do gene COI de 384 indivíduos, utilizando o SNC de diversas espécies do Estado de São Paulo. Todas as sequências foram depositadas e se encontram disponíveis no banco de dados GenBank (NCBI). A identificação genética das espécies pelo gene COI (DNA *barcoding*) foi resultado do sistema BOLD de identificação, as relações filogenéticas entre os indivíduos foram avaliadas com a elaboração de árvores de Máxima Verossimilhança e com análise dos parâmetros de diversidade genética (número de haplótipos, número de sítios variáveis, diversidade haplotípica e nucleotídica), além da construção das redes de haplótipos, incluindo sequências do gene COI disponíveis em banco de dados. Durante o estudo, foram encontrados indivíduos com sequências do gene COI idênticas, separados por mais de 3mil km de distância geográfica. Diferenças significativas entre a taxonomia morfológica e molecular do gênero *Myotis* foram destacadas, evidenciando a necessidade do uso de marcadores moleculares na identificação de espécies, principalmente as mais complexas. Em paralelo, o viés de uso de códons foi avaliado no genoma completo de RABV, utilizando 51 sequências de isolados já disponíveis em banco de dados. O mRNA da β -actina foi eleito para gerar 43 sequências parciais de quirópteros e utilizá-las como conjunto de referência de genes altamente expressos, empregados na análise dos indicadores de uso de códons, além de gerar a filogenia baseada em β -actina. Índices como conteúdo GC, RSCU, Enc, CAI e RCDI foram calculados, a fim de avaliar o viés de uso e inferir a força evolutiva que o

influencia, apesar de RABV apresentar baixo viés de utilização. Valores de RSCU foram convertidos em dados binários e possibilitaram gerar cinco árvores de *Neighbor-Joining*. Um ensaio *in vivo* foi realizado em camundongos inoculados com amostra de quiróptero positivo para raiva, com finalidade de comparar a carga viral na mudança de hospedeiros e verificar suas implicações no uso de códons. De maneira geral, RABV mostrou-se um vírus de baixo viés de uso de códons, preferindo utilizar os terminados em A/T, além de indicar que o viés é influenciado pela seleção natural. Os padrões de uso de códons são diretamente influenciados pela coevolução entre vírus e hospedeiros.

Palavras-chave: Raiva. Chiroptera. Coevolução. Filogenia. Códons.

ABSTRACT

BARONE, G. T. **A study on the phylogeny of Chiroptera and its coevolution with rabies virus**. 2022. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Rabies is an acute and almost always fatal viral encephalitis, has a global distribution and causes about 59,000 deaths/year, mainly in children in developing countries. Caused by *Lyssavirus rabies* (RABV) - an RNA genome virus, formed by five genes (N, P, M, G and L), it is one of the oldest pathogens ever described by humanity, capable of affecting all mammals, but maintaining the bats (Chiroptera) as a reservoir host. Chiropterans are the only mammals capable of flying, which allows them to travel great distances and facilitates the spread of viruses such as RABV. In order to compare the morphological and molecular taxonomy of bats, a partial sequencing of the COI gene of 384 individuals was performed, using the CNS of several species from the State of São Paulo. All sequences have been deposited and are available in the GenBank database (NCBI). The genetic identification of species by the COI gene (DNA barcoding) was the result of the BOLD identification system, the phylogenetic relationships between individuals were evaluated with the elaboration of Maximum Likelihood trees and with the analysis of genetic diversity parameters (number of haplotypes, number of variable sites, haplotypic and nucleotide diversity), in addition to the construction of haplotype networks, including sequences of the COI gene available in the database. During the study, individuals with identical COI gene sequences were found, separated by more than 3,000 km of geographic distance. Significant differences between the morphological and molecular taxonomy of the genus *Myotis* were highlighted, pointing to the need to use molecular markers to identify species, especially the more complex ones. In parallel, the codon usage bias was evaluated in the complete genome of RABV, using 51 sequences of isolates already available in the database. The β -actin mRNA was chosen to generate 43 partial sequences of chiropterans and use them as a reference set of highly expressed genes, used in the analysis of indicators of codon usage, in addition to generating the β -actin-based phylogeny. Indices such as GC, RSCU, Enc, CAI and RCDI content were calculated in order to assess the usage bias and infer the evolutionary force that influences it, despite the fact that RABV has a low usage bias. RSCU values were converted into binary data and made it possible to generate five Neighbor-Joining

trees. An in vivo assay was carried out in mice inoculated with a sample of chiroptera positive for rabies, in order to compare the viral load in the change of hosts and to verify its implications in the use of codons. In general, RABV was shown to be a virus with low codon use bias, preferring to usage codons ending in A/T, in addition to indicating that the bias is influenced by natural selection. Codon usage patterns are directly influenced by coevolution between viruses and hosts.

Keywords: Rabies. Chiroptera. Coevolution. Phylogeny. Codons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - célula animal e DNA mitocondrial	27
Figura 2 - Mapa do Estado de São Paulo	32
Figura 3 - Árvore de inferência filogenética – Molossidae	36
Figura 4 - Árvore de inferência filogenética – Phyllostomidae	38
Figura 5 - Árvore de inferência filogenética – Vespertilionidae	40
Figura 6 - Rede de haplótipos – <i>Cynomops</i> (Cyn)	45
Figura 7 - Rede de haplótipos – <i>Eumops</i> (Eum)	46
Figura 8 - Rede de haplótipos – <i>Molossops</i> (Mps)	46
Figura 9 - Rede de haplótipos – <i>Molossus</i> (Mol)	47
Figura 10 - Rede de haplótipos – <i>Nyctinomops</i> (Nyc)	48
Figura 11 - Rede de haplótipos – <i>Promops</i> (Pro)	49
Figura 12 - Rede de haplótipos – <i>Tadarida</i> (Tad)	49
Figura 13 - Rede de haplótipos – <i>Artibeus</i> (Art)	50
Figura 14 - Rede de haplótipos – <i>Carollia</i> (Car)	51
Figura 15 - Rede de haplótipos – <i>Glossophaga</i> (Glo)	52
Figura 16 - Rede de haplótipos – <i>Phyllostomus</i> (Phy)	52
Figura 17 - Rede de haplótipos – <i>Platyrrhinus</i> (Pla)	53
Figura 18 - Rede de haplótipos – <i>Sturnira</i> (Stu)	54
Figura 19 - Rede de haplótipos modificada – <i>Sturnira</i> (Stu)	54
Figura 20 - Rede de haplótipos – <i>Eptesicus</i> (Ept)	55
Figura 21 - Rede de haplótipos – <i>Lasiurus</i> (Las)	56
Figura 22 - Rede de haplótipos – <i>Myotis</i> (Myo)	57
Figura 23 - Representação do RABV	63
Figura 24 - Esquema representativo dos cinco genes RABV	64
Figura 25 - Árvore de inferência filogenética baseada em β -actina	79
Figura 26 – <i>Heatmap</i> dos valores de RSCU para o gene N dos isolados RABV e os respectivos hospedeiros originais	84
Figura 27 – <i>Heatmap</i> dos valores de RSCU para o gene P dos isolados RABV e os respectivos hospedeiros originais	85
Figura 28 – <i>Heatmap</i> dos valores de RSCU para o gene M dos isolados RABV e os respectivos hospedeiros originais	86

Figura 29 – <i>Heatmap</i> dos valores de RSCU para o gene G dos isolados RABV e os respectivos hospedeiros originais	87
Figura 30 – <i>Heatmap</i> dos valores de RSCU para o gene L dos isolados RABV e os respectivos hospedeiros originais	88
Figura 31 – Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene N)	91
Figura 32 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene P)	92
Figura 33 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene M).....	93
Figura 34 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene G).....	94
Figura 35 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene L).....	95
Figura 36 – Representação gráfica de Enc-plot para os cinco genes RABV	97
Figura 37 – Representação gráfica da carga viral RABV	101
Figura 38 – Eletroferogramas referente ao aminoácido 333 do gene G de RABV ..	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - <i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificação do gene COI	29
Quadro 2 - Códon e aminoácidos	65
Quadro 3 - <i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificação da β -actina.....	70
Quadro 4 – <i>Primers</i> utilizados na qPCR para amplificação de RABV (gene N) e β -actina.....	76
Quadro 5 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação de RABV (genes N e G).....	77
Quadro 6 – Conteúdo GC total e local dos isolados RABV	80
Quadro 7 – Valores de Enc para os cinco genes RABV	96
Quadro 8 - Valores médios de CAI para os cinco genes RABV em comparação com a β -actina	98
Quadro 9 - Valores médios de CAI para os cinco genes RABV comparados ao conjunto de referência CAIcal.....	99
Quadro 10 – Valores de RCDI para os cinco genes RABV em comparação com a β -actina.....	99
Quadro 11 - Valores de RCDI para os cinco genes RABV comparados ao conjunto de referência CAIcal.....	100
Quadro 12 - Valores de CAI e RCDI para os genes N e G de RABV, β -actina como referência	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Score</i> de compatibilidade BOLD das sequências COI geradas	33
Tabela 2 - Divergência de nucleotídeos, por Kimura-2-parâmetros	41
Tabela 3 - Parâmetros de diversidade entre as sequências COI geradas	42
Tabela 4 – RSCU médio entre os genes RABV	81
Tabela 5 – Códonns conservados	83
Tabela 6 – Carga viral RABV	101

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	19
Capítulo I: Estudo filogenético dos quirópteros baseado no gene citocromo oxidase subunidade I (COI)	26
2 INTRODUÇÃO	26
3 HIPÓTESE	28
4 OBJETIVOS	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS	28
5.1.1 Extração do DNA total	29
5.1.2 Amplificação do gene COI	29
5.1.3 Purificação e reação de sequenciamento	30
5.1.4 Edição e análise das sequências	30
5.1.5 Filogenia baseada em gene COI	31
5.1.6 Estrutura populacional	31
6 RESULTADOS	32
6.1 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	32
6.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA	34
6.3 DIVERSIDADE MOLECULAR DAS ESPÉCIES	41
7 DISCUSSÃO	58
8 CONCLUSÕES	62
Capítulo II: Relação entre variantes do vírus da raiva e diversos hospedeiros sob o ponto de vista da utilização de códons	63
9 INTRODUÇÃO	63
10 HIPÓTESE	68
11 OBJETIVOS	69
12 MATERIAIS E MÉTODOS	69
12.1 AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS	69

12.1.1	Extração do RNA total	69
12.1.2	Transcrição Reversa e Amplificação parcial do mRNA de β -actina	70
12.1.3	Purificação de <i>amplicons</i> e reação de sequenciamento de DNA	71
12.1.4	Edição e análise das sequências	71
12.1.5	Filogenia baseada em β -actina	72
12.2	ANÁLISE DO USO DE CÓDONS	72
12.2.1	Análise do conteúdo GC.....	72
12.2.2	<i>Relative Synonymous Codon Usage</i> (RSCU)	73
12.2.3	<i>Effective Number of Codons</i> (Enc).....	73
12.2.4	<i>Codon Adaptation Index</i> (CAI).....	74
12.2.5	<i>Relative Codon Deoptimization Index</i> (RCDI)	74
12.3	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	74
12.3.1	Quantificação da carga viral por qPCR	75
12.3.2	Amplificação dos genes N e G das passagens em camundongo.....	77
12.3.3	Comparando os valores de CAI	77
13	RESULTADOS	78
13.1	SEQUÊNCIAS PARCIAIS DE QUIRÓPTEROS	78
13.1.2	Análise Filogenética	78
13.2	SEQUÊNCIAS DE ISOLADOS DE RABV PARA REFERÊNCIA	80
13.3	ANÁLISE DO USO DE CÓDONS	80
13.3.1	Conteúdo GC	80
13.3.2	Índice RSCU.....	81
13.3.3	Índice Enc.....	96
13.3.4	Índice CAI.....	98
13.3.5	Índice RCDI	99
13.4	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	100
14	DISCUSSÃO	104
15	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS	108
	APÊNDICES	119

1 REVISÃO DE LITERATURA

A ordem Chiroptera comporta toda a diversidade de morcegos e representa em torno de 25% da multiplicidade de todos os mamíferos, sendo constituída por aproximadamente 20 famílias e mais de 1400 espécies descritas e distribuídas em todos os continentes, exceto na Antártida (KUZMIN *et al.*, 2012; RODHAIN, 2015; YOON; PARK, 2015; AFELT *et al.*, 2018; FUMAGALLI; ZAPPER; LA PORTA, 2021). É considerada a segunda ordem de mamíferos em termos de distribuição de indivíduos, superada apenas pelos primatas, devido à disseminação global dos humanos (MORATELLI; CALISHER, 2015). No Brasil, a ordem está representada por 9 famílias, compostas por 65 gêneros e 182 espécies de morcegos (MOTA *et al.*, 2022).

Os quirópteros podem viver em grandes colônias ou relativamente solitários, alojados em abrigos naturais, como cavernas, fendas, cupinzeiros, ocos de árvores e folhagens, ou em abrigos artificiais criados pelo homem, como vãos de dilatação de construções, túneis, bueiros, sótãos e forros de residências (KUZMIN *et al.*, 2011; MORATELLI; CALISHER, 2015; RODHAIN, 2015). Possuem hábito alimentar variado: a maioria dos morcegos são insetívoros ou frugívoros, mas existem nectarívoros, carnívoros e hematófagos (RODHAIN, 2015).

As espécies de morcegos apresentam grande diversidade de habitat, ciclo de vida, tamanho da população, dispersão e massa corporal (WYNNE; WANG, 2013; MORATELLI; CALISHER, 2015). Na espécie *Pteropus* spp, conhecida popularmente como raposa-voadora, alguns indivíduos podem ter 1 kg de peso corpóreo e até 2 metros de envergadura, enquanto o morcego-abelha (*Craseonycteris thonglongyai*) possui somente 2,0 gramas quando adulto (RODHAIN, 2015). Com base apenas na massa corporal desses animais, podemos considerar que os quirópteros são a ordem com o tempo de vida mais longo entre os mamíferos (KUZMIN *et al.*, 2011), vivendo por um período médio entre 10 e 30 anos (RODHAIN, 2015). Segundo Wilkinson e South (2002), existem registros de 5 indivíduos de espécies insetívoras (*Plecotus auritus*, *Myotis lucifugus*, *Myotis brandtii*, *Myotis blythii* e *Rhinolophus ferrumequinum*) que ultrapassaram a idade de 30 anos sobrevivendo na natureza e 1 indivíduo frugívoro (*Pteropus giganteus*) que sobreviveu em cativeiro por igual período. Em 2005, Podlutzky *et al.* divulgaram a recaptura de um morcego insetívoro da espécie *Myotis brandtii*, originalmente capturado e anilhado em 1964, sendo considerado o

pequeno mamífero mais antigo já documentado na natureza, um recorde de longevidade com 41 anos de idade.

Alguns pequenos mamíferos arborícolas, como o esquilo voador e o gambá planador, possuem habilidade em planar de uma árvore à outra, mas os morcegos são os únicos mamíferos com capacidade de sustentar voo, atividade que exige um mecanismo altamente complexo, considerando as perspectivas morfológica, fisiológica e aerodinâmica (SHEN *et al.*, 2010; KUZMIN *et al.*, 2011; MEGANATHAN *et al.*, 2012; RODHAIN, 2015). A aptidão para voar auxilia no desempenho das funções de polinizadores, dispersores de sementes e controle de insetos, além de permitir sua migração por longas distâncias, proporcionando a ampla distribuição geográfica dessa ordem. Em contrapartida, o voo pode facilitar a transmissão global de doenças emergentes inter e intra espécies (KUZMIN *et al.*, 2011; WYNNE; WANG, 2013; GUPTA *et al.*, 2021).

O voo é a atividade que demanda maior consumo energético quando comparado ao correr ou caminhar e exige adaptações metabólicas para que possa ser executado (SHEN *et al.*, 2010; WANG; WALKER; POON, 2011), por esse motivo, é provável que os genes envolvidos no metabolismo dos morcegos tenham sofrido adaptações evolutivas levando esses mamíferos a alcançar a incrível capacidade de locomoção (SHEN *et al.*, 2010; MEGANATHAN *et al.*, 2012). Durante o voo, os morcegos têm a necessidade de aumentar suas taxas metabólicas entre 15 e 16 vezes, enquanto as aves elevam o metabolismo em apenas duas vezes para executar esta ação, ao mesmo tempo que pequenos roedores exigem um aumento de sete vezes em seu metabolismo para efetuar uma corrida, até o ponto de exaustão (O'SHEA *et al.*, 2014; AFELT *et al.*, 2018).

Altas taxas metabólicas, como a dos morcegos, resultam na geração de subprodutos metabólicos, capazes de promover dano oxidativo ao DNA mitocondrial (mtDNA) e outras estruturas celulares (WANG; WALKER; POON, 2011; GUPTA *et al.*, 2021). Animais com alto dano oxidativo apresentam tempo de vida curto, contrariamente aos morcegos, que possuem vida longa (GUPTA *et al.*, 2021). Além disso, o dano oxidativo ao mtDNA é conhecido como importante mecanismo de tumorigênese e, surpreendentemente, os morcegos possuem menor prevalência de tumores que outros animais (WANG; WALKER; POON, 2011; WYNNE; WANG, 2013; BROOK; DOBSON, 2015). Estudos mostram que os quirópteros são capazes de resistir aos danos oxidativos com mais eficiência que mamíferos terrestres de

tamanho comparável, minimizando, assim, os impactos da longevidade (WANG; WALKER; POON, 2011; BROOK; DOBSON, 2015).

As mitocôndrias dos morcegos, além de controlarem o metabolismo celular, podem ser responsáveis por algumas características biológicas desses animais, como alterações da temperatura corporal durante o voo e resposta imunológica frente às infecções virais e bacterianas (WANG; WALKER; POON, 2011). Algumas espécies podem permanecer em estado de torpor diário, diminuindo drasticamente seu metabolismo e temperatura corporal, com a finalidade de poupar energia (WANG; WALKER; POON, 2011; RODHAIN, 2015; FUMAGALLI; ZAPPER; LA PORTA, 2021). A temperatura corporal dos morcegos, quando em repouso, se aproxima da temperatura do ar ambiente, mas, durante o voo, pode facilmente ultrapassar os 40 °C, razão pela qual a evolução do voo dos morcegos já foi sugerida como possível mecanismo de controle viral desses animais (BROOK; DOBSON, 2015; AFELT *et al.*, 2018; FUMAGALLI; ZAPPER; LA PORTA, 2021). O aumento da temperatura corporal dos morcegos durante o voo é semelhante à febre produzida como resposta imunológica nos demais mamíferos (temperatura entre 38 °C e 41 °C), em que o calor gerado é capaz de reduzir a replicação do patógeno e aumentar a eficiência da resposta imune do organismo, resultando em menor tempo de duração da doença e maior chance de sobrevivência ao hospedeiro (O'SHEA *et al.*, 2014). Essa interação vírus-hospedeiro na condição de voo em estado febril pode ser a responsável pela alta patogenicidade dos vírus quando ocorrem eventos de *spillover* para outros mamíferos, considerando que esses patógenos estariam adaptados para sobreviver em condições febris e sob variação de temperatura (BROOK; DOBSON, 2015; MORATELLI; CALISHER, 2015; AFELT *et al.*, 2018).

Alguns vírus com característica letal para humanos e outros animais parecem não apresentar patogenicidade para os morcegos, provavelmente devido ao longo processo coevolutivo entre eles (AFELT *et al.*, 2018). Quando um vírus está bem adaptado ao hospedeiro reservatório, pouco ou nenhum sinal clínico da doença se torna aparente, mas, a partir do momento que o vírus salta a barreira das espécies, troca de hospedeiro e atinge a espécie humana, os resultados podem ser devastadores (SMITH; WANG, 2013; DING *et al.*, 2017). Eventos bem sucedidos em que o patógeno troca de hospedeiro para infectar uma nova espécie são chamados de *host shift* e, frequentemente, são os responsáveis por surtos de doenças virais emergentes, com respostas imprevisíveis, apresentando variações no

desenvolvimento da doença, desde infecções assintomáticas até a morte prematura da nova espécie hospedeira (LONGDON *et al.*, 2014 e 2015; ALCALA *et al.*, 2017).

Estudos mostram que, além dos morcegos serem reservatórios de importantes vírus zoonóticos, como o vírus da Raiva, Nipah, Hendra, Ebola e muitos coronavírus, incluindo o SARS-CoV-2 (FUMAGALLI; ZAPPER; LA PORTA, 2021), esses animais possuem um sistema imunológico particularmente eficaz, e são capazes de abrigar um maior número de vírus que os roedores ou qualquer outra ordem de mamíferos (LUIS *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2017; O'SHEA *et al.*, 2014). Em torno de 130 vírus já foram identificados em morcegos, sendo 60 deles zoonóticos e extremamente patogênicos ao homem (GUPTA *et al.*, 2021). Apesar do risco que os vírus emergentes de morcegos representam para a saúde humana, é essencial reconhecer que a maioria dos surtos de doenças zoonóticas transmitidas por morcegos são consequências das ações humanas (WYNNE; WANG, 2013).

A raiva é uma encefalite viral aguda, progressiva, praticamente incurável e quase sempre fatal em humanos (TROUPIN *et al.*, 2016; VELASCO-VILLA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018), considerada a zoonose viral com maior taxa de letalidade conhecida pela humanidade (>99,9%), sem tratamento eficaz comprovado após o aparecimento dos sinais clínicos da doença (KUZMIN *et al.*, 2011; RUPPRECHT; KUZMIN; MESLIN, 2017; FISHER *et al.*, 2020). Está presente em quase todos os continentes, com exceção da Antártida (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; KUZMIN *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2017; FISHER *et al.*, 2020).

Apesar da existência e disponibilidade de uma vacina eficaz, ainda ocorrem cerca de 59 mil mortes humanas ao ano, segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018), principalmente em crianças menores de 15 anos (WOBESSI *et al.*, 2021) nos países em desenvolvimento da Ásia, África e América Latina, onde estão concentrados 95% dos casos de raiva em humanos (TAO *et al.*, 2013; VELASCO-VILLA *et al.*, 2017). O continente Asiático é responsável por 80% desses casos, com China e Índia centralizando o maior índice de pessoas acometidas (HE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). A raiva é um problema de saúde pública ignorado, considerada uma doença negligenciada, sobretudo nos países com infraestrutura de saúde deficiente, onde acredita-se que o número de mortes humanas é subestimado (ZHANG *et al.*, 2018; FISHER *et al.*, 2020; WOBESSI *et al.*, 2021).

A raiva pode ser a doença infecciosa humana mais antiga já descrita, com registros datados de 2300 a.C., sendo mencionada no Código de Eshnunna, que

ditava as leis dessa cidade babilônica da antiga Mesopotâmia, onde as autoridades aplicavam severas multas aos donos de cães raivosos que mordiam e causavam a morte de pessoas (MORATELLI; CALISHER, 2015; PANTHA *et al.*, 2020). Aproximadamente em 400 a.C., o filósofo grego Aristóteles referenciou a raiva como a 'loucura do cão', descrevendo que os cães sofriam de loucura e que todos os animais que eram mordidos por eles também se tornavam loucos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; MORATELLI; CALISHER, 2015; PANTHA *et al.*, 2020). No século I, o escritor romano Cardanus descreveu a saliva de um cão raivoso como '*virus*' (do latim: veneno), mas somente em 1804 o cientista alemão Georg Gottfried Zinke provou que a raiva podia ser transmitida pela saliva de cães raivosos, ao injetar a saliva de um cão doente em um cão saudável (WANG; GUO, 2012; MORATELLI; CALISHER, 2015).

A infecção geralmente tem início com o contato da saliva de um animal infectado, seja por mordida, arranhadura ou lambedura do tecido muscular lesionado, em que o vírus da raiva (*Lyssavirus rabies*, RABV) é depositado na lesão e, por força centrípeta, consegue atingir os nervos periféricos, alcançando o sistema nervoso central (SNC) do indivíduo, local em que ocorre a replicação viral e, por força centrífuga, o RABV é disseminado para as glândulas salivares (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018). Por ser um vírus de natureza neurotrópica, o RABV é capaz de alterar o comportamento do indivíduo infectado, promovendo o contato com outros animais, podendo aumentar a agressividade, salivação e tendência para morder, garantindo sua transmissão a um novo indivíduo (MARSTON *et al.*, 2018).

Durante a maior parte do ciclo de vida do RABV, a infecção permanece assintomática, os sinais clínicos neurológicos aparecem somente nos estágios finais da doença, que geralmente mata o indivíduo em poucos dias, por parada cardíaca ou insuficiência respiratória (DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015; MORLA; MAKHIJA; KUMAR, 2016). O período médio de incubação varia entre 1 e 3 meses, mas existem registros do desenvolvimento da raiva em apenas alguns dias ou mesmo anos após a exposição ao vírus (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002). Devido à vacinação dos animais domésticos, a doença tem sido controlada nos países desenvolvidos, mas, apesar dessa e de outras ações de controle, surtos esporádicos de raiva em animais silvestres ainda podem ser considerados imprevisíveis (FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018; MARSTON *et al.*, 2018; FISHER *et al.*, 2020).

O RABV é um dos mais antigos agentes patogênicos já descritos, pertence ao gênero *Lyssavirus* (deusa grega *Lyssa*: espírito da fúria, loucura ou raiva) (GREEN; CARPENTER; DUNN, 2011; DAVIS; RALL; SCHNELL, 2015; PANTHA *et al.*, 2020), que inclui outras 16 espécies de vírus, segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Está inserido na ordem Mononegavirales e na família Rhabdoviridae, sendo mantido por mutações entre os hospedeiros das ordens Carnivora e Chiroptera, apesar de possuir capacidade para acometer todos os mamíferos (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; TROUPIN *et al.*, 2016; MARSTON *et al.*, 2018).

Badrane e Tordo (2001) e Rodhain (2015) acreditam na possibilidade de que o gênero *Lyssavirus* teve origem em um Rhabdovirus presente em insetos e que morcegos insetívoros possam ter contraído o vírus ao se alimentarem de insetos contaminados. Além disso, sugerem que algum vírus dos morcegos possa ser o ancestral do gênero *Lyssavirus* e que trocas bem-sucedidas de hospedeiros (*host shift*), entre as diversas espécies de morcegos, tenham determinado a história evolutiva de ambos. Moratelli e Calisher (2015) apontam que os fósseis mais antigos de morcegos datam de 65 a 55 milhões de anos, entre os períodos Paleoceno e Eoceno, onde surgiram os primeiros vírus do gênero *Lyssavirus*, relatando um provável e longo processo coevolutivo entre eles (RODHAIN, 2015; AFELT *et al.*, 2018). As ordens Carnivora e Chiroptera possuem indivíduos ecologicamente distintos, mas, devido aos eventos *host shift*, é possível supor que o RABV que circula entre os morcegos tenha adquirido a informação genética necessária para romper a barreira filogenética das espécies, induzindo assim sua transmissão permanente nos carnívoros e definindo o gênero viral como o conhecemos atualmente (BADRANE; TORDO, 2001; DING *et al.*, 2017; MARSTON *et al.*, 2018).

Apesar da raiva ser a patologia mais pesquisada entre as infecções virais dos quirópteros (KUZMIN *et al.*, 2011), apenas em 1911 o RABV foi associado aos morcegos, durante um surto de raiva que devastou criações com 4 mil bovinos e 1 mil equinos no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, em que o médico italiano Antonio Carini observou os herbívoros com sintomas da doença após terem contato prévio com morcegos hematófagos e confirmou o diagnóstico em laboratório (CARINI, 1911; MORATELLI; CALISHER, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho pretende contribuir com dados filogenéticos e coevolutivos entre RABV e a ordem Chiroptera, comparando padrões

de evolução do vírus associados à adaptação desses hospedeiros. Para tanto, o estudo foi dividido em dois capítulos, o primeiro aborda a filogenia da ordem Chiroptera com base no gene citocromo oxidase subunidade I (gene COI) e o segundo, analisa a adaptação do RABV aos indivíduos dessa ordem, sob o ponto de vista do uso de códons.

CAPÍTULO I: Estudo filogenético dos quirópteros baseado no gene citocromo oxidase subunidade I (COI)

2 INTRODUÇÃO

A filogenia é capaz de estimar a história evolutiva de uma espécie ou de diferentes grupos, inferindo a hipótese de relacionamento evolutivo entre os indivíduos. A análise filogenética permite descrever o provável caminho evolutivo percorrido por um patógeno e seus hospedeiros, possibilitando representar graficamente essa hipótese evolutiva em uma árvore filogenética (CALDART *et al.*, 2016).

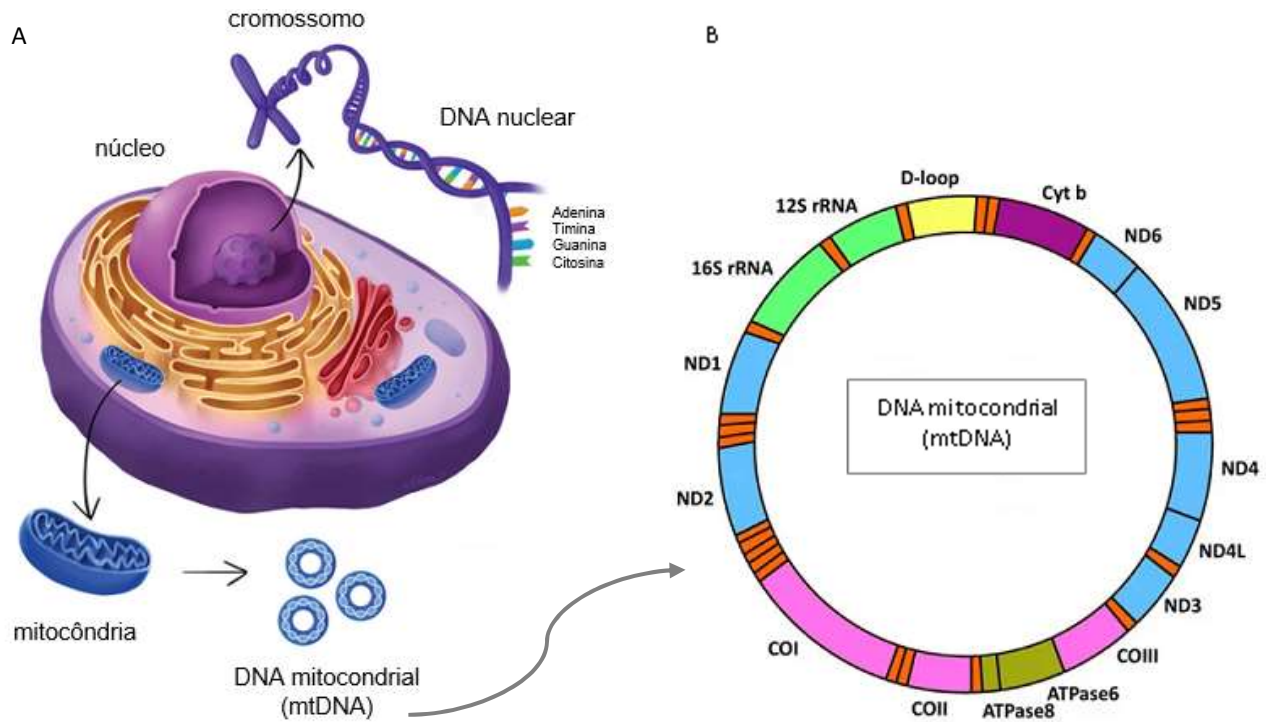
Análises filogenéticas baseadas em genes mitocondriais são úteis para entender a relação entre grupos distintos, calcular distâncias genéticas entre as espécies, inferir parentesco e estimar padrões de migração. Essas características tornam o DNA mitocondrial (mtDNA) uma ferramenta confiável e amplamente utilizada para estudos filogenéticos e evolutivos (AVISE *et al.*, 1987; ROSA; PAIVA, 2009; DORIC; BILELA, 2014; RAHMAN *et al.*, 2016).

O mtDNA possui um código genético único, com herança uniparental e exclusivamente materna, apresenta baixas taxas de recombinação e altas taxas de mutação, em torno de 4 vezes mais em comparação às taxas mutacionais do DNA nuclear (ROSA; PAIVA, 2009; RAHMAN *et al.*, 2016). Mamíferos possuem mtDNA extranuclear, em formato circular e de fita dupla, com tamanho aproximado de 16 kb, formado por 37 genes, sendo: 13 codificadores de proteínas, 22 de RNA transportador e 2 de RNA ribossômico, além da região *D-loop* não codificante (figuras 1A e 1B), com diferenças entre as espécies (MEGANATHAN *et al.*, 2012; DORIC; BILELA, 2014; YOON; PARK, 2015; WAGNER *et al.*, 2022).

Segundo Rosa e Paiva (2009) e Carnieli Jr *et al.* (2016), os genes mitocondriais mais utilizados para a identificação de espécies e em estudos evolutivos, são o gene citocromo oxidase subunidade I (COI) e o gene do citocromo B (cytB). Entre os 13 genes mitocondriais codificadores de proteínas, o gene COI está localizado entre as posições 5349 e 6893 do genoma, com tamanho de 1545 pb (JIANG *et al.*, 2016; RAHMAN *et al.*, 2016) e se destaca pela elevada incidência de substituição de nucleotídeos na 3ª posição do códon, aumentando sua taxa de evolução molecular em até 3 vezes em comparação com os demais genes mitocondriais (HEBERT *et al.*,

2003). Essa característica evolutiva do gene COI possibilita seu uso para distinguir filogeneticamente espécies próximas e diferenciar grupos filogeográficos dentro da mesma espécie, tornando-o um eficiente método de identificação (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007; ROSA; PAIVA, 2009; CLARE *et al.*, 2011; SCHLOTTAU *et al.*, 2020).

Figura 1 - célula animal e DNA mitocondrial



Fonte: (A) modificada de <<https://emoss-illustration.com/scientific-illustration>>, acesso em agosto/2022; (B) modificada de WAGNER *et al.* (2022).

Nota: Figura 1A esquematiza uma célula animal e algumas de suas estruturas, destacando o DNA nuclear e o DNA mitocondrial, entre outras. Figura 1B ilustra o mtDNA e sua composição de genes.

Hebert *et al.* (2003) e Rosa e Paiva (2009) relatam que o COI se caracteriza como uma sequência padrão de identificação espécie-específica, sendo considerado um código de barras do DNA (DNA *barcoding*), e, com esse intuito, é amplamente utilizado para identificação precisa de espécies, em qualquer estágio de vida, sendo eficientemente usado para diferenciar e classificar espécies de morcegos (CLARE *et al.*, 2007; CLARE, 2011; SCHLOTTAU *et al.*, 2020; MOTA *et al.*, 2022).

Após elencadas essas características, o gene COI foi selecionado como alvo para realização deste estudo.

3 HIPÓTESE

A filogenia molecular de quirópteros pode prover a acurada distinção entre espécies de morcegos necessária para estudos visando o entendimento da coevolução do vírus da raiva (RABV) com diferentes espécies.

4 OBJETIVOS

4.1 Comparar a taxonomia morfológica de quirópteros e identificação molecular, baseada em sequências parciais do gene COI;

4.2 Identificar a diversidade genética entre os indivíduos de mesma espécie;

4.3 Inferir e avaliar as relações filogenéticas entre algumas das espécies de quirópteros circulantes no Estado de São Paulo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS

Por instrumento dos quirópteros recebidos para realização do diagnóstico de raiva no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores, da Divisão de Vigilância de Zoonoses - Coordenação de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo (LabZoo/DVZ/COVISA/SMS-SP), como parte do programa de vigilância passiva da raiva, foram geradas sequências parciais do gene COI, a partir da extração de DNA total do SNC desses animais.

A eleição dos indivíduos, a diversidade e o quantitativo de espécies utilizadas neste trabalho, foram determinadas de acordo com os quirópteros recebidos para realização do diagnóstico de raiva no LabZoo/DVZ, de janeiro/2020 a dezembro/2021 e identificados pelo Laboratório de Fauna Sinantrópica - Quirópteros (LabFauna/DVZ), conforme critérios de Vizotto e Taddei (1973) e Gardner (2007).

5.1.1 Extração do DNA total

Após a retirada do SNC dos quirópteros, em torno de 0,06 g do tecido foram depositadas em microtubo de 1,5 mL livre de RNAses e DNAses, armazenado sob a temperatura de -70 °C até o momento da extração do DNA total, que foi realizada com o kit *DNeasy Blood and Tissue*® (Qiagen, Germantown, MD, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após o término da extração, as amostras de DNA extraído permaneceram sob a temperatura de -70 °C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.1.2 Amplificação do gene COI

Todas as amostras de DNA extraído foram submetidas à reação de PCR para amplificação do gene COI, utilizando o par de *primers* descrito por Folmer *et al.* (1994), indicados no quadro 1.

Quadro 1 - *Primers* utilizados na PCR para amplificação do gene COI

<i>primer</i>	sentido	sequência	alvo	posição*
LCO1490	senso	5' GGTCACAAATCATAAAGATATTGG 3'	gene COI	1-22
HCO2198	anti-senso	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'	gene COI	706-681

Fonte: BARONE (2022).

Nota: *posição dos nucleotídeos em relação à sequência de *Mus musculus domesticus* (FJ527884) do GenBank <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>.

Para uma reação com volume final de 25 µL, foram utilizados 0,5U de *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), *High Fidelity Buffer* 10 x (600 mM Tris-SO₄ pH 8,9 e 180 mM de (NH₄)₂SO₄), 200 µM de dNTP's, 2 mM de MgSO₄, 0,4 µM de cada *primer* e 2,5 µL do DNA extraído, gerando um *amplicon* de 658 pb. Água tratada com Dietil Pirocarbonato (água DEPC) foi utilizada como controle negativo da reação. Os parâmetros de ciclagem foram definidos de acordo com Hebert *et al.* (2003), com adaptações: 1 ciclo inicial de 94 °C durante 1 minuto, seguido de 5 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 45 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto, logo após, foram realizados 35 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 50 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto, finalizando com ciclo único

de 68 °C durante 5 minutos. Após finalizada a PCR do gene COI, os *amplicons* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5 %, preparado em tampão TAE 1 x (Tris Acetato Etilenodiamino Tetra-Acético) e corado com *Sybr® Safe* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Cada amostra foi acrescida de *BlueJuice® Gel Loading Buffer* (Invitrogen™) antes de ser aplicada ao gel, utilizando o marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen™) em todas as corridas realizadas.

5.1.3 Purificação e reação de sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados pelo método enzimático, utilizando *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher), seguindo as orientações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Thermo Fisher) e a precipitação teve por base o protocolo etanol/EDTA, conforme instruções do mesmo fabricante. Por fim, os produtos foram submetidos ao sequenciamento de Sanger bidirecional (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando o sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA), de acordo com as orientações do fabricante.

5.1.4 Edição e análise das sequências

A fim de avaliar a qualidade das bases geradas durante o sequenciamento, foi utilizado o *software DNA Dragon v.1.9.1* <<https://dna-dragon.com/>> (HEPPERLE, 2011), que possibilitou analisar os eletroferogramas e gerar as sequências consenso, além de proceder a tradução dos nucleotídeos em aminoácidos.

O alinhamento foi realizado com o *software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.3* (HALL, 1999), aplicando o algoritmo *ClustalW Multiple Alignment*, em que todas as sequências geradas foram alinhadas e analisadas comparativamente com a sequência de camundongo (*Mus musculus* - JF459217), assumida como padrão. Para grupo externo, foi escolhida a sequência do ouriço-orelhudo (*Hemiechinus auritus* - KX859285), devido à proximidade das ordens Eulipotyphla e Chiroptera (ONUMA *et al.*, 2000; MURPHY *et al.*, 2001).

Ao término do alinhamento, cada sequência parcial do gene COI gerada foi submetida ao sistema de identificação *Barcode of Life Data System* (BOLDSystems)

<<http://boldsystems.org/>>, por meio da ferramenta *Identification Engine* (IDS), para validação taxonômica ao nível de espécie (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007).

5.1.5 Filogenia baseada em gene COI

Com o propósito de reconstruir a filogenia para as sequências parciais geradas no presente estudo, 49 sequências parciais do gene COI de quirópteros, disponíveis no GenBank foram utilizadas como referência (apêndice A). O critério de escolha das referências foi baseado nas espécies sequenciadas neste trabalho.

As relações filogenéticas entre os indivíduos foram estimadas por Máxima Verossimilhança (ML - *Maximum Likelihood*) e de acordo com o modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo aplicativo JModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012), conforme o Critério de Informação de Akaike (AIC). A busca heurística foi realizada por *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI) e a confiabilidade dos ramos foi avaliada empregando 1000 repetições de *bootstrap*, por intermédio do *software* PAUP* 4.1b (SWOFFORD, 2002). Para edição e anotação das árvores filogenéticas, foi empregada a ferramenta *online* iTOL - *Interactive Tree Of Life* <<https://itol.embl.de/>> (LETUNIC; BORK, 2021).

5.1.6 Estrutura populacional

A distância genética entre as sequências foi calculada par-a-par, considerando a substituição de nucleotídeos, com o *software* MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018b), utilizando o método de Kimura 2-parâmetros (K2P).

Com a finalidade de complementar e sustentar a filogenia (VERLI, 2014), foi aplicada a ferramenta *DNA Sequence Polymorphism* (DnaSP) v.6 (ROZAS *et al.*, 2017), para calcular os índices de diversidade entre as sequências geradas no estudo.

Para explorar as relações genéticas entre os indivíduos analisados, foram construídas as redes de haplótipos, com o *software* Network v.10.2.0.0 (BANDEL; FORSTER; ROHL, 1999), baseadas em *Median-Joining* (MJ).

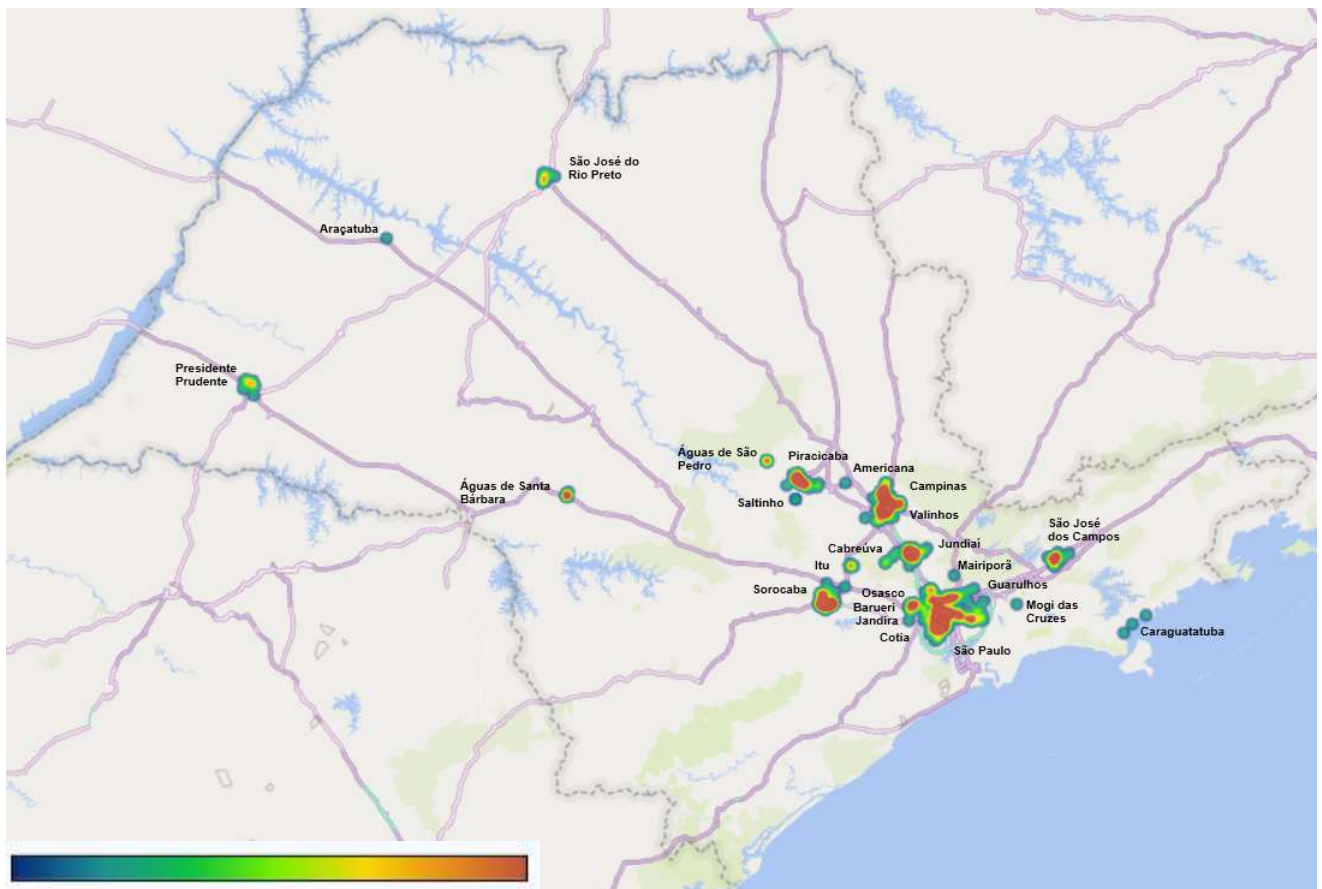
A partir do endereço de recolhimento dos espécimes, foram obtidos os dados de latitude e longitude de cada um dos indivíduos, a fim de mapear a distribuição e concentração dos morcegos em estudo. Para calcular a distância geográfica (em km) entre os indivíduos, foi aplicada a fórmula de *Haversine* (PRASETYA *et al.*, 2020).

6 RESULTADOS

6.1 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

Foram utilizados 384 quirópteros no estudo, provenientes de 24 municípios do Estado de São Paulo, a saber: Águas de Santa Bárbara, Águas de São Pedro, Americana, Araçatuba, Barueri, Cabreúva, Campinas, Caraguatatuba, Cotia, Guarulhos, Itu, Jandira, Jundiaí, Mairiporã, Mogi das Cruzes, Osasco, Piracicaba, Presidente Prudente, Saltinho, São José do Rio Preto, São José dos Campos, São Paulo, Sorocaba e Valinhos. A distribuição e concentração dos indivíduos por localidade de origem está representada no mapa parcial do Estado de São Paulo, ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Mapa do Estado de São Paulo



Fonte: BARONE (2022).

Nota: o mapa ilustra a distribuição e concentração dos quirópteros utilizados no estudo. Locais em azul/verde indicam menor concentração de indivíduos - quanto maior a concentração, mais laranja/vermelho se apresenta o local no mapa.

A coleta do SNC dos quirópteros, seguida da extração do DNA total, amplificação e sequenciamento parcial do gene COI procedeu conforme descrito anteriormente. Após alinhamento e análise das sequências, cada uma delas foi submetida ao sistema BOLD de identificação e os resultados obtidos com o score de compatibilidade estão apresentados na tabela 1 a seguir.

Tabela 1 - Score de compatibilidade BOLD das sequências COI geradas

identificação			score BOLD	
família	espécie	nº de indivíduos	máximo	mínimo
Molossidae	<i>Cynomops planirostris</i>	20	100%	99,54%
	<i>Eumops auripendulus</i>	8	100%	98,92%
	<i>Eumops glaucinus</i>	20	100%	100%
	<i>Eumops perotis</i>	19	97,48%	97,01%
	<i>Molossops neglectus</i>	3	100%	99,83%
	<i>Molossus molossus</i>	20	100%	99,28%
	<i>Molossus rufus</i>	20	100%	98,77%
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	16	99,84%	98,88%
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	20	98,07%	97,72%
	<i>Promops nasutus</i>	18	99,82%	98,92%
<i>Tadarida brasiliensis</i>	20	100%	99,54%	
Phyllostomidae	<i>Artibeus fimbriatus</i>	10	100%	99,8%
	<i>Artibeus lituratus</i>	20	100%	99,85%
	<i>Artibeus planirostris</i>	11	100%	99,83%
	<i>Carollia perspicillata</i>	20	100%	99,45%
	<i>Glossophaga soricina</i>	20	100%	99,34%
	<i>Micronycteris microtis</i>	2	99,39%	99,39%
	<i>Phyllostomus discolor</i>	10	100%	99,85%
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	20	100%	99,35%
<i>Sturnira lilium</i>	20	100%	99,5%	
Vespertilionidae	<i>Eptesicus furinalis</i>	16	99,81%	99,39%
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	5	100%	98,93%
	<i>Lasiurus cinereus</i>	2	99,51%	98,53%
	<i>Myotis albescens</i>	16	99,08%	98,92%
	<i>Myotis nigricans</i>	8	99,83%	98,00%
<i>Myotis sp.</i>	20	100%	99,69%	

Fonte: BARONE (2022).

Nota: score de compatibilidade entre as sequências COI geradas e as sequências consulta do banco de dados BOLD, de acordo com a espécie.

Da diversidade de 26 espécies aqui analisadas, 17 apresentaram ao menos um dos indivíduos com 100% de score de compatibilidade em relação às sequências de

referência do BOLD. Em *Eumops glaucinus*, os 20 indivíduos analisados obtiveram o valor máximo, sem variações. Apesar disso, Molossidae foi a família que contemplou as espécies de menor *score*: *Eumops perotis* em que os 20 indivíduos obtiveram valor <98% de compatibilidade e *Nyctinomops macrotis* revelou 11 indivíduos <98%.

Os 20 indivíduos classificados geneticamente como *Myotis* sp., foram identificados taxonomicamente por *Myotis nigricans*, mas a identificação via sistema BOLD indicou um *score* de 100% de identidade com um exemplar *Myotis* sp. (acesso GenBank OK413003), tendo por origem o município de Campinas-SP. A partir dessa informação, esses 20 indivíduos foram segregados e classificados como *Myotis* sp. Essa questão será abordada e discutida posteriormente.

As 384 sequências de gene COI geradas no estudo foram depositadas no banco de dados GenBank e encontram-se disponíveis para consulta no site do NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>). Nos apêndices B, C e D, é possível visualizar a classificação molecular das espécies, o município de origem do animal e o número de acesso de todos os indivíduos aqui analisados.

6.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Em posse das sequências geradas e das utilizadas como banco de referência do GenBank, foi possível construir uma árvore de inferência filogenética para cada família de quirópteros aqui analisada, apresentadas nas figuras 3 (Molossidae), 4 (Phyllostomidae) e 5 (Vespertilionidae).

O modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos indicado pelo aplicativo JModelTest, segundo o Critério de Informação de Akaike (AIC), foi o *General Time-Reversible* incorporado com o parâmetro de distribuição gama e proporção de sítios invariáveis (GTR+I+G), onde Molossidae: I= 0,5970 e G= 1,6410; Phyllostomidae: I= 0,5860 e G= 1,2120; Vespertilionidae: I= 0,5820 e G= 1,2380. Com a finalidade de aplicar uma direção temporal à análise, as três árvores foram enraizadas na sequência KX859285, utilizada como *outgroup* (*Hemiechinus auritus*).

Entre os Molossidae (figura 3), foi possível observar a formação de dois nós, em que os ramos estão segregados conforme gênero e espécie. No início da representação filogenética, nota-se o *outgroup*, onde está localizada raiz da árvore, em seguida está o primeiro nó, composto apenas pelo pequeno grupo de *Molossops*

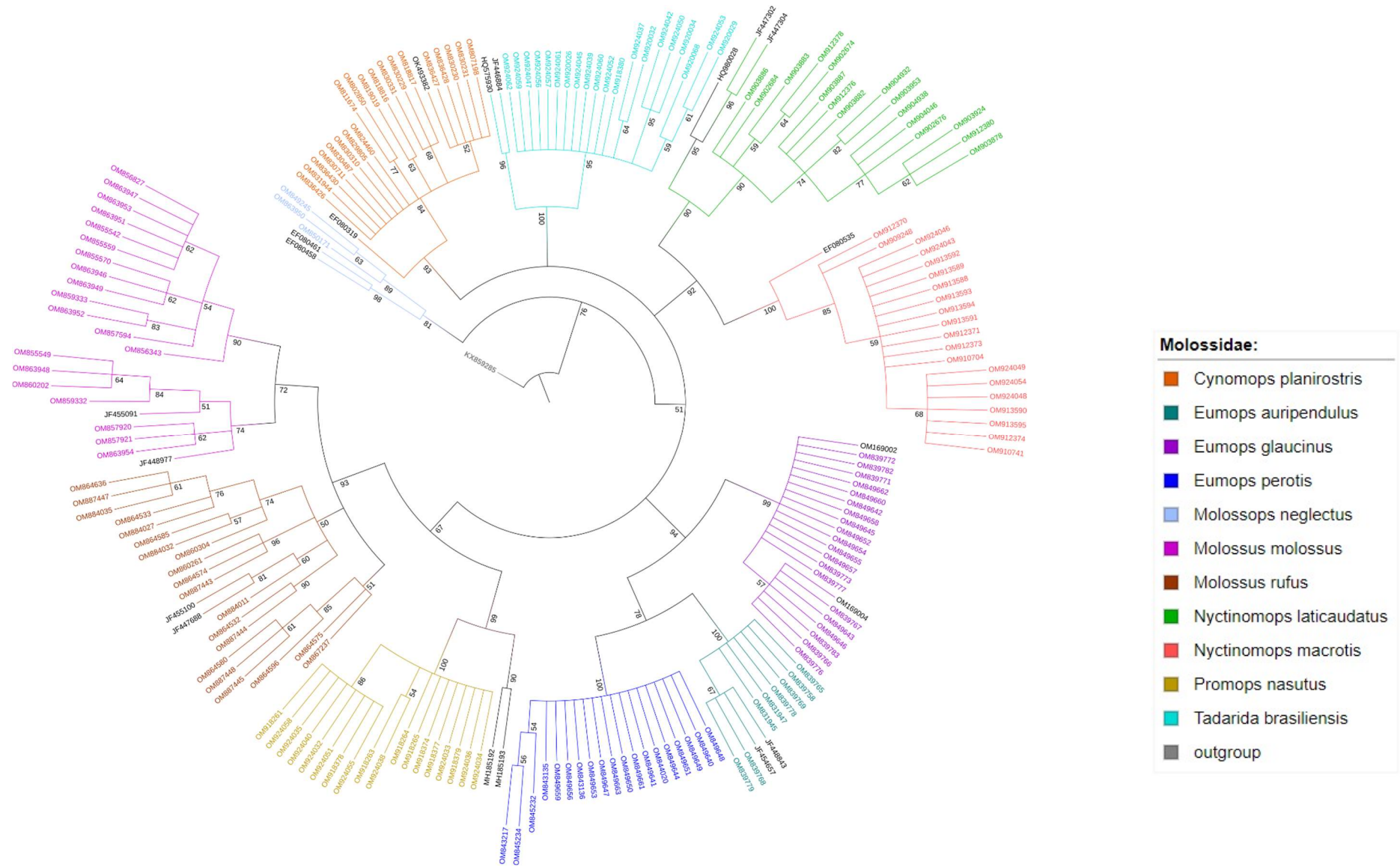
neglectus, com as três sequências geradas e as duas do GenBank utilizadas como referência. A seguir, está o segundo nó, com todos os outros gêneros da família Molossidae, divididos em cinco ramos. O primeiro ramo com o grupo *Cynomops planirostris*, que comportou os 20 indivíduos da pesquisa e os dois do GenBank. *Tadarida brasiliensis* aparece no segundo ramo, com as duas referências e os 20 indivíduos sequenciados. O ramo dos *Nyctinomops* aparece dividido em dois *clusters* com os indivíduos das duas espécies (*N. laticaudatus* e *N. macrotis*) segregados de acordo com sua classificação.

No grupo dos *N. laticaudatus*, além dos 16 indivíduos sequenciados e das duas sequências referência da mesma espécie, está inserida a sequência de *N. femorosaccus*. No grupo dos *N. macrotis*, estão os 20 indivíduos e a única referência dessa espécie. O ramo seguinte, dos *Eumops* também foi formado por dois *clusters*, em um deles aparecem os 20 indivíduos *E. glaucinus* sequenciados e as duas espécies incluídas e, no outro, ocorre uma nova segregação, separando os oito indivíduos *E. auripendulus* com as duas referências dos 19 *E. perotis* (sem sequências referência).

Por fim, o ramo formado pelo maior número de espécies e indivíduos Molossidae, com os gêneros *Promops* e *Molossus*, subdividido em dois *clusters*, um para os 18 indivíduos da espécie *Promops nasutus* e as duas referências (*P. centralis* e *P. davisoni*) e o outro para os indivíduos 20 indivíduos e as duas sequências de *M. rufus* e *M. molossus*.

Os valores de *bootstrap* do grupo Molossidae variaram entre as espécies: *Cynomops planirostris* (52-93), *Eumops auripendulus* (67-100), *Eumops glaucinus* (57-99), *Eumops perotis* (54-100), *Molossops neglectus* (63-98), *Molossus molossus* (51-90), *Molossus rufus* (51-96), *Nyctinomops laticaudatus* (59-96), *Nyctinomops macrotis* (59-100), *Promops nasutus* (54-100) e *Tadarida brasiliensis* (59-100).

Figura 3 - Árvore de inferência filogenética – Molossidae



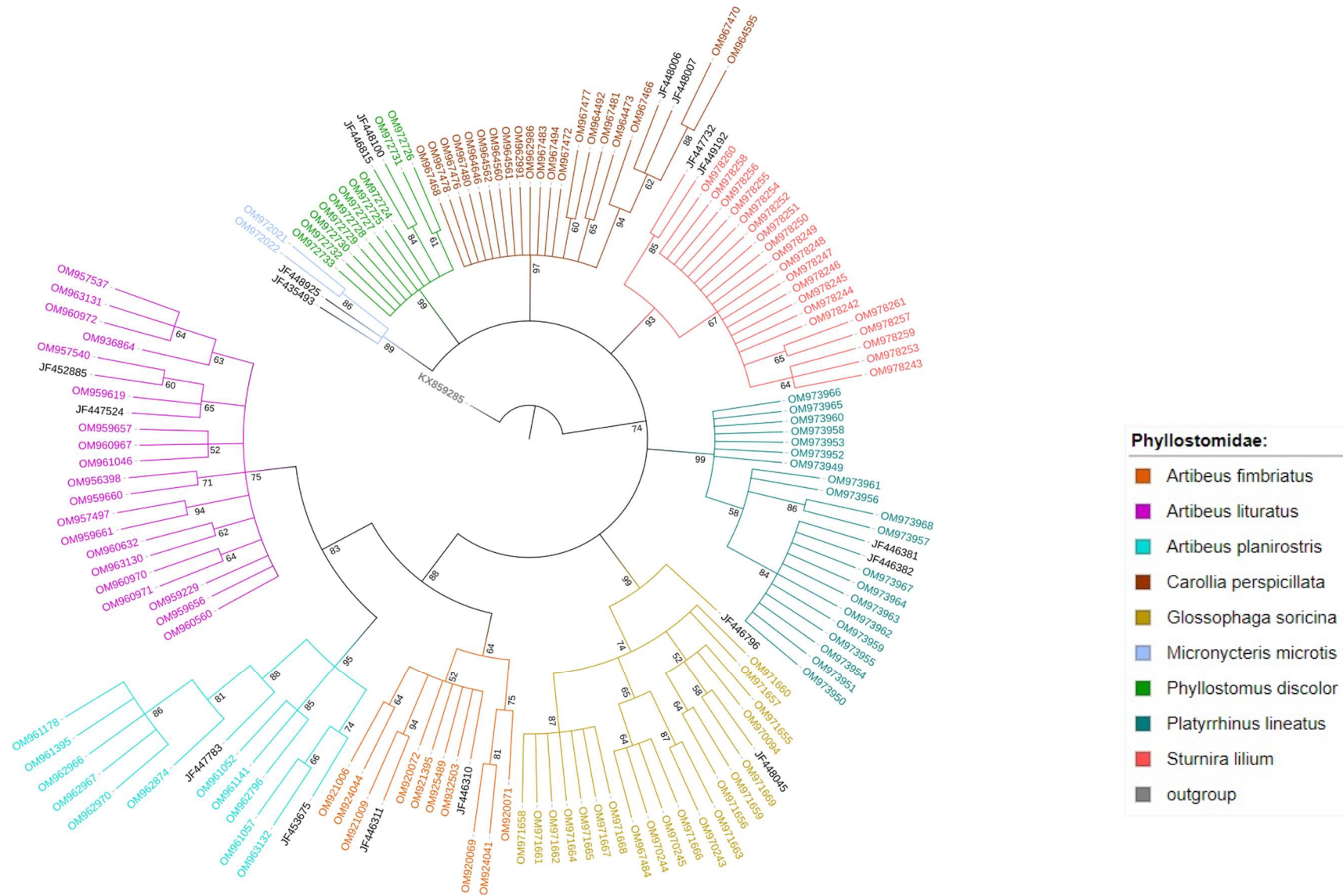
Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética dos quirópteros da família Molossidae, baseada em gene COI, utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 repetições de *bootstrap* e modelo evolutivo GTR+I+G, segundo Critério de Informação Akaike (AIC). As seqüências estão identificadas pelo número de acesso GenBank, em preto estão as seqüências utilizadas como banco de dados e em colorido estão as seqüências geradas no estudo. A etiqueta de identificação e os ramos das espécies estão diferenciados por cor, conforme legenda à direita da figura.

Na figura 4, onde está representada a árvore filogenética dos Phyllostomidae, é possível reconhecer a formação de sete nós, em que estão segregados os ramos conforme gênero e espécie. No início da representação, nota-se o *outgroup*, onde a árvore foi enraizada, em seguida está a dupla de *Micronycteris microtis* e suas referências do mesmo gênero (*M. megalotis*), devido ausência de sequência disponível da mesma espécie. Após, encontra-se o nó com dez *Phyllostomus discolor* e sua dupla de referência. Em seguida, estão os nós dos 20 indivíduos *Carollia perspicillata*, 20 *Sturnira lilium*, 20 *Platyrrhinus lineatus* e 20 *Glossophaga soricina*, todos os nós com suas duas respectivas sequências de referência. Por fim, está o maior e mais numeroso nó dos Phyllostomidae, composto pelo gênero *Artibeus* e subdividido em dois ramos, um deles para os dez *A. fimbriatus* e sua dupla de referência e o outro com uma nova segregação, sendo um dos *clusters* para *A. planirostris* e o outro para *A. lituratus*, formado por 10 e 20 indivíduos, respectivamente, além das suas sequências de referência GenBank.

Os valores de bootstrap entre os Phyllostomidae variaram conforme a espécie, sendo: *Artibeus fimbriatus* e *A. lituratus* (52-94), *Artibeus planirostris* (66-95), *Carollia perspicillata* (60-97), *Glossophaga soricina* (52-99), *Micronycteris microtis* (86), *Phyllostomus discolor* (61-99), *Platyrrhinus lineatus* (58-99) e *Sturnira lilium* (64-93).

Figura 4 - Árvore de inferência filogenética – Phyllostomidae



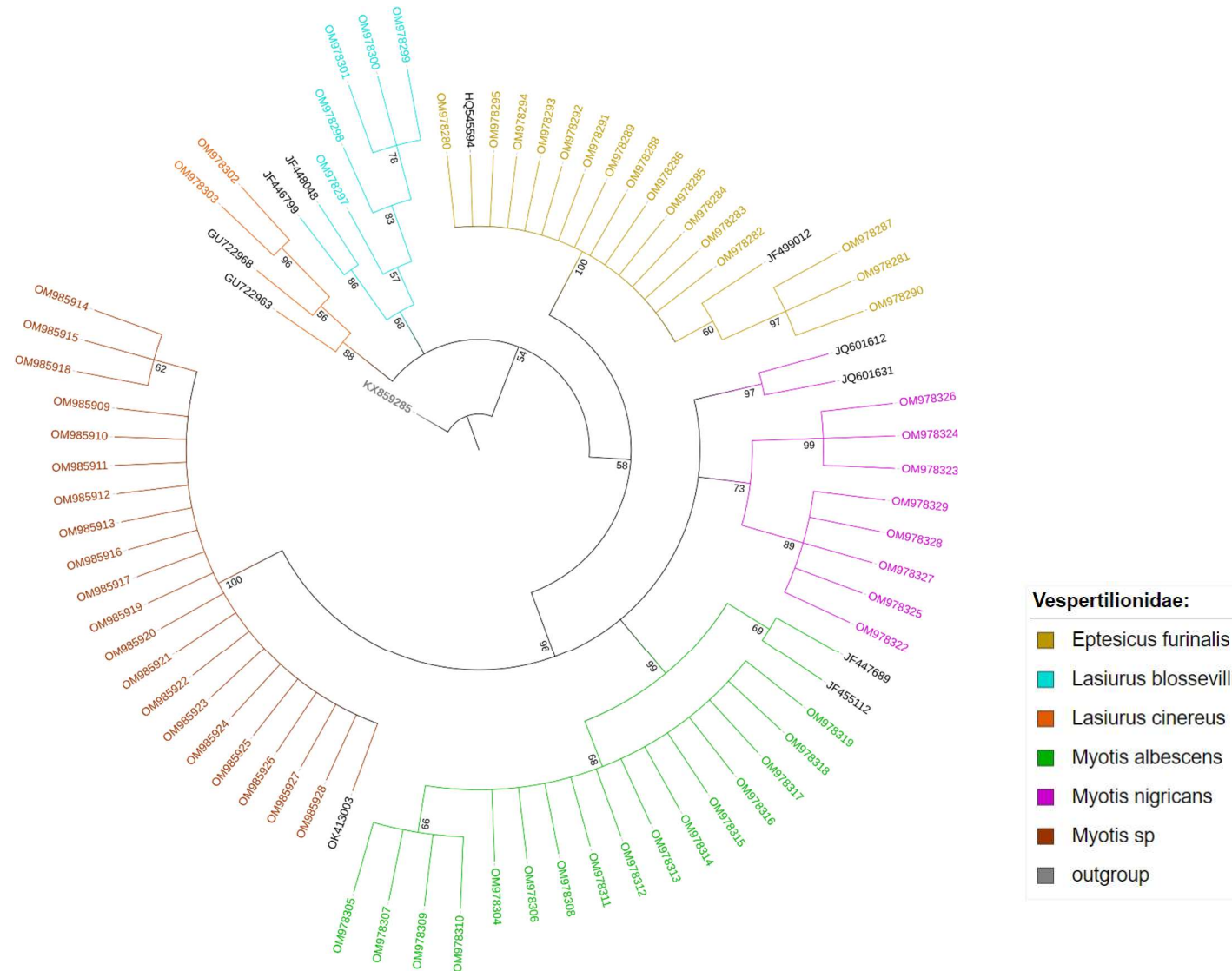
Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética dos quirópteros da família Phyllostomidae, baseada em gene COI, utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 repetições de *bootstrap* e modelo evolutivo GTR+I+G, segundo Critério de Informação Akaike (AIC). As sequências estão identificadas pelo número de acesso GenBank, em preto estão as sequências utilizadas como banco de dados e em colorido estão as sequências geradas no estudo. A etiqueta de identificação e os ramos das espécies estão diferenciados por cor, conforme legenda à direita da figura.

A figura 5 representa a árvore filogenética dos Vespertilionidae, formada por três nós, em referência aos três gêneros aqui analisados. A árvore tem início com o *outgroup*, onde foi enraizada, em seguida está o primeiro nó, composto pelo pequeno grupo de dois indivíduos *Lasiurus cinereus* e sua dupla de sequências referência, logo após está o nó de *Lasiurus blossevillii* com os cinco indivíduos sequenciados e as duas referências. O terceiro e último nó dos Vespertilionidae está composto pelo maior número de indivíduos, o qual está dividido em dois ramos, em um deles estão os 16 indivíduos *Eptesicus furinalis* e as sequências de referência, no outro é possível notar a presença de quatro *clusters*, sendo o primeiro deles formado apenas pelas duas sequências referência de *Myotis nigricans* do GenBank. O segundo *cluster* está formado pelos oito indivíduos *Myotis nigricans* sequenciados neste estudo. O terceiro *cluster* abriga os 16 *Myotis albescens* e sua dupla de referência e, por fim, o último grupo, onde estão presentes os 20 indivíduos identificados por *Myotis* sp. e a única sequência de referência disponível do GenBank.

Os valores de *bootstrap* entre os Vespertilionidae foram: *Eptesicus furinalis* (60-100), *Lasiurus blossevillii* (57-86), *Lasiurus cinereus* (56-96), *Myotis albescens* (68-99), *Myotis nigricans* (73-99) e *Myotis* sp. (62-100).

Figura 5 - Árvore de inferência filogenética – Vespertilionidae



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética dos quirópteros da família Vespertilionidae, baseada em gene COI, utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 repetições de *bootstrap* e modelo evolutivo GTR+I+G, segundo Critério de Informação Akaike (AIC). As seqüências estão identificadas pelo número de acesso GenBank, em preto estão as seqüências utilizadas como banco de dados e em colorido estão as seqüências geradas no estudo. A etiqueta de identificação e os ramos das espécies estão diferenciados por cor, conforme legenda à direita da figura.

6.3 DIVERSIDADE MOLECULAR DAS ESPÉCIES

A estimativa de divergência par a par (%), entre as sequências COI dos indivíduos de mesma espécie, foi calculada com suporte do *software* MEGA X, utilizando o modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P) e envolveu o número de substituições na 1^a, 2^a e 3^a posições dos códons. Os valores encontrados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Divergência de nucleotídeos, por Kimura-2-parâmetros

identificação		divergência de nucleotídeos			
família	espécie	nº de indivíduos	mín. (%)	méd. (%)	máx. (%)
Molossidae	<i>Cynomops planirostris</i>	20	0	0,55	0,92
	<i>Eumops auripendulus</i>	8	0	0,57	1,23
	<i>Eumops glaucinus</i>	20	0	0,15	0,31
	<i>Eumops perotis</i>	19	0	0,23	0,77
	<i>Molossops neglectus</i>	3	0	0,10	0,15
	<i>Molossus molossus</i>	20	0	1,13	2,50
	<i>Molossus rufus</i>	20	0	1,43	2,33
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	16	0	0,82	1,54
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	20	0	0,20	0,61
	<i>Promops nasutus</i>	18	0	0,39	0,92
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	20	0	0,25	0,77
Phyllostomidae	<i>Artibeus fimbriatus</i>	10	0	0,74	1,55
	<i>Artibeus lituratus</i>	20	0	0,72	1,55
	<i>Artibeus planirostris</i>	11	0	1,23	2,17
	<i>Carollia perspicillata</i>	20	0	0,67	2,34
	<i>Glossophaga soricina</i>	20	0	0,76	1,70
	<i>Micronycteris microtis</i>	2	0	0	0
	<i>Phyllostomus discolor</i>	10	0	0,12	0,31
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	20	0	0,43	0,92
	<i>Sturnira lilium</i>	20	0	0,38	1,08
Vespertilionidae	<i>Eptesicus furinalis</i>	16	0	0,69	2,17
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	5	0	1,57	3,62
	<i>Lasiurus cinereus</i>	2	1,39	1,39	1,39
	<i>Myotis albescens</i>	16	0	0,12	0,31
	<i>Myotis nigricans</i>	8	0	1,70	3,14
	<i>Myotis sp.</i>	20	0	0,10	0,46

Fonte: BARONE (2022).

Nota: valores em % de mínima, média e máxima divergência nucleotídica par-a-par entre as sequências COI geradas. A comparação foi entre os indivíduos de mesma espécie.

Com exceção de *Lasiurus cinereus*, representada por apenas dois indivíduos, todas as outras espécies apresentaram ao menos um par de indivíduos com 0% de divergência nucleotídica, ou seja, sequências de gene COI idênticas entre indivíduos distintos, independente do seu local de origem. *Micronycteris microtis* apresentou 0% de divergência, tendo em vista que o pequeno grupo era formado por apenas dois indivíduos, ambos com sequência COI idênticas. Vespertilionidae foi a família com os índices mais elevados de divergência nucleotídica entre suas espécies, onde a média variou entre 0,10% em *Myotis* sp. e 1,70% em *Myotis nigricans*. A maior divergência genética foi para a espécie *Lasiurus blossevillii*, alcançando 3,62% de máxima entre seu grupo de apenas cinco indivíduos.

A observação de sequências idênticas entre indivíduos de locais distintos despertou o interesse em mapear todos os quirópteros utilizados na pesquisa; para isso, foram utilizados os dados de latitude e longitude referente ao ponto de recolhimento/coleta de cada animal e aplicada a fórmula de *Haversine*, para calcular a distância, em quilômetros, entre cada indivíduo analisado. O programa DnaSP foi utilizado para quantificar os parâmetros de diversidade genética das sequências COI geradas no estudo, calculando: número de haplótipos (*h*), número de sítios variáveis (*s*), diversidade haplotípica (*Hd*) e nucleotídica (π) com desvio padrão (*SD*). A tabela 3 mostra os índices calculados por espécie.

Tabela 3 - Parâmetros de diversidade entre as sequências COI geradas

espécie	<i>n</i>	<i>h</i>	<i>s</i>	<i>Hd</i>	(\pm SD)	π	(\pm SD)
<i>Cynomops planirostris</i>	20	12	14	0,926	(\pm 0,041)	0,0055	(\pm 0,00040)
<i>Eumops aripendulus</i>	8	7	10	0,964	(\pm 0,077)	0,0057	(\pm 0,00140)
<i>Eumops glaucinus</i>	20	3	2	0,616	(\pm 0,077)	0,0015	(\pm 0,00018)
<i>Eumops perotis</i>	19	6	5	0,596	(\pm 0,122)	0,0019	(\pm 0,00055)
<i>Molossops neglectus</i>	3	2	1	0,667	(\pm 0,314)	0,0010	(\pm 0,00048)
<i>Molossus molossus</i>	20	12	26	0,937	(\pm 0,033)	0,0112	(\pm 0,00140)
<i>Molossus rufus</i>	20	14	35	0,963	(\pm 0,026)	0,0141	(\pm 0,00089)
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	16	13	23	0,975	(\pm 0,029)	0,0081	(\pm 0,00076)
<i>Nyctinomops macrotis</i>	20	3	4	0,595	(\pm 0,073)	0,0020	(\pm 0,00035)
<i>Promops nasutus</i>	18	8	8	0,830	(\pm 0,073)	0,0038	(\pm 0,00045)
<i>Tadarida brasiliensis</i>	20	6	8	0,684	(\pm 0,103)	0,0025	(\pm 0,00057)
média Molossidae	-	-	-	0,796	-	0,0052	-
<i>Artibeus fimbriatus</i>	10	6	15	0,889	(\pm 0,075)	0,0073	(\pm 0,00148)
<i>Artibeus lituratus</i>	20	16	28	0,979	(\pm 0,021)	0,0071	(\pm 0,00073)
<i>Artibeus planirostris</i>	11	10	21	0,982	(\pm 0,046)	0,0121	(\pm 0,00149)
<i>Carollia perspicillata</i>	20	14	25	0,953	(\pm 0,033)	0,0067	(\pm 0,00153)

<i>Glossophaga soricina</i>	20	11	20	0,874	(±0,064)	0,0075	(±0,00103)
<i>Phyllostomus discolor</i>	10	4	3	0,644	(±0,152)	0,0012	(±0,00035)
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	20	8	10	0,784	(±0,084)	0,0043	(±0,00061)
<i>Sturnira lilium</i>	20	14	17	0,937	(±0,043)	0,0038	(±0,00059)
média Phyllostomidae	-	-	-	0,880	-	0,0062	-
<i>Eptesicus furinalis</i>	16	8	16	0,808	(±0,093)	0,0068	(±0,00206)
<i>Lasiurus blossevillii</i>	5	4	24	0,900	(±0,161)	0,0152	(±0,00735)
<i>Myotis albescens</i>	16	5	4	0,650	(±0,108)	0,0012	(±0,00027)
<i>Myotis nigricans</i>	8	5	24	0,786	(±0,151)	0,0165	(±0,00378)
<i>Myotis</i> sp.	20	5	5	0,505	(±0,126)	0,0010	(±0,00033)
média Vespertilionidae	-	-	-	0,730	-	0,0082	-
média global	-	-	-	0,810	-	0,0062	-

Fonte: BARONE (2022).

Nota: parâmetros de diversidade molecular entre as sequências COI geradas no estudo, calculadas pelo Programa DnaSP, onde: n=número de indivíduos, h=número de haplótipos, s=sítios variáveis, Hd=diversidade haplotípica, π =diversidade nucleotídica, SD=desvio padrão. A linha dupla delimita as espécies de cada família analisada (Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae).

A avaliação dos parâmetros da diversidade genética entre as sequências COI foi realizada em 24 espécies, sendo necessário excluir duas espécies (*Micronycteris microtis* e *Lasiurus cinereus*), devido ao baixo número de indivíduos, o que impossibilita a análise do *software*. Portanto, apenas espécies com três ou mais indivíduos foram avaliadas aqui.

Do total de 380 indivíduos avaliados, foram identificados 196 haplótipos distintos, indicando alta diversidade média global de haplótipos (Hd=0,810), com valores variando entre 0,505 e 0,982, dependendo da espécie. Em Molossidae, *Cynomops planirostris*, *Eumops auripendulus*, *Molossus molossus*, *M. rufus* e *Nyctinomops laticaudatus* apresentaram alto índice de diversidade nucleotídica, variando entre π =0,0055 e 0,0141. Os demais do grupo (*Eumops glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops neglectus*, *Nyctinomops macrotis*, *Promops nasutus* e *Tadarida brasiliensis*) apresentaram baixa diversidade de nucleotídeos, com variação π =0,0010 a 0,0038.

Entre os Phyllostomidae, *Artibeus fimbriatus*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina* tiveram alta diversidade nucleotídica, variando de π =0,0067 a 0,0121, enquanto *Phyllostomus discolor*, *Platyrrhinus lineatus* e *Sturnira lilium*, ficaram com baixa (π =0,0012 a 0,0043). *Artibeus planirostris* e *A. lituratus* se destacaram por apresentar os maiores valores de diversidade haplotípica (Hd=0,982 e 0,979, respectivamente) entre todas as espécies. Vespertilionidae apresentou as

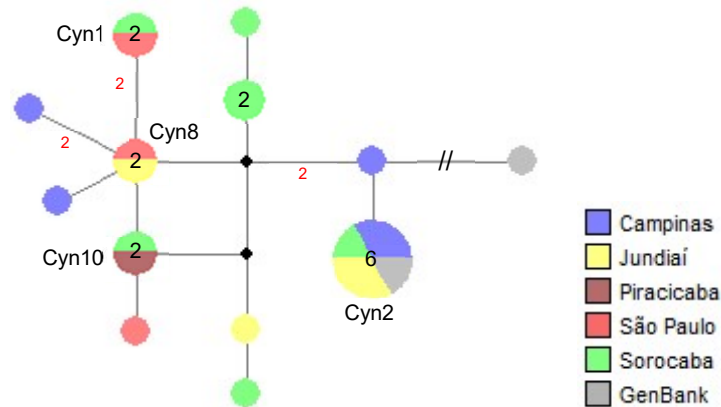
maiores taxas de diversidade nucleotídica, entre $\pi=0,0068$ e $0,0165$ para *Eptesicus furinalis*, *Lasiurus blossevillii* e *Myotis nigricans*, além de maior diversidade nucleotídica para *Myotis nigricans* e *Lasiurus blossevillii* ($\pi=0,0165$ e $0,0152$, respectivamente).

Vespertilionidae também apresentou as menores taxas de diversidade nucleotídica para *Myotis* sp. e *Myotis albescens* ($\pi=0,0010$ e $0,0012$), sendo que *Myotis* sp. também foi a espécie com menor índice de diversidade haplotípica ($Hd=0,505$) entre todas as analisadas. Para os sítios variáveis, *Molossus rufus* apresentou o maior índice ($s=35$) entre as sequências dos seus indivíduos e *Molossops neglectus* foi a espécie com variação de apenas 1 sítio ($s=1$) entre seus 3 indivíduos.

Dos 196 haplótipos encontrados, 126 foram representados por uma única sequência (*singleton*), ou seja, 64,3% dos haplótipos foram constituídos por apenas um indivíduo, 42 haplótipos foram compartilhados entre dois indivíduos (21,4%) e 28 haplótipos (14,3%) compartilhados por três ou mais indivíduos. Não houve compartilhamento de haplótipos por indivíduos de diferentes espécies.

Para a construção da rede de haplótipos, a fim de ampliar a análise, além das sequências COI geradas, também foram incluídas as sequências COI do GenBank, utilizadas aqui como banco de dados. As redes foram geradas pelo programa *Network* e estão apresentadas nas figuras 6 a 21, de acordo com o gênero dos quirópteros.

Para a população de 22 *Cynomops planirostris*, foram encontrados treze haplótipos (figura 6). Destes, destaque para o haplótipo Cyn2 com seis indivíduos de localidades variando entre 15,2 e 88,2 km de distância entre si, incluindo a sequência referência OK493382 do GenBank, com origem em Jarinu-SP, enquanto a referência da Guiana ficou em haplótipo isolado, como também foi possível notar na filogenia (figura 3), em que a sequência referência EF080319 aparece em ramo anexo aos demais.

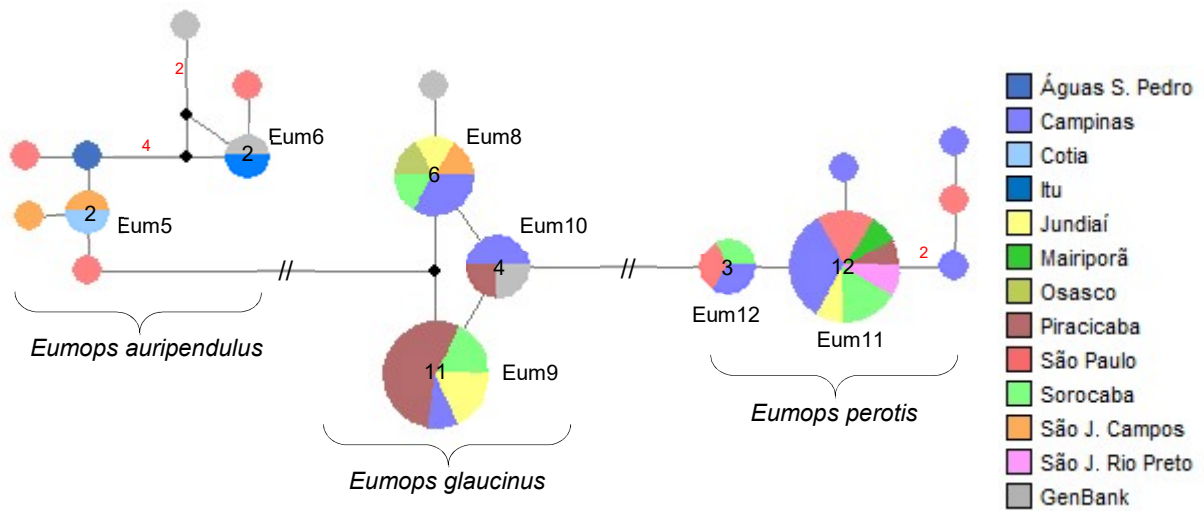
Figura 6 - Rede de haplótipos – *Cynomops* (Cyn)

Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo "//" indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Entre os 51 *Eumops*, foram encontrados 18 haplótipos (figura 7). A rede foi composta pelas três espécies, com variação em sua constituição e na distância entre os indivíduos. *E. auripendulus*, apesar de ser o grupo com menor número de indivíduos, chama a atenção para o haplótipo Eum6, formado por um indivíduo do município de Itu e outro proveniente do GenBank (JF454657), coletado no ano de 1994 na Guiana, com 3.318,9 km de distância entre eles, a outra sequência GenBank (Equador) ficou em haplótipo distante por um vetor médio e poucos passos mutacionais.

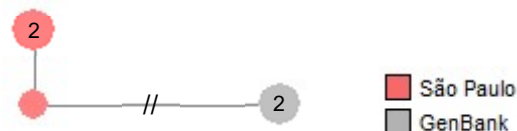
O grupo de *E. glaucinus* foi composto basicamente por três haplótipos com número de indivíduos variando entre quatro e onze, com distância entre 0,3 e 166,4 km, incluindo uma das sequências referência (Brasil) no Eum10, além do *singleton* com a outra sequência GenBank, também do Brasil. *E. perotis*, em sua maioria os indivíduos dividiram o haplótipo Eum11, composto por 12 indivíduos, de cinco municípios, variando entre 59,5 e 277,7 km entre si e sem sequência de referência disponível.

Figura 7 - Rede de haplótipos – *Eumops* (Eum)

Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo "//" indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

O pequeno grupo de *Molossops neglectus* formou apenas três haplótipos (figura 8), o mínimo necessário para construção da rede de haplótipos. Os indivíduos sequenciados no estudo segregaram em dois haplótipos de São Paulo, um deles *singleton* e o outro composto por dois indivíduos, com 29,7 km de distância geográfica entre eles, enquanto as sequências referência da Guiana formaram o terceiro e último haplótipo do grupo, distante por vários passos mutacionais, assim como já ilustrado na filogenia (figura 3), mostrando as sequências referência em ramo terminal separado das demais.

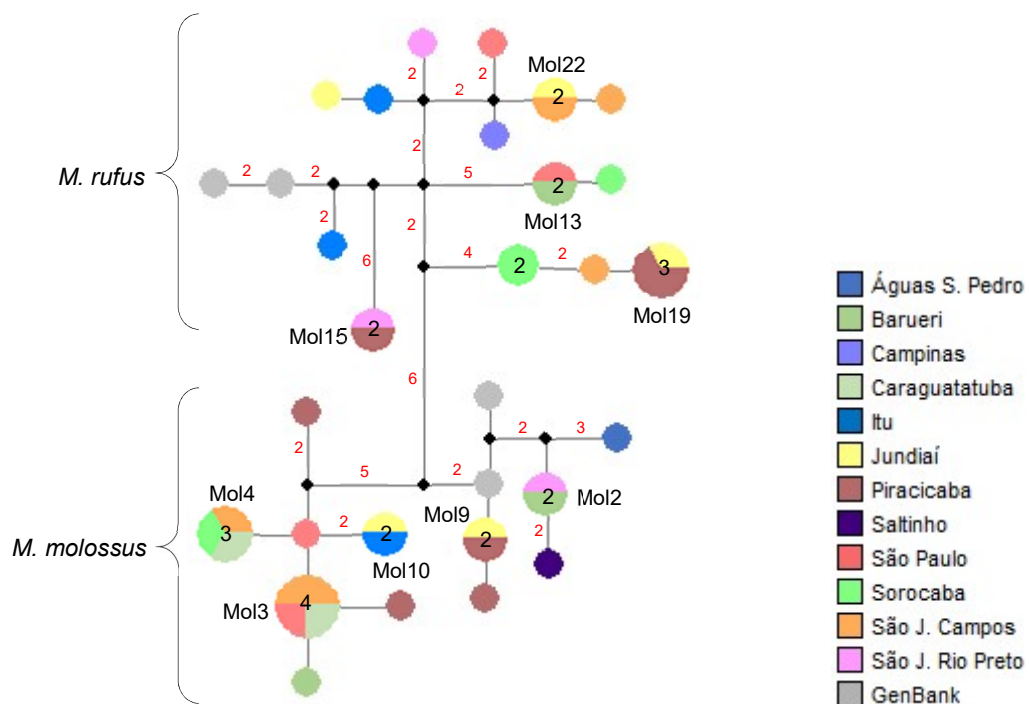
Figura 8 - Rede de haplótipos – *Molossops* (Mps)

Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. A linha conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles. O símbolo "//" indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos.

Em 44 indivíduos *Molossus* analisados, 30 haplótipos foram encontrados (figura 9), sendo 14 para *M. molossus* e 16 para *M. rufus*, variando entre um e quatro indivíduos por haplótipo e distanciando geograficamente de 4,8 a 395,3 km por haplótipo compartilhado. O clado de *M. molossus* segregou em dois subgrupos, como mostrou a filogenia (figura 3) anteriormente, um deles formado por Mol2, Mol9, três *singletons* (Águas de São Pedro, Piracicaba e Saltinho) e as referências (Equador e Guiana), o outro por Mol3, Mol4, Mol10 e três *singletons* (dois de Piracicaba, um de São Paulo). As referências de *M. rufus* (Guiana e Suriname) também agruparam com as demais do grupo, que apesar de permanecerem em haplótipos diferentes, estão distantes por poucos passos mutacionais, assim como *M. molossus*.

Figura 9 - Rede de haplótipos – *Molossus* (Mol)



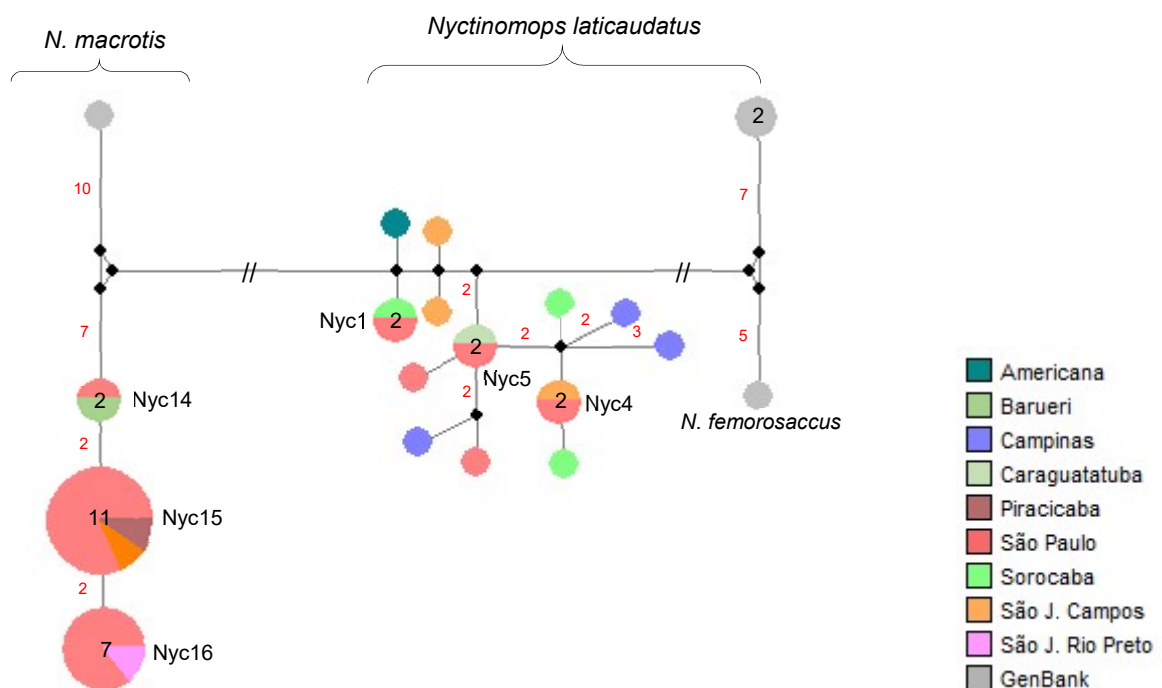
Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

A rede a seguir agrupou os 40 indivíduos *Nyctinomops*, composto por 19 haplótipos (figura 10). Em *N. macrotis*, a maioria dos indivíduos teve origem em São

Paulo e em curtas distâncias entre si, mas o haplótipo Nyc16 apresentou a maior distância geográfica do grupo, com 429,2 km entre um indivíduo de São Paulo e outro de São José do Rio Preto, já a única sequência referência (Guiana) segregou em haplótipo no mesmo clado, mas com certa distância mutacional. Os *N. laticaudatus* formaram haplótipos com no máximo dois indivíduos e distanciaram de 87,3 a 131,5 km entre si, além do haplótipo compartilhado pelas duas amostras referência (México) e do *singleton* de *N. femorosaccus*, também do México.

Figura 10 - Rede de haplótipos – *Nyctinomops* (Nyc)



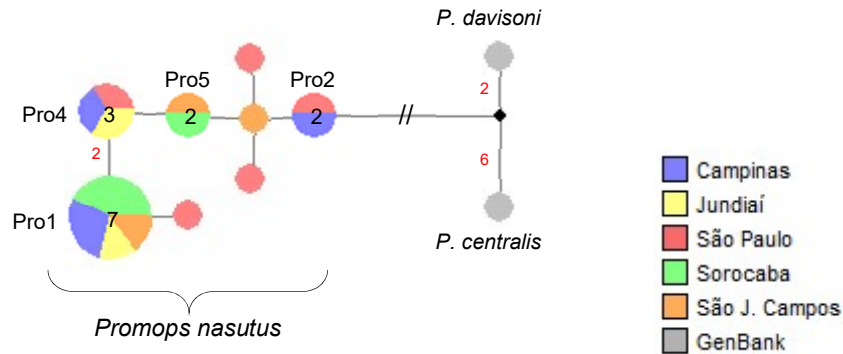
Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo '//' indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Dos 20 indivíduos *Promops* analisados, dez haplótipos foram encontrados (figura 11), sendo oito deles com as amostras sequenciadas de *Promops nasutus* e dois com as sequências GenBank de outros indivíduos do gênero *Promops* (devido indisponibilidade de sequências da mesma espécie em estudo), do México e Peru,

variando de um a sete indivíduos por haplótipo e distanciando geograficamente de 0,4 a 162,3 km entre eles.

Figura 11 - Rede de haplótipos – *Promops* (Pro)

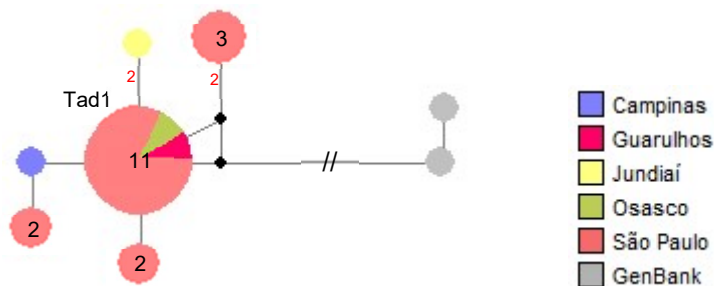


Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo "//" indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Tadarida brasiliensis contou com 22 indivíduos para a construção da rede formada por oito haplótipos (figura 12), afastados por um ou no máximo dois passos mutacionais, em sua maioria compostos por localidades únicas, com exceção de Tad1, formado por 11 indivíduos de 3 municípios diferentes (Guarulhos, Osasco e São Paulo), com distâncias geográficas variando entre 1,4 e 44 km. Divergindo das duas amostras de referência (Guatemala e México), que alocaram em clado separado e distante do grupo em estudo, por inúmeros passos mutacionais.

Figura 12 - Rede de haplótipos – *Tadarida* (Tad)

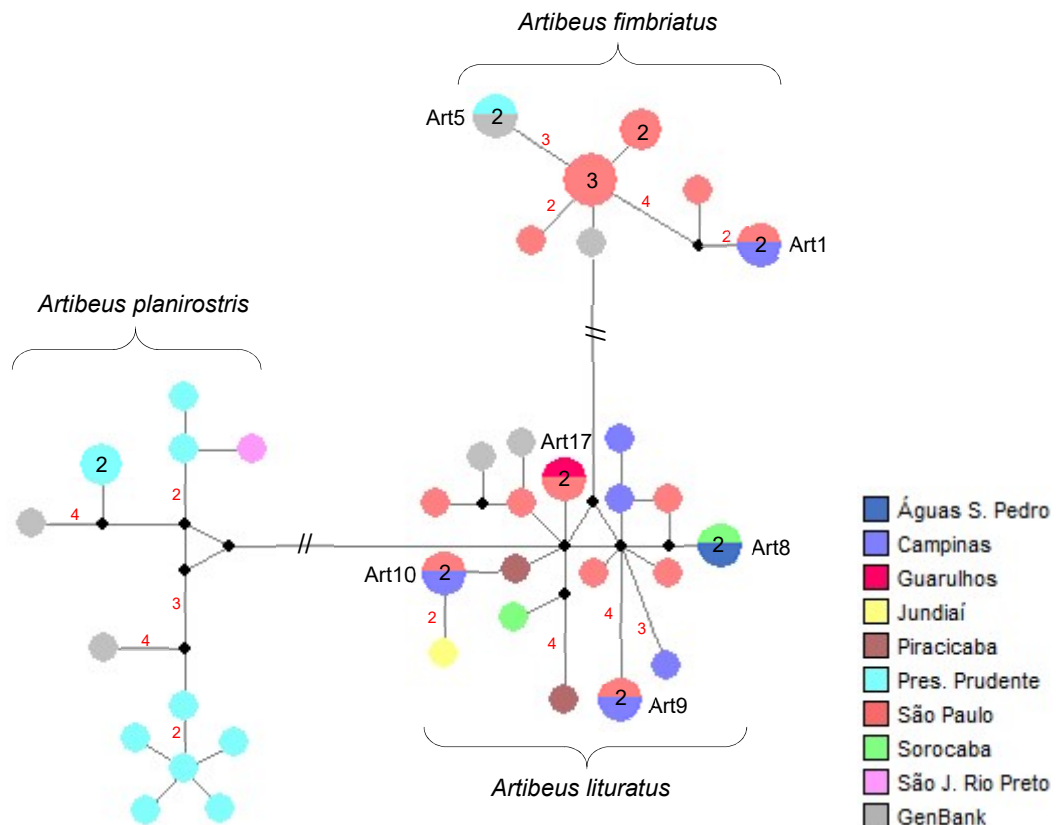


Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo ‘//’ indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Para o grupo de 47 *Artibeus*, 37 pequenos haplótipos foram encontrados, formados por no máximo três indivíduos cada (figura 13). *A. fimbriatus* foi o clado mais distante dos outros do grupo, em conformidade com a filogenia (figura 4) onde *A. fimbriatus* aparece em ramo distinto de *A. lituratus* e *A. planirostris*, apresentou a maioria dos indivíduos localizados em São Paulo. O haplótipo Art1 (OM924041 de Campinas/OM920069 de São Paulo) e o *singleton* de São Paulo (OM920071) aparecem em ramo diferente dos demais do grupo na filogenia (figura 4), assim como se apresentam com um vetor médio os distanciando do restante dos *A. fimbriatus*. O Art5 (OM921009 Presidente Prudente e amostra referência JF446311, de Gália-SP) foi o haplótipo com maior distância geográfica (177,4 km) entre indivíduos.

Figura 13 - Rede de haplótipos – *Artibeus* (Art)



Fonte: BARONE (2022).

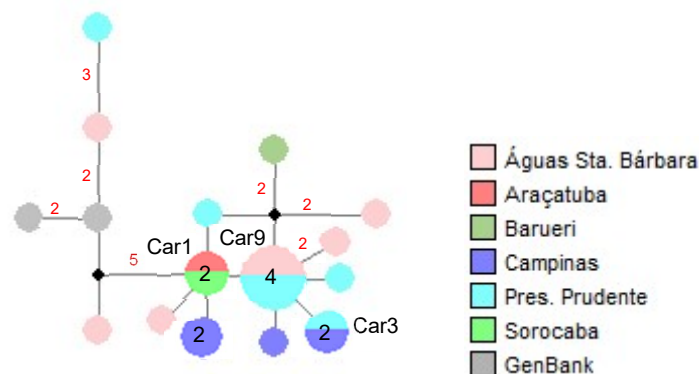
Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo "//" indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Separado por vários passos mutacionais, está o grupo de *A. lituratus*, o mais numeroso, com 22 indivíduos dispostos em 14 *singletons* e quatro haplótipos compartilhado por dois indivíduos cada, se manteve em sua maioria entre Campinas e São Paulo, com distância geográfica entre 34,7 e 106,8 km, divergindo das amostras GenBank do Suriname e Guiana por apenas um passo mutacional.

Os *A. planirostris*, em sua quase totalidade em Presidente Prudente, com um haplótipo *singleton* de São José do Rio Preto, além das duas amostras GenBank, da Guiana e Venezuela.

Carollia perspicillata contou com 22 indivíduos, divididos em 16 haplótipos (figura 14), constituídos por um a quatro indivíduos, separados por poucos passos mutacionais e distanciando geograficamente de zero a 468,2 km entre si. Os *singletons* de amostras referência (Nicarágua e México) distanciaram 1 ou 2 passos mutacionais das demais sequências do estudo.

Figura 14 - Rede de haplótipos – *Carollia* (Car)

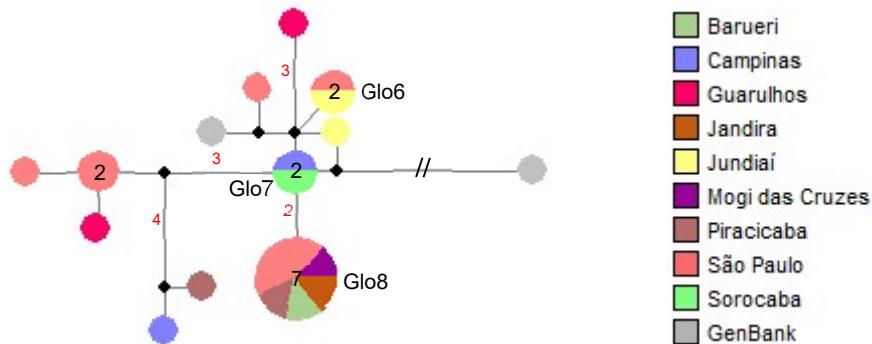


Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Glossophaga soricina, também com 22 indivíduos, distribuídos em treze haplótipos (figura 15), compostos por um a sete indivíduos, com distância geográfica entre zero e 174,2 km. A amostra referência do Suriname ficou distante por apenas um passo mutacional das amostras sequenciadas, já a amostra de Guatemala segregou por inúmeros passos mutacionais, assim como exposto na representação filogenética de Phyllostomidae (figura 4), em que a sequência referência (JF446796) aparece segregada em outro ramo, separada de todas as outras *Glossophaga soricina* da análise.

Figura 15 - Rede de haplótipos – *Glossophaga* (Glo)

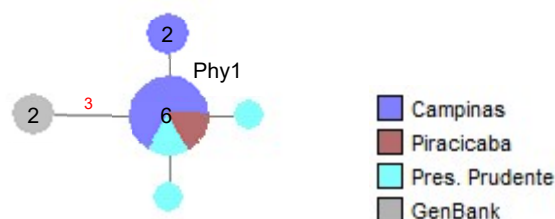


Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo '//' indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

O pequeno grupo de *Phyllostomus discolor*, composto por 12 indivíduos e cinco haplótipos (figura 16), indicou apenas um passo mutacional de distância entre os indivíduos sequenciados e três passos entre os haplótipos das amostras em estudo e do formado pelas amostras referência de El Salvador e Guatemala.

Figura 16 - Rede de haplótipos – *Phyllostomus* (Phy)

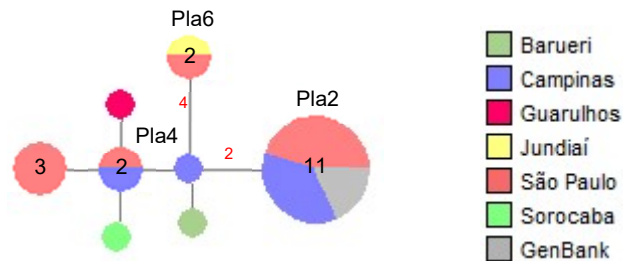


Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1).

Os 22 indivíduos *Platyrrhinus lineatus* formaram oito haplótipos (figura 17), com 50% dos quirópteros incluídos no Pla2, que se dividiu entre São Paulo, Campinas e as duas amostras referência GenBank de Gália-SP, com distâncias variando de zero a 351,7 km entre os indivíduos analisados.

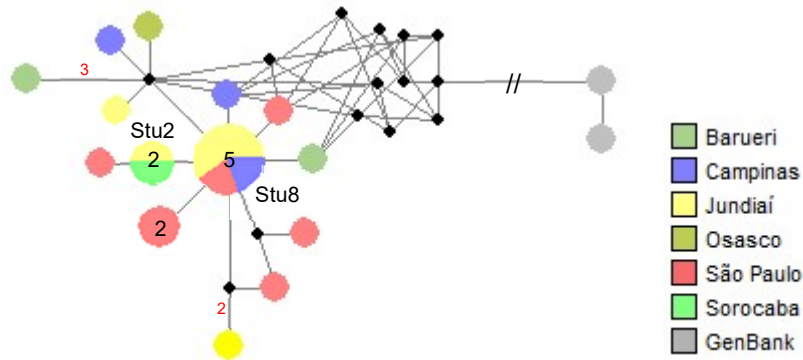
Figura 17 - Rede de haplótipos – *Platyrrhinus* (Pla)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1).

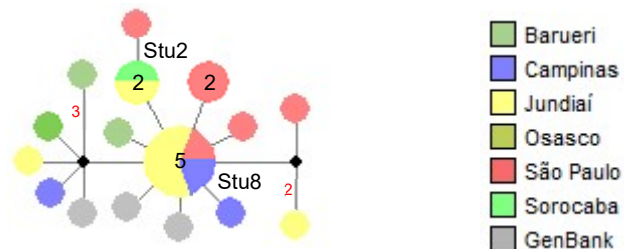
O grupo de 22 indivíduos *Sturnira lilium*, foi dividido em 16 haplótipos (figura 18), variando de um a cinco indivíduos e distância geográfica entre zero e 97,4 km no haplótipo Stu8. O que despertou atenção foram os 11 vetores médios, sequências hipotéticas geradas pelo programa, para tornar possível a conexão entre os haplótipos encontrados no estudo e os haplótipos formados pelas amostras GenBank do Equador e do Suriname, mesmo após os inúmeros passos mutacionais que já separavam os grupos.

Figura 18 - Rede de haplótipos – *Sturnira* (Stu)

Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo '//' indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo software, para conectar os haplótipos encontrados.

A partir do resultado acima, foram utilizadas três outras sequências disponíveis de *S. lilium*, capturadas no estado do Paraná-Brasil, em 2016 (EF546826, JF446386 e JF446389), em substituição às sequências referência do Equador e Suriname. O que reduziu a taxa de divergência K2P para, no máximo de 1,07%, resultando numa rede de haplótipos modificada (figura 19). Esse resultado será discutido posteriormente.

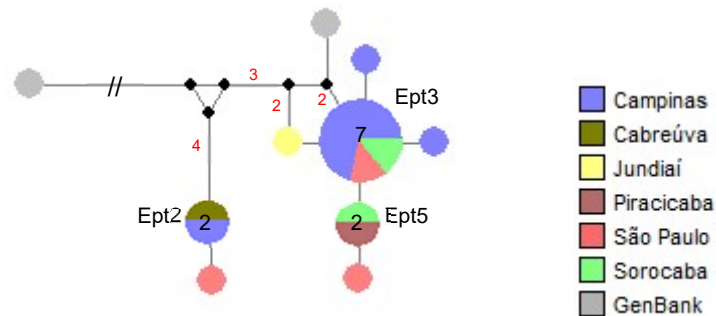
Figura 19 - Rede de haplótipos modificada – *Sturnira* (Stu)

Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo programa, para conectar os haplótipos encontrados.

Os 18 indivíduos *Eptesicus furinalis* formaram dez haplótipos (figura 20) e os sete indivíduos do Ept3 apresentaram variação de distâncias geográficas de 1,7 a 100,4 km entre si. A amostra referência GenBank do Suriname se apresentou mais próxima evolutivamente das sequências geradas que a de Belize, que ficou distante por vários passos mutacionais. Assim como apresentado anteriormente na filogenia (figura 5), onde é possível ver que Ept2 (representado por OM978281 e OM978290) e o *singleton* de São Paulo (OM978287) permaneceram em ramo terminal separado dos demais Ept3 e Ept5.

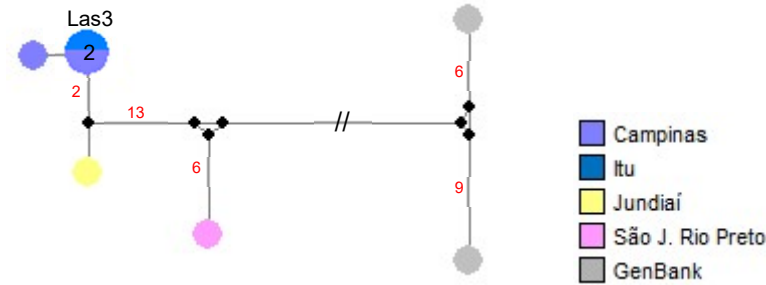
Figura 20 - Rede de haplótipos – *Eptesicus* (Ept)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo '//' indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

O grupo de apenas sete indivíduos *Lasiurus blossevillii* formou seis haplótipos (figura 21), sendo cinco *singletons*. O haplótipo de São José do Rio Preto foi o mais distante, em números de passos mutacionais, dos demais sequenciados, assim como previamente ilustrado por OM978297 no ramo terminal da árvore filogenética (figura 5), além da necessidade de inclusão de três vetores médios para conectá-los, bem como as duas sequências de referência GenBank (Panamá e Guatemala).

Figura 21 - Rede de haplótipos – *Lasiurus* (Las)

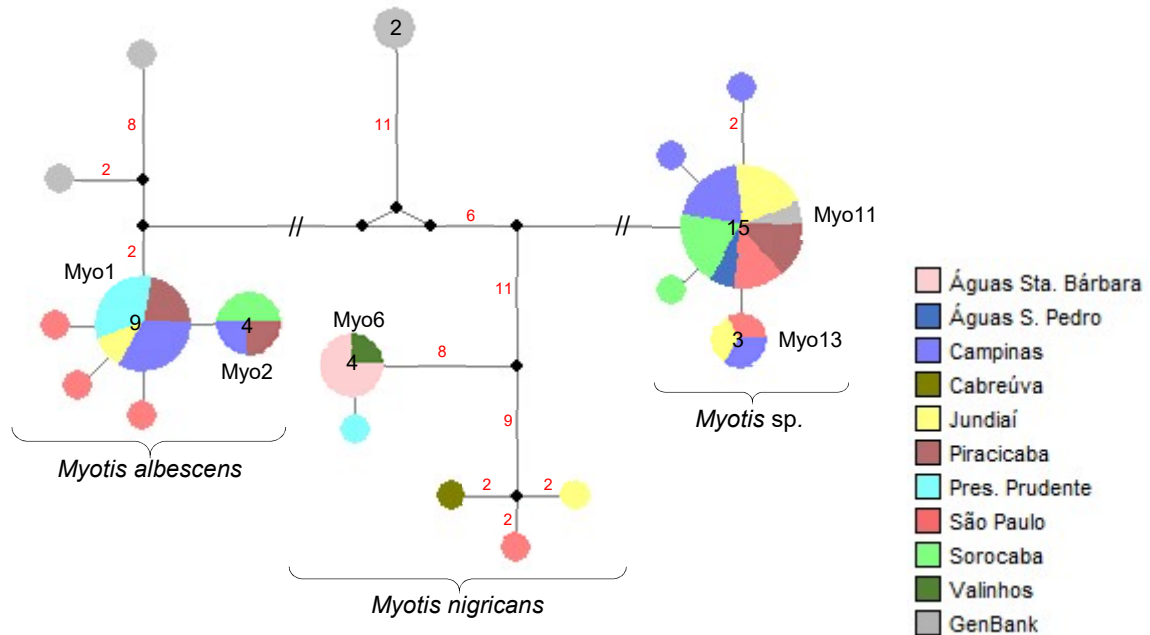
Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo '//' indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

Os 49 indivíduos *Myotis* formaram 18 haplótipos (figura 22), segregados de acordo com as três espécies em estudo, *M. albescens* formou cinco haplótipos, sendo Myo1 formado por nove indivíduos (distantes geograficamente entre zero e 471,4 km) e separados por único passo mutacional de Myo2, com quatro indivíduos e dos três *singletons* de São Paulo, como foi representado no ramo de *Myotis albescens* na árvore filogenética de Vespertilionidae (figura 5), além dos dois haplótipos com as referências da Guiana e Suriname.

O grupo de *M. nigricans* segregou em dois subgrupos, além das sequências GenBank do Equador, confirmando a segregação mostrada anteriormente na filogenia (figura 5). Um dos subgrupos de *M. nigricans* mostra três *singletons* (Cabreúva, Jundiaí e São Paulo) distantes por apenas dois passos mutacionais e o outro subgrupo aparece formado pelo *singleton* de Presidente Prudente e por Myo6 (com um indivíduo de Valinhos e três de Águas de Santa Bárbara), ambos os subgrupos separados de um vetor médio em comum por oito e nove passos mutacionais, respectivamente.

O grupo formado por *Myotis* sp., com 21 indivíduos dispostos em cinco haplótipos, onde se destaca Myo11 com 14 quirópteros de diversos municípios, com distância geográfica entre 0,6 e 146,4 km, além da sequência referência OK413003, com origem em Campinas-SP. Os demais haplótipos de *Myotis* sp. foram Myo13, formado por Campinas, São Paulo e Jundiaí, com distâncias geográfica entre 32,1 e 69,6 km e três *singletons* (dois de Campinas e um de Sorocaba).

Figura 22 - Rede de haplótipos – *Myotis* (Myo)

Fonte: BARONE (2022).

Nota: As cores dos círculos referem-se ao local de origem do quiróptero, especificadas na legenda ao lado direito da figura. O número interno dos círculos é igual ao número de indivíduos que formam o haplótipo (se >1), haplótipos *singletons* não receberam essa identificação. Haplótipos compartilhados por indivíduos de locais distintos estão identificados por nome. As linhas conectando os haplótipos indicam apenas 1 passo mutacional entre eles, enquanto os números em vermelho sinalizam a quantidade de passos mutacionais (quando >1). O símbolo ‘//’ indica que existe um elevado número de passos mutacionais entre os haplótipos. Os pontos pretos entre as linhas são os vetores médios (mv) gerados pelo *software*, para conectar os haplótipos encontrados.

O mais intrigante na rede de haplótipos de *Myotis* são os passos mutacionais (aproximadamente 50) que separam o grupo de *Myotis* sp. dos *M. nigricans* sequenciados e das referências GenBank, tendo em vista que inicialmente, todos foram classificados taxonomicamente como única espécie (*Myotis nigricans*). Esse resultado, que também ficou retratado na árvore filogenética de Vespertilionidae (figura 5), com *M. nigricans* e *Myotis* sp. em ramos distintos, estimula uma discussão entre identificação taxonômica e molecular e será abordado posteriormente.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo resultou em 384 sequências parciais do gene COI, utilizadas para identificar geneticamente as espécies de quirópteros, indicando divergência entre a identificação taxonômica e molecular dos *Myotis nigricans*. A identificação taxonômica do gênero *Myotis* é a mais complexa entre os morcegos Neotropicais, devido a inconsistências nas características que são utilizadas para diferenciar as espécies desse gênero (MORATELLI *et al.*, 2011).

As primeiras consultas ao sistema BOLD de identificação, com indivíduos classificados taxonomicamente como *Myotis nigricans*, retornaram com baixo *score* de identidade (entre 93,4% e 93,7%) em relação às sequências referência dessa espécie, o que gerou segregação dessas amostras, tomando por base o valor de 98% de identidade e 2% de divergência, proposto por Ratnasingham e Hebert (2013) para discriminar espécies usando o gene COI. Durante o 2º semestre de 2021, uma sequência de *Myotis* sp. (OK413003) tornou-se disponível no sistema BOLD, elevando, então, o *score* para 99,69%-100% de identidade entre as sequências COI geradas e a nova referência, permitindo que o grupo até então segregado, agora identificado por *Myotis* sp., retornasse à pesquisa.

Ao gerar a filogenia de Vespertilionidae, foi possível notar grande segregação entre *Myotis nigricans* e *Myotis* sp., resultado igualmente reproduzido ao construir a rede de haplótipos do gênero. Ao avaliar a divergência de nucleotídeos, por K2P, para o gênero *Myotis* e as possíveis combinações entre as três espécies (*M. albescens* + *M. nigricans*; *M. albescens* + *Myotis* sp.; *M. nigricans* + *Myotis* sp.), as taxas de divergência chegam ao valor de 11,54%, às custas de *Myotis nigricans*, nas duas combinações que envolveram essa espécie (*M. albescens* + *M. nigricans* e *M. nigricans* + *Myotis* sp.).

Em 2001, Bradley e Baker adotaram critérios para identificação de pequenos mamíferos com o CytB: valores de divergência genética <2% indicam variação intraespecífica; entre 2 e 11% podem representar variação interespecífica e exige avaliação taxonômica mais apurada; valores de divergência genética >11% indicam a presença de indivíduos de diferentes espécies. Clare (2011) e Mota *et al.* (2022) fizeram uso do COI para identificação de morcegos e utilizaram os mesmos critérios indicados anteriormente por Bradley e Baker (2001) para CytB, que corroboram com os resultados encontrados neste estudo, quando foram avaliados os inicialmente

Myotis nigricans (*Myotis nigricans* + *Myotis* sp.), com taxas de divergência de 11,54%, ratificando que realmente são duas espécies distintas encontradas na presente investigação, o que ficou claro já na inferência filogenética dos Vespertilionidae, ao se apresentarem em ramos totalmente distintos. Essa grande distância genética entre eles poderia ser um artefato da identificação taxonômica, conforme já proposto por Larsen *et al.* (2012), ao encontrarem uma média de distância K2P de 13,14% para os *Myotis*.

Segundo Moratelli *et al.* (2011), a espécie *Myotis nigricans* é a mais distribuída geograficamente entre o gênero *Myotis*, principalmente na América do Sul, provavelmente por inconsistências nas características usadas para diferenciar taxonomicamente as espécies, o que pode ser uma falha em distinguir espécies ainda não reconhecidas (LARSEN *et al.*, 2012). A distância geográfica entre os indivíduos *Myotis nigricans* utilizados aqui, foi maior entre o haplótipo Myo6 (Águas de Santa Bárbara/Valinhos) e o haplótipo *singleton* de Presidente Prudente, com distância de 457,1 km entre duas das espécies, separadas por apenas um passo mutacional - localizadas no clado à esquerda da figura 22.

Já entre o outro grupo de *Myotis nigricans*, localizado mais abaixo na mesma figura 22, e em ramo terminal distinto na árvore filogenética (figura 5), formado por três haplótipos *singletons* (OM978323-Cabreúva/OM978324-São Paulo/OM978326-Jundiaí), os indivíduos se distanciam por, no máximo, 49,8 km.

Larsen *et al.* (2012) acreditam que *Myotis nigricans* tenha distribuição geográfica mais restrita e que o número de espécies neotropicais de *Myotis* seja subestimado na América do Sul, principalmente devido a espécies desconhecidas ou crípticas que estão erroneamente classificadas como *M. nigricans*.

Com base nessas informações, na distância filogenética e geográfica encontrada entre os dois grupos *M. nigricans* aqui formados, não seria inviável sugerir que um deles não seja, de fato, *Myotis nigricans* – o que necessitaria de maiores investigações morfológicas combinadas à análise genética, como apontou Larsen *et al.* (2012), ao concluir que estudos combinados de morfologia e genética são necessários para sugerir padrões de diferenciação entre os *M. nigricans* e as outras espécies de *Myotis* da América do Sul.

Sob outra perspectiva, avaliando as taxas de divergência genética entre todos os 384 indivíduos analisados, temos um valor médio de 0,53% para Molossidae e 0,56% para Phyllostomidae, em conformidade com 0,60% encontrado por Clare *et al.*

em 2007, quando compararam o COI de 840 indivíduos de 87 espécies da Guiana. Para Vespertilionidae, a divergência média foi maior que nas outras duas famílias (0,93% com todos os indivíduos e 0,77% desconsiderando *M. nigricans*), mas ainda em concordância com os valores obtidos em outros estudos, por Ditchfield (2000), Clare *et al.* (2007) e Martins *et al.* (2007) que relatam valores médios de 1% a 2,5% de divergência por K2P entre os morcegos. A espécie com maior índice de divergência genética foi *Lasiurus blossevillii*, com 3,62%, assim como exposto por Korstian *et al.* (2016), que encontraram 6,1% de divergência para essa espécie, sendo a mais alta entre os Vespertilionidae. Esse valor foi especificamente observado entre os indivíduos OM978297-São José do Rio Preto e OM978300-Campinas, com 330,4 km de distância geográfica entre eles, o que explicaria a maior divergência, apesar de ainda permanecer dentro do limite de 4,0%, proposto por Ditchfield (2000), para morcegos.

Em contrapartida, quase a totalidade de espécies de quirópteros avaliados apresentou ausência de divergência de nucleotídeos (0%) entre alguns dos indivíduos de seu grupo, com a exceção de *Lasiurus cinereus*, formado por apenas dois indivíduos, sendo um de Campinas (OM978302) e o outro de São Paulo (OM978303), com 102,3 km de distância e 1,39% de divergência nucleotídica. Ainda na avaliação da ausência de divergência por espécie, *Phyllostomus discolor* foi o grupo com maior distância geográfica, de 518,8 km entre os indivíduos OM972728 (Presidente Prudente) e OM972733 (Campinas), igualmente como Martins *et al.* (2007), que observaram baixo nível de divergência nas sequências de Phyllostomidae em haplótipos bem definidos geograficamente.

De acordo com Ditchfield (2000), os roedores e outros pequenos mamíferos não voadores, apresentam alto nível de divergência em suas sequências - em torno de 10%, com variações entre 4% e 19% e distâncias geográficas que não ultrapassam 1.000 km, contrastando com os padrões filogeográficos dos morcegos, devido à capacidade de voo e dispersão por longas distâncias. Esse dado foi especificamente observado no haplótipo Eum6, compartilhado por dois indivíduos *Eumops auripendulus*, separados por uma distância geográfica de 3.318,9 km, sendo um deles do município de Itu (OM839768) e o outro, a sequência referência GenBank (JF454657), capturado em julho/1994 na Guiana, definida como localidade-tipo dessa espécie (Best *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2007), resultado semelhante foi obtido por López-Baucells *et al.* (2018) ao obter 100% de similaridade entre uma sequência de

Eumops maurus da Guiana e de um espécime brasileiro sequenciado por eles, cabendo aqui informar que *E. maurus* é considerado táxon irmão de *E. auripendulus* (BARTLETT; Mc DONOUGH; AMMERMAN, 2013; MEDINA *et al.*, 2014; GREGORIN *et al.*, 2016).

Inversamente ao que foi observado na rede de haplótipos de *Sturnira*, onde 11 vetores médios foram inseridos para conectar os haplótipos das sequências de referência (Equador e Suriname) aos haplótipos das sequências COI geradas. Comparando as divergências entre as sequências de referência de *S. liliium* e as geradas no estudo, foi possível obter taxas de divergência K2P que atingiram o valor máximo de 8,2%, em concordância com Clare *et al.* (2011), que encontraram 8,87% de divergência para o gene COI entre indivíduos *S. liliium* da América Central e América do Sul. Velazco e Patterson (2013; 2014) relataram que *Sturnira liliium* representaria um complexo de espécies, composto por seis subespécies, além disso, em estudo recente, Mota *et al.* (2022) apontaram que a distribuição de *S. liliium* está restrita a porções do Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina.

Com base nessas informações recentes, talvez seja possível inferir que os dois indivíduos utilizados como referência GenBank no presente estudo (do Equador e Suriname) poderiam ser de outra espécie do complexo *S. liliium*, o que explicaria a necessidade de vários vetores médios e inúmeros passos mutacionais para conectá-las com as espécies do estudo. Resultado que foi sustentado ao utilizar as três novas referências de *S. liliium*, capturadas no Paraná-Brasil, com redução da taxa de divergência e modificação da rede de haplótipos. Portanto, é possível que os dois indivíduos (Equador e Suriname, coletados em junho/1996 e novembro/2005, respectivamente) não sejam, de fato, *S. liliium*.

Encerrando as questões sobre *Sturnira* e considerando a totalidade de sequências geradas neste estudo, todas as espécies apresentaram alta ou moderada diversidade haplotípica, diferindo apenas pelos índices de diversidade nucleotídica de cada espécie. Segundo Avise (2009); Mifsud e Vella (2019), as altas diversidades haplotípica ($Hd > 0,5$) e nucleotídica ($\pi > 0,005$) presentes na população, indicam um crescimento já sustentado, como foi observado em 13 das espécies deste estudo (*Cynomops planirostris*, *Eumops auripendulus*, *Molossus molossus*, *M. rufus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Artibeus fimbriatus*, *A. lituratus*, *A. planirostris*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Eptesicus furinalis*, *Lasiurus blossevillii* e *Myotis nigricans*), enquanto a combinação de alta diversidade haplotípica ($Hd > 0,5$) e baixa

diversidade nucleotídica ($\pi < 0,005$) são indícios de populações que sofreram evento gargalo seguido de crescimento recente, como pode ser sugerido aqui para *Eumops glaucinus*, *E. perotis*, *Molossops neglectus*, *Nyctinomops macrotis*, *Promops nasutus*, *Tadarida brasiliensis*, *Phyllostomus discolor*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira lilium*, *Myotis albescens* e *Myotis* sp.

A importância da alta diversidade genética entre indivíduos de uma espécie está intimamente relacionada à capacidade de resposta adequada aos eventos e pressões seletivas (CRUZ-SALAZAR, *et al.* 2018). Um mais amplo entendimento da diversidade genética entre as espécies aqui estudadas pode se beneficiar do uso de outros marcadores, que não apenas os mitocondriais, mas também de genes nucleares.

Ainda, no caso do grupo determinado como *Myotis* sp., uma análise morfológica mais detalhada pode levar à atualização de chaves taxonômicas que auxiliem no entendimento de se tratar de uma espécie críptica, o que pode colaborar não apenas para estudos em raiva, mas também de conservação de espécies de quirópteros.

Com isso, confirma-se a hipótese de que a filogenia molecular de quirópteros é capaz de prover acurada distinção entre espécies de morcegos, servindo como base para estudos e visando o entendimento da coevolução de RABV com diferentes espécies de quirópteros.

8 CONCLUSÕES

8.1 Com a análise comparativa entre a taxonomia morfológica e molecular, foi possível ratificar a relevância do uso de marcadores moleculares mitocondriais na identificação de espécies, principalmente as mais complexas, como as do gênero *Myotis*.

8.2 O estudo possibilitou gerar e disponibilizar 384 sequências parciais do gene COI de quirópteros, de algumas das espécies circulantes em 24 dos municípios do Estado de São Paulo.

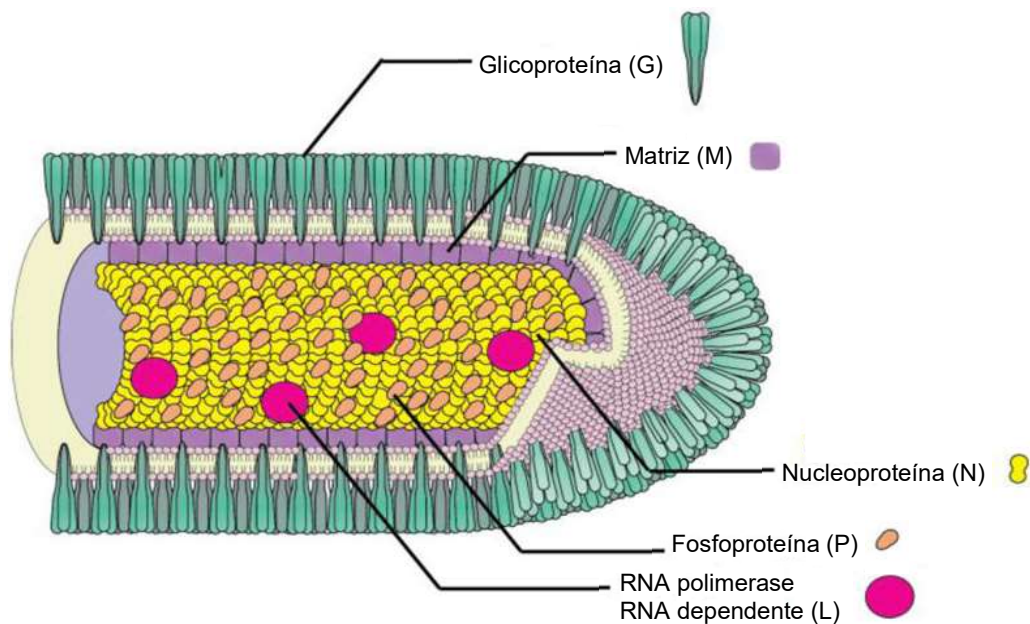
8.3 Quirópteros do Estado de São Paulo apresentam elevada diversidade genética intraespecífica para algumas das espécies, com filogenias moleculares indicando estruturas populacionais complexas.

CAPÍTULO II: Relação entre variantes do vírus da raiva e diversos hospedeiros sob o ponto de vista da utilização de códons

9 INTRODUÇÃO

O RABV tem pouca resistência fora do organismo hospedeiro, é sensível à luz solar, radiação ultravioleta, hipoclorito de sódio, sabão e detergente, mantendo-se estável em temperaturas inferiores a -20°C (BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007). É um vírus envelopado, possui genoma RNA de fita simples, não segmentado e de polaridade negativa, com tamanho aproximado de 12 kb, tem formato de projétil de arma de fogo (figura 23) e estrutura em torno de 200 nm de comprimento por 75 nm de largura (TORDO; KOUKNETZOFF, 1993; MORLA; MAKHIJA; KUMAR, 2016; ZHANG *et al.*, 2018; FISHER *et al.*, 2020). Seu nucleocapsídeo é helicoidal e rodeado por uma fina membrana de proteínas, possui cinco genes que codificam para cinco proteínas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) e RNA polimerase RNA dependente (L), dispostas na sequência 3' - N, P, M, G, L - 5', conforme ilustra a figura 24 (TROUPIN *et al.*, 2016; DING *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017; MARSTON *et al.*, 2018).

Figura 23 - Representação do RABV



Fonte: modificado de DAVIS; RALL; SCHNELL (2015).

A proteína N possui 450 aminoácidos e tem a função de encapsular o RNA do vírus durante a replicação viral, protegendo-o da degradação por RNAses; é a mais conservada entre todas as proteínas do RABV e, por isso, é usada como base para o diagnóstico da doença e também na tipificação genética do vírus. A proteína P é a menos conservada, com 298 aminoácidos, está envolvida no transporte viral e é responsável pela transcrição e replicação do vírus. A proteína M é a menor do RABV, com 203 aminoácidos, reveste o envelope viral e apresenta importante função na patogenicidade da doença. A proteína G, formada por 525 aminoácidos, é a responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira e pela fusão do envelope viral à membrana citoplasmática, produz anticorpos neutralizantes, é alvo no diagnóstico da doença e no desenvolvimento de vacina. A maior proteína do RABV é a L, com 2128 aminoácidos, tem atividade enzimática e participa da transcrição do genoma viral e da síntese de RNA (RUPPRECHT; HANLON; HEMACHUDHA, 2002; BATISTA; FRANCO; ROEHE, 2007; MORLA; MAKHIJA; KUMAR, 2016; HE *et al.*, 2017; FISHER; STREICKER; SCHNELL, 2018).

Figura 24 - Esquema representativo dos cinco genes RABV



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Representação dos cinco genes RABV e seus respectivos tamanhos. O número de aminoácidos que constitui cada gene está indicado abaixo do mesmo.

Sequências de proteínas são compostas por diferentes combinações entre os 20 aminoácidos disponíveis (quadro 2) e existem 61 códons para codificar esses aminoácidos em proteínas. Esse excedente no número de códons permite que um único aminoácido seja codificado por vários códons, conferindo ao código genético a característica em ser degenerado ou redundante (FUGLSANG, 2004; HERSHBERG; PETROV, 2008; BEHURA; SEVERSON, 2013; HE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2018).

Códons diferentes que codificam para o mesmo aminoácido são chamados de códons sinônimos (HERSHBERG; PETROV, 2008; PLOTKIN; KUDLA, 2011; BEHURA; SEVERSON, 2013; HE *et al.*, 2017). Na maioria dos genomas já sequenciados, observou-se que os códons sinônimos são usados em frequências variáveis durante o processo de tradução das proteínas, esse fenômeno recebe o

nome de viés de uso de códons (HERSHBERG; PETROV, 2008; PLOTKIN; KUDLA, 2011; BRANDÃO, 2012; CHEN, 2013). Essa tendência de utilização varia de um organismo para outro e entre os genes de cada genoma, geralmente sendo semelhante quando as espécies estão intimamente relacionadas e diferem entre organismos geneticamente distantes (WRIGHT, 1990; VICARIO; MORIYAMA; POWELL, 2007; FUGLSANG, 2008; LEE *et al.*, 2010).

Quadro 2 - Códons e aminoácidos

		2ª posição do códon								
		U		C		A		G		
1ª posição do códon	U	UUU	Fenilalanina (F)	UCU	Serina (S)	UAU	Tirosina (Y)	UGU	Cisteína (C)	U
		UUC		UCC		UAC		UGC		C
		UUA	Leucina (L)	UCA		UAA	códons de parada	UGA	códon de parada	A
		UUG		UCG		UAG		UGG		Triptofano (W)
	C	CUU	Leucina (L)	CCU	Prolina (P)	CAU	Histidina (H)	CGU	Arginina (R)	U
		CUC		CCC		CAC	CGC			C
		CUA		CCA		CAA	CGA			A
		CUG		CCG		CAG	CGG			G
	A	AUU	Isoleucina (I)	ACU	Treonina (T)	AAU	Asparagina (N)	AGU	Serina (S)	U
		AUC		ACC		AAC		AGC		
		AUA		ACA		AAA	Lisina (K)	AGA	Arginina (R)	A
		AUG	Metionina (M)	ACG		AAG		AGG		G
G	GUU	Valina (V)	GCU	Alanina (A)	GAU	Aspartato (D)	GGU	Glicina (G)	U	
	GUC		GCC		GAC		GGC			C
	GUA		GCA		GAA	Glutamato (E)	GGA			A
	GUG		GCG		GAG		GGG			G

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Códons e seus respectivos aminoácidos. Em azul está o códon de início (AUG) e em vermelho, os códons de parada (UAA, UAG e UGA).

O viés de uso de códons é mantido pelo equilíbrio entre seleção natural, mutação e deriva gênica (HERSHBERG; PETROV, 2008; BEHURA; SEVERSON, 2013). Nos vírus RNA, está associado ao nível de expressão gênica, com fundamental importância na evolução viral e na relação vírus-hospedeiro (JENKINS; HOLMES, 2003; PLOTKIN; KUDLA, 2011; HE *et al.*, 2017).

A intensidade do viés não é um processo aleatório, alguns genes apresentam viés muito forte enquanto outros utilizam os códons sinônimos em frequências semelhantes (ausência de viés). Um códon sinônimo com alto viés de utilização é

chamado códon preferido, enquanto os códons com pouco viés são denominados preteridos (HERSHBERG; PETROV, 2008; BEHURA; SEVERSON, 2013; CHEN, 2013; HE *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2018). A diversidade de escolha do uso de códons interfere na relação vírus-hospedeiro, afetando diretamente a sobrevivência do vírus e a saúde do hospedeiro, além da evolução e *fitness* viral (HE *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2018). Entender a extensão e as causas do viés de uso de códons, analisando as relações entre os hospedeiros, é essencial para compreender a evolução viral (JENKINS; HOLMES, 2003; HE *et al.*, 2017).

Assim como outros vírus RNA, os *Lyssavirus* apresentam altas taxas de mutação e evolução, devido à falta de atividade revisora da RNA polimerase RNA dependente. Esse elevado índice mutacional, quando comparado aos vírus DNA, permite vantagens na capacidade de explorar, com sucesso, novos organismos e espécies hospedeiras. A pressão exercida pelas altas mutações tem se mostrado como fator capaz de moldar o viés de uso de códons nesses vírus. (JENKINS; HOLMES, 2003; TROUPIN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

Diferentes organismos possuem padrões distintos de composição em suas bases (A, T, C e G) e raramente a proporção A+T é equivalente ao G+C. Mamíferos possuem um maior conteúdo de GC global quando comparados aos outros vertebrados e esse conteúdo GC é um pouco menor no genoma mitocondrial em relação ao restante do genoma desses animais (MOOERS; HOLMES, 2000). Segundo Wright (1990), nos mamíferos é possível observar um viés de uso de códons resultante da variação do conteúdo G+C, especificamente na terceira posição do códon (GC_{3s}).

A questão mais importante relacionada ao viés de uso de códons é entender qual força evolutiva controla esse evento – se pressão de mutação ou seleção natural (JENKINS; HOLMES, 2003; HE *et al.*, 2017). O conteúdo GC dos genomas é conhecido por afetar diretamente o viés e uma das ferramentas utilizadas para verificar esse fato é avaliar o conteúdo GC total e local, em cada uma das três posições do códon, comparando o GC das 1ª e 2ª posições (GC_{12s}) com o conteúdo GC da 3ª posição (GC_{3s}) (MOOERS; HOLMES, 2000; JENKINS; HOLMES, 2003; MEGANATHAN *et al.*, 2012).

O índice RSCU (*Relative Synonymous Codon Usage*) é usado para investigar as características de utilização dos códons, ele mostra a razão entre a frequência observada de uso de códons e a frequência esperada de uso, caso este evento fosse

um processo aleatório e todos os códons fossem igualmente utilizados naquele aminoácido. Ele é códon específico, indicando exatamente o desvio de uso em cada códon, sem influência da composição dos aminoácidos (SHARP; LI, 1986; BRANDÃO, 2012; MEGANATHAN *et al.*, 2012; CHEN, 2013).

Valorem de RSCU >1 indicam alto viés de utilização de determinado códon, que recebe o nome de códon preferido. RSCU <1 indicam que o códon não é preferencial, é preterido, tem baixo viés de utilização. Códon com RSCU =1 são considerados neutros, quando não existe preferência pela sua utilização (MEGANATHAN *et al.*, 2012; BRANDÃO, 2013; MORLA; MAKHIJA; KUMAR, 2016; HE *et al.*, 2017).

Como já exposto anteriormente, a questão mais importante relacionada ao viés de uso de códons é entender qual força evolutiva o controla, para isso Wright (1990) desenvolveu o índice Enc (*Effective Number of Codons*), que indica a influência da seleção natural ou da pressão mutacional no uso de códons, ele mostra o número total de códons sinônimos disponíveis para codificar um determinado aminoácido e aponta o viés de uso específico, apresentando-se com um indicador que independe da espécie e do tamanho do gene em estudo (FUGLSANG, 2004; 2008).

Valores de Enc podem variar entre 20 e 61 e estão inversamente correlacionados com o viés de uso de códons (MEGANATHAN *et al.*, 2012), em que 20 indica intenso viés, em que apenas um códon é usado para codificar cada aminoácido, valores de Enc >40 são considerados como baixo viés de utilização e valores próximos de 61 apontam ausência de viés, em que todos os códons sinônimos são igualmente utilizados e tem a mesma probabilidade de codificar o aminoácido (WRIGHT, 1990; POWELL; MORIYAMA, 1997; JENKINS; HOLMES, 2003; FUGLSANG, 2008; TIAN *et al.*, 2018).

O índice CAI (*Codon Adaptation Index*) tem a finalidade de mensurar o viés de uso de códons sinônimos em determinado gene, sendo considerado um indicador gene-específico (SHARP; LI, 1987; XIA, 2007). Genes altamente expressos tendem a ter alto valor de CAI (LEE *et al.*, 2010; BRANDÃO, 2012; BEHURA; SEVERSON, 2013; WEI *et al.*, 2014), por isso são usados como conjuntos de referência, para estimar a similaridade do viés de uso de códons entre vírus e hospedeiro (SHARP; LI, 1987; PUIGBÒ; BRAVO; GARCIA-VALLVÉ, 2008a; PLOTKIN; KUDLA, 2011; CHEN, 2013). A correlação entre valores de Enc e CAI também indica a influência que a

seleção natural e a pressão de mutação têm sob o viés (VICARIO; MORIYAMA; POWELL, 2007; DUTTA; BURAGOHAIN; BORAH, 2020).

Os valores de CAI podem variar de zero a 1 e estão diretamente relacionados à otimização da tradução do gene e seu nível de expressão, usados para estimar a adaptação do vírus aos códons do hospedeiro, indicando o nível de expressão de proteínas patogênicas no hospedeiro (BRANDÃO, 2012; KHANDIA *et al.*, 2019). Altos índices de CAI apontam que o gene viral utiliza os códons sinônimos com maior frequência, revelando alta adaptação ao organismo hospedeiro (BRANDÃO, 2012). Com o CAI, é possível mensurar a eficiência de tradução de determinado gene, o que frequentemente é utilizado para construção de sequências nucleotídicas, com o objetivo de obter o mais alto nível de expressão de proteínas para a produção de vacinas (DUTTA; BURAGOHAIN; BORAH, 2020).

O índice RCDI (*Relative Codon Deoptimization Index*), semelhante ao CAI, foi desenvolvido por Mueller *et al.* (2006), com objetivo de calcular o índice relativo de desotimização de códons, comparando o uso de códons entre um gene e uma sequência de referência (DUTTA; BURAGOHAIN; BORAH, 2020). Muito utilizado em pesquisas com vírus (PUIGBÒ; ARAGONES; GARCIA-VALLVÉ, 2010), os valores de RCDI estimam a taxa de tradução dos genes virais no genoma do hospedeiro e são inversamente proporcionais ao CAI.

Valores de RCDI podem indicar coevolução entre o genoma do vírus e do hospedeiro (DUTTA; BURAGOHAIN; BORAH, 2020). Quanto maior a similaridade genética entre vírus e hospedeiro, maior será a razão de tradução (RCDI =1), indicando que o vírus segue o mesmo padrão de uso de códons do hospedeiro, portanto, maior adaptação ao organismo (KHANDIA *et al.*, 2019; NAMBOU; ANAKPA; TONG, 2022), enquanto valores >1 indicam menor adaptação (HE; GAN; LIANG, 2019). No entanto, altos valores de RCDI podem indicar expressão do gene viral durante o período de latência ou de manutenção da baixa taxa de tradução, com a finalidade de evitar erros (DUTTA; BURAGOHAIN; BORAH, 2020; ATA *et al.*, 2021; NAMBOU; ANAKPA; TONG, 2022).

10 HIPÓTESE

Padrões de utilização de códons podem explicar variações na virulência de linhagens de RABV entre quirópteros e mamíferos terrestres.

11 OBJETIVOS

11.1 Indicar padrões de utilização de códons do RABV em isolados de diversos hospedeiros;

11.2 Avaliar comparativamente a utilização de códons de RABV, com base em gene altamente expresso nos hospedeiros;

11.3 Inferir as forças evolutivas que interferem no viés de uso de códons nas variantes de RABV.

12 MATERIAIS E MÉTODOS

12.1 AMOSTRAS DE QUIRÓPTEROS

Os espécimes de quirópteros selecionados para esta etapa do estudo também fazem parte das amostras recebidas para diagnóstico de raiva no LabZoo/DVZ, como parte do programa de vigilância passiva desta zoonose. A eleição dos indivíduos e a diversidade de espécies utilizadas também foram determinadas de acordo com os quirópteros recebidos para realização do diagnóstico de raiva no LabZoo/DVZ, de janeiro/2020 a dezembro/2021 e identificados pelo Laboratório de Fauna Sinantrópica - Quirópteros (LabFauna/DVZ), conforme critérios de Vizotto e Taddei (1973) e Gardner (2007).

12.1.1 Extração do RNA total

Após a retirada do SNC dos quirópteros, em torno de 0,06 g do tecido foram depositadas em microtubo de 1,5 mL livre de RNases e DNases, armazenado sob a temperatura de -70 °C até o momento da extração do RNA total, que foi realizada com adição de *TRIzol*TM (Thermo Fisher) ao fragmento do SNC, conforme protocolo do fabricante. Após o término da extração, as amostras de RNA permaneceram acondicionadas em temperatura de -70 °C até a transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

12.1.2 Transcrição Reversa e Amplificação parcial do mRNA de β -actina

Com a finalidade de gerar indicadores de utilização de códons dos quirópteros para subsequente estudo do viés de utilização de códons de RABV, o mRNA de β -actina foi utilizado, em função de se ter elevada transcrição, dada sua função estrutural nas células.

Todas as amostras de RNA extraído foram submetidas à RT, para a obtenção do DNA complementar (cDNA), utilizando *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher) com *primers* randômicos, seguindo as instruções do fabricante e com os seguintes parâmetros de termociclagem: 25 °C por 10 minutos; 42 °C por 60 minutos e 85 °C durante 5 minutos.

Na reação de PCR das amostras de cDNA, foi utilizado o par de *primers* descrito no quadro 3, desenhados e sintetizados para este estudo, a partir de sequências completas disponíveis no GenBank e com base em região conservada de mRNA da β -actina de camundongo (BC138614), cão (AF021873) e humano (NM_001101), tendo em vista a escassez de sequências disponíveis de mRNA de β -actina de morcegos, além do propósito de expandir a amplitude genética da pesquisa.

Quadro 3 - *Primers* utilizados na PCR para amplificação da β -actina

<i>primer</i>	sentido	sequência	alvo	posição*
ACTBM-S	senso	5' CAACTGGGACGACATGGA 3'	β -actina	277-294
ACTBM-A	anti-senso	5' TCCTTCTGCATCCTGTC 3'	β -actina	993-977

Fonte: BARONE (2022).

Nota: *Primers* desenhados para amplificação do mRNA da β -actina. *posição dos nucleotídeos em relação à sequência GenBank BC138614 (*Mus musculus*) <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>.

Para uma reação com volume final de 25 μ L, foram utilizados 0,5U de *Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher), *High Fidelity Buffer* 10 x (600 mM Tris-SO₄ pH 8,9 e 180 mM de (NH₄)₂SO₄), 200 μ M de dNTP's, 2 mM de MgSO₄, 0,4 μ M de cada *primer* e 2,5 μ L do cDNA, gerando *amplicon* de 717 pb. Água tratada com Dietil Pirocarbonato (água DEPC) foi utilizada como controle negativo da reação. Os parâmetros de ciclagem foram: 1 ciclo inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 68

°C por 1 minuto, finalizando com ciclo único de 68 °C durante 5 minutos. Após finalizada a PCR da β -actina, os *amplicons* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5 %, preparado em tampão TAE 1 x (Tris Acetato Etilenodiamino Tetra-Acético) e corado com *Sybr® Safe* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Cada amostra foi acrescida de *BlueJuice® Gel Loading Buffer* (Invitrogen™) antes de ser aplicada ao gel, utilizando o marcador de peso molecular *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen™) em todas as corridas realizadas.

12.1.3 Purificação de *amplicons* e reação de sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR foram purificados pelo método enzimático, utilizando *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher), seguindo as orientações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Thermo Fisher) e a precipitação teve por base o protocolo etanol/EDTA, conforme instruções do mesmo fabricante. Por fim, os produtos foram submetidos ao sequenciamento de Sanger bidirecional (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando o sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA), de acordo com as orientações do fabricante.

12.1.4 Edição e análise das sequências

A fim de avaliar a qualidade das bases geradas durante o sequenciamento, foi utilizado o *software DNA Dragon v.1.9.1* <<https://dna-dragon.com/>> (HEPPERLE, 2011), que possibilitou analisar os eletroferogramas e gerar as sequências consenso, além de proceder à tradução dos nucleotídeos em aminoácidos.

O alinhamento foi realizado com o *software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.3* (HALL, 1999), aplicando o algoritmo *ClustalW Multiple Alignment*, em que todas as sequências geradas foram alinhadas e analisadas comparativamente com a sequência de camundongo (*Mus musculus* - BC138614), assumida como padrão. Para grupo externo, foi utilizada a sequência parcial do anfíbio *Xenopus tropicalis* (NM_213719), devido à uniformidade do conteúdo GC em seu genoma (MOOERS; HOLMES, 2000).

12.1.5 Filogenia baseada em β -actina

Com o propósito de reconstruir a filogenia para as sequências parciais de β -actina geradas neste estudo, 26 sequências da β -actina de possíveis hospedeiros terrestres, disponíveis no GenBank, foram utilizadas como referência (apêndice E).

As relações filogenéticas entre os indivíduos foram estimadas por Máxima Verossimilhança (ML - *Maximum Likelihood*) e, de acordo com o modelo de substituição nucleotídica selecionado pelo aplicativo JModelTest (DARRIBA *et al.*, 2012), conforme o Critério de Informação de Akaike (AIC). A busca heurística foi realizada por *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI) e a confiabilidade dos ramos foi avaliada empregando 1000 repetições de *bootstrap*, por intermédio do *software* PAUP* 4.1b (SWOFFORD, 2002). Para edição e anotação das árvores filogenéticas, foi empregada a ferramenta *online* iTOL - *Interactive Tree Of Life* <<https://itol.embl.de/>> (LETUNIC; BORK, 2021).

12.2 ANÁLISE DO USO DE CÓDONS

Para mensurar o uso de códons do RABV, foram incluídas 51 sequências do genoma completo de RABV, isolados de diversas espécies (apresentadas no apêndice F), disponíveis no GenBank. Os cinco genes virais (N, P, M, G e L) das sequências foram analisados individualmente.

Para avaliar o uso de códons dos hospedeiros, foram utilizadas as sequências de β -actina dos quirópteros geradas neste estudo e as 26 referências dos possíveis hospedeiros terrestres do GenBank.

Com o propósito de obter indicadores para avaliar o viés de uso de códons de RABV e seus possíveis hospedeiros, foram avaliados os índices: conteúdo GC, RSCU, Enc, CAI e RCDI.

12.2.1 Análise do conteúdo GC

Os valores de GC_{3%} foram calculados com suporte da ferramenta *online* CAIcal Server <<http://genomes.urv.es/CAIcal/>>, descrita por Puigbò, Bravo e Garcia-Vallvé (2008a) e utilizados para identificar se o viés de uso de códons foi induzido por pressão mutacional ou seleção natural.

12.2.2 *Relative Synonymous Codon Usage (RSCU)*

Para estimar individualmente a utilização de códons em cada uma das sequências analisadas, seja dos isolados de RABV ou da β -actina dos possíveis hospedeiros terrestres e dos quirópteros, o valor de RSCU foi calculado empregando a ferramenta *online CAIcal Server* <<http://genomes.urv.es/CAIcal/>>, descrita por Puigbò, Bravo e Garcia-Vallvé (2008a).

Após finalizar o cálculo do RSCU, os valores obtidos foram convertidos em dados binários, substituindo os códons preferidos (RSCU >1) pelo número 1 e os códons neutros (RSCU =1) e preteridos (RSCU <1), pelo número 0, permitindo, assim, formar uma matriz binária e construir uma árvore filogenética para cada um dos cinco genes do RABV, baseada nos valores de RSCU, pelo método de distância *Neighbor-Joining* (NJ). A confiabilidade dos ramos foi avaliada empregando 1000 repetições de *bootstrap*, por intermédio do *software* PAUP* 4.1b (SWOFFORD, 2002). Para edição e anotação das árvores, foi empregada a ferramenta *online* iTOL - *Interactive Tree Of Life* <<https://itol.embl.de/>> (LETUNIC; BORK, 2021).

12.2.3 *Effective Number of Codons (Enc)*

Com a finalidade de quantificar a adaptação das variantes de RABV ao SNC de seus possíveis hospedeiros, o valor de Enc foi calculado em todas as sequências dos isolados analisadas, por meio do *software* DAMBE v.7.2.137 - *Data Analysis in Molecular Biology and Evolution* (XIA, 2018).

Com o propósito de verificar se o viés de uso de códons do RABV foi por influência de seleção natural ou pressão mutacional, os valores de Enc observados e esperados (Enc_{expect}) foram graficamente plotados (Enc-plot), contra os valores de GC_3 (BRANDÃO, 2012; HE *et al.*, 2017). Valores pontuados sob a curva esperada indicam que o uso de códons foi influenciado por pressão mutacional/deriva gênica, enquanto que valores abaixo ou acima da curva esperada indicam que a seleção natural pode ser a responsável pelo viés.

12.2.4 Codon Adaptation Index (CAI)

Para quantificar o índice de adaptação de códons das variantes RABV aos diversos possíveis hospedeiros, os valores de CAI foram calculados para todas as sequências dos isolados aqui analisadas, com subsídio da ferramenta *online CAIcal Server* <<http://genomes.urv.es/CAIcal/>>, descrita por Puigbò, Bravo e Garcia-Vallvé (2008a), utilizando como conjunto referência de genes altamente expressos as sequências de β -actina dos possíveis hospedeiros terrestres e dos quirópteros geradas neste trabalho, que foram convertidas em conjunto de uso de códons de referência, com auxílio do programa *online Countcodon v. 4* <<https://www.kazusa.or.jp/codon/countcodon.html>>, disponível na ferramenta *Codon Usage Database* <<http://www.kazusa.or.jp/codon/>> (NAKAMURA; GOJOBORI; IKEMURA, 2000).

A fim de verificar se as diferenças entre valores de CAI foram estatisticamente significativas, resultando da preferência de códons ou se foram possíveis artefatos de viés na composição de GC das sequências de referência, o valor de CAI esperado (*Expected CAI*, e-CAI) foi calculado aplicando o teste de *Kolmogorov-Smirnov*, com intervalo de confiança de 95% e abrangendo 95% da população analisada, com a ferramenta *online CAIcal Server* <<http://genomes.urv.es/CAIcal/>>, descrita por Puigbò, Bravo e Garcia-Vallvé (2008b).

12.2.5 Relative Codon Deoptimization Index (RCDI)

Para calcular RCDI foi utilizada a ferramenta *online CAIcal Server* <<http://genomes.urv.cat/CAIcal/RCDI/>>, descrita por Puigbò, Aragones e Garcia-Vallvé (2010).

12.3 ENSAIOS *in vivo*

Com o intuito de estudar a influência da passagem de RABV em camundongos, sobre a utilização de códons, uma amostra de quiróptero *Artibeus lituratus* (3257/21 – São José do Rio Preto), positivo para o diagnóstico de raiva, foi utilizada como base para estudo comparativo entre os valores de CAI aqui obtidos, conforme descrito a seguir.

Após confirmação do diagnóstico positivo para raiva na referida amostra, parte do SNC do quiróptero foi retirado, procedendo à maceração em gral com pistilo de porcelana e diluição em solução salina com 2% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, SP, Brasil) com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (10.000 unidades de penicilina e 10mg de estreptomicina/mL - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a fim de obter uma solução com 20% de SNC da amostra original, a qual foi utilizada para inoculação intracerebral em camundongo albino suíço.

Para realizar a inoculação intracerebral, primeiramente o camundongo albino suíço foi anestesiado com halotano por via inalatória e 0,03 mL da suspensão 20% de SNC foram inoculados intracerebralmente. O animal foi observado diariamente e, ao primeiro sinal de sintomatologia nervosa (agitação, espasmo, agressividade, marcha anormal, paralisia de membros posteriores e cifose), foi submetido à eutanásia, com uso de anestesia inalatória (halotano) e injetável (tiopental), por via intraperitoneal. Após eutanásia, o SNC do camundongo foi retirado, macerado e diluído a 20% em solução salina. Essa foi denominada como 1ª passagem em camundongo e todo o processo descrito acima foi repetido até a 10ª passagem.

12.3.1 Quantificação da carga viral por qPCR

Para avaliar a adaptação do isolado de quiróptero ao camundongo e quantificar a carga viral da amostra original e das passagens, a técnica de qPCR foi utilizada, com uso da quantificação absoluta, comparando os dados obtidos com a curva padrão, a partir de diluições seriadas de *amplicon* com concentração conhecida (BUSTIN, 2000).

Para a construção da curva padrão, foi utilizado o plasmídeo *pGEM-T Easy* (Promega, Madison, WI, USA) contendo o inserto PV-ptnN correspondente ao gene N do isolado adaptado de RABV PV, gentilmente cedido pela Dra. Sueli Akemi Taniwaki Miyagi do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS/VPS/FMVZ/USP). A concentração do plasmídeo contendo o inserto foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher), o peso molecular do plasmídeo e do inserto foram obtidos com o aplicativo *online* Oligo Calc (KIBBE, 2007 - <<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>>. O número de cópias do alvo, por μL , foi calculado com a seguinte fórmula: Número de cópias/ μL =

constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$) x a concentração do plasmídeo + inserto em g/ μ L / Peso molecular do plasmídeo + inserto em g/mol.

O plasmídeo contendo o inserto foi diluído em água DEPC na base 10, de $3,125 \times 10^7$ a $3,125 \times 10^2$ cópias por reação. Cada ponto de diluição da curva foi testado em triplicata, juntamente com a amostra controle positivo (isolado 1069/18), gentilmente cedida pela Dra. Juliana Amorim Conselheiro (LabZoo/DVZ), utilizada como referência para a normalização dos testes. Foi utilizado o sistema de agentes intercalantes (*Power SYBR® Green* - Thermo Fisher) e os *primers* apresentados no quadro 4, conforme descrito por Wakeley *et al.* (2005).

Finalizada a construção da curva padrão, foi realizada a quantificação da carga viral, após a extração e reação de transcrição reversa (já descritas anteriormente), cada amostra foi submetida à reação de qPCR, com volume final de 20 μ L, contendo 1X *Power SYBR® Green* (Thermo Fisher), 0,5 μ M de cada *primer* e 2,5 μ L do cDNA. O sistema de PCR em tempo real *StepOne™* (Thermo Fisher) foi utilizado com os parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A curva de dissociação foi feita em um estágio de 95°C por 15 segundos, seguido de um passo de 60°C por 1 minuto, com aumento gradual da temperatura de 0,3°C/segundo até atingir 95°C. Finalizada a ciclagem, as análises foram feitas no *software* do equipamento. Para normalização dos níveis de expressão do gene N, a β -actina foi utilizada como controle endógeno, com os *primers* apresentados no quadro 4, conforme descrito por Wakeley *et al.* (2005).

Quadro 4 – *Primers* utilizados na qPCR para amplificação de RABV (gene N) e β -actina

<i>primer</i>	sentido	sequência	alvo	fragmento	posição*
JW-12	senso	5' ATGTAACACCYCTACAATG 3'	RABV - gene N	111 pb	55-73
N165-146	anti-senso	5' GCAGGGTAYTTRTACTCATA 3'	RABV - gene N	111 pb	146-165
β -act intronic	senso	5' CGATGAAGATCAAGATCATTGC 3'	β -actina	138 pb	1051-1072
β -act reverse	anti-senso	5' AAGCATTTCGCGGTGGAC 3'	β -actina	138 pb	1204 - 1188

Fonte: BARONE (2022).

Nota: *posição dos nucleotídeos em relação à sequência *Pasteur Virus* (PV) – M13215 do GenBank <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>.

12.3.2 Amplificação dos genes N e G das passagens em camundongo

Concomitantemente, fragmentos de 0,06 gramas, tanto da amostra original de quiróptero (3257/21) quanto das dez passagens em camundongo, foram utilizados para amplificação dos genes N e G de RABV. O processo de retirada do SNC, extração, transcrição reversa, amplificação, sequenciamento e análise dos resultados, foram executados como descrito anteriormente. Os *primers* utilizados na amplificação dos genes N e G estão indicados no quadro 5, de acordo com Orciari *et al.*, 2001 e Sato *et al.*, 2004, respectivamente.

Quadro 5 - *Primers* utilizados para amplificação de RABV (genes N e G)

<i>primer</i>	sentido	sequência	alvo	fragmento	posição*
21G	senso	5' ATGTAACACCTCTACAATG 3'	gene N	1478 pb	55-73
304	anti-senso	5' TTGACGAAGATCTTGCTCAT 3'	gene N	1478 pb	1514-1533
Ga3222-40	senso	5' CGCTGCATTTTRTCARAGT 3'	gene G	915 pb	3221-3239
Gb4119-39	anti-senso	5' GGAGGGCACCATTTGGTMTTC 3'	gene G	915 pb	4116-4135
Gs3994	senso	5' GGGMTTGTGGATGAAAGRGGC 3'	gene G	1388 pb	3995-4016
GantiBR2072	anti-senso	5' TGCTGATTGCRCCTACATT 3'	gene G	1388 pb	5363-5382

Fonte: BARONE (2022).

Nota: *posição dos nucleotídeos em relação à sequência *Pasteur Virus* (PV) – M13215 do GenBank <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>.

12.3.3 Comparando os valores de CAI

Outro fragmento de 0,06 gramas de SNC do quiróptero (3257/21) e de um camundongo sadio foram utilizados para extração, reação de transcrição reversa, amplificação da β -actina, sequenciamento e análise das sequências, como descrito anteriormente.

Em posse das sequências de β -actina, os valores de CAI foram calculados, para então, serem utilizados como conjunto de referência de gene altamente expresso.

13 RESULTADOS

13.1 SEQUÊNCIAS PARCIAIS DE QUIRÓPTEROS

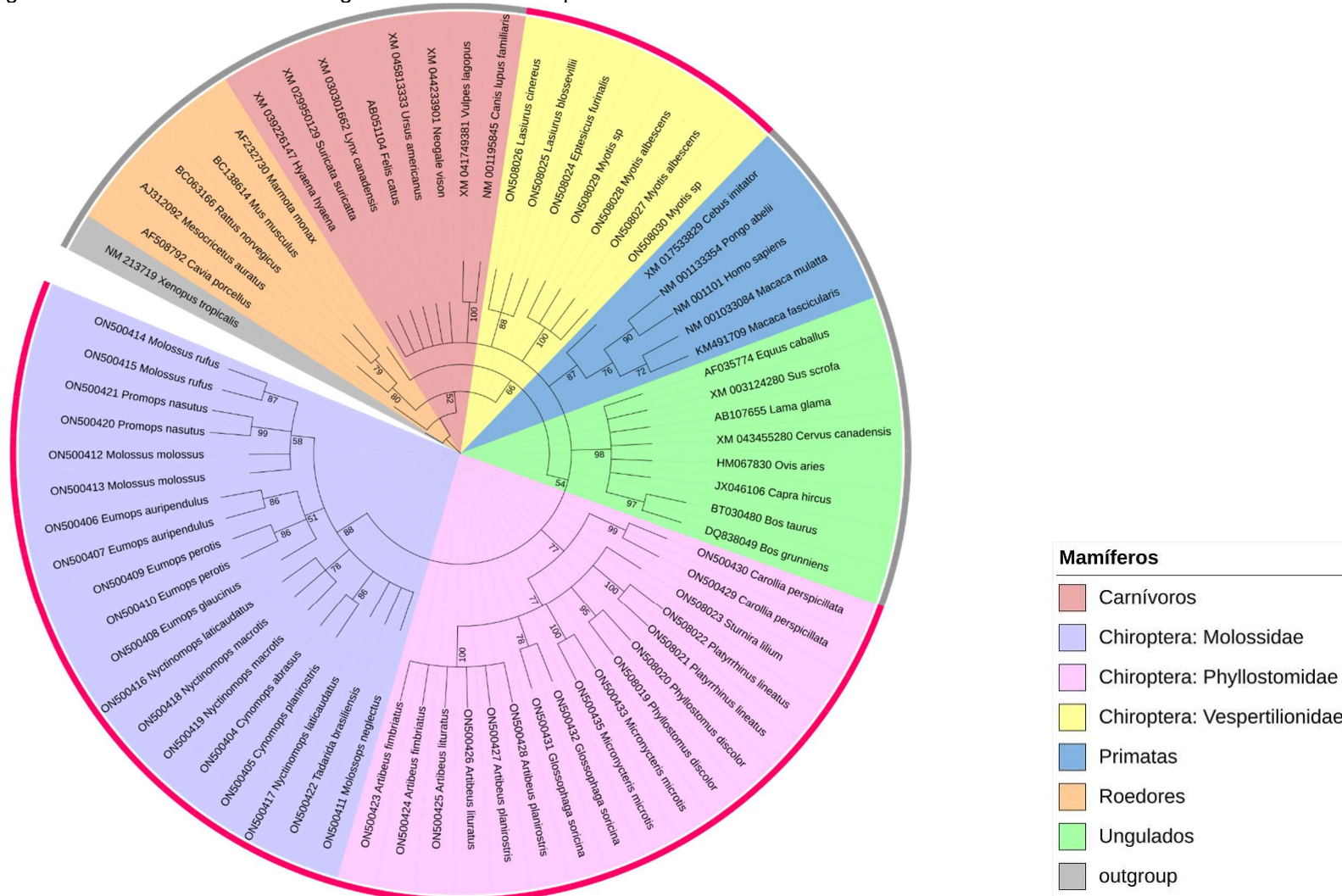
A coleta do SNC dos quirópteros, seguida da extração do RNA total, transcrição reversa, amplificação e sequenciamento parcial da β -actina foram executadas como descrito anteriormente. Após alinhamento e análise das sequências, 43 indivíduos de 26 espécies distintas, foram utilizados na pesquisa. Todas as sequências parciais de β -actina geradas foram depositadas no banco de dados GenBank e encontram-se disponíveis para consulta no site do NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<https://ncbi.nlm.nih.gov/>), como ilustra o apêndice G.

13.1.2 Análise Filogenética

Em posse das sequências geradas e das utilizadas como banco de referência do GenBank, foi possível construir uma árvore de inferência filogenética baseada em β -actina (figura 25). O modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos indicado pelo aplicativo JModelTest, segundo o Critério de Informação de Akaike (AIC), foi o *General Time-Reversible* incorporado com o parâmetro de distribuição gama e proporção de sítios invariáveis (GTR+I+G), sendo: I= 0,5520 e G= 0,4840. Com a finalidade de aplicar uma direção temporal à análise, a árvore foi enraizada na sequência de *Xenopus tropicalis* (NM_213719), utilizada como *outgroup*.

Na representação filogenética da figura 25, é possível notar a formação de sete grupos, segregados conforme classificação de família (Carnivora, Primates, Rodentia, Artiodactyla e Perissodactyla) nas sequências GenBank ou ordem (Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae), no caso dos quirópteros aqui sequenciados.

O *outgroup* está localizado no início da árvore, seguido do clado formado pelos roedores, com diferentes arranjos para porquinho da índia, hamster, ratazana, camundongo e marmota. Em seguida está o grupo dos carnívoros, representado por hiena, suricata, lince, gato doméstico, urso negro e vison americano, separados do ramo que comporta apenas os canídeos (raposa e cão doméstico). Logo ao lado estão as primeiras sequências geradas, do grupo composto pela família Vespertilionidae de quirópteros, divididos em dois ramos terminais, um para *Lasiurus/Eptesicus* e outro para *Myotis*.

Figura 25 - Árvore de inferência filogenética baseada em β -actina

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética baseada em β -actina, utilizando a Máxima Verossimilhança (ML), com 1000 repetições de *bootstrap* e modelo evolutivo GTR+I+G, segundo Critério de Informação Akaike (AIC). As sequências estão identificadas com a espécie do animal e o número de acesso GenBank. Os grupos estão segregados por cor, em que cada uma representa uma ordem específica de mamífero, conforme legenda à direita da figura. Chiroptera está segregado por família. O alo cinza no entorno da representação filogenética representa as sequências retiradas do GenBank, enquanto o alo rosa indica as sequências geradas neste estudo.

Após, estão os representantes dos primatas, com macaco prego em ramo ancestral, seguido de dois ramos terminais, um compartilhado pela espécie humana e orangotango, o outro por macaco rhesus e macaco caranguejeiro. O grupo dos ungulados aparece representado por cavalo, javali, lhama, alce e cabra, separados do ramo terminal que estão boi e iaque.

Por fim, os últimos dois grandes grupos de quirópteros sequenciados neste estudo, em um ramo estão os Vespertilionidae; em outro, os Molossidae, dispostos em diferentes arranjos, de acordo com a espécie dos indivíduos.

13.2 SEQUÊNCIAS DE ISOLADOS DE RABV PARA REFERÊNCIA

A análise contou com as 51 sequências do genoma completo de RABV, isolado de diversos hospedeiros terrestres, indicadas no apêndice F. As sequências foram alinhadas individualmente para cada um dos cinco genes RABV e analisadas comparativamente com a sequência completa (GQ918139) de *Rabies Virus* CVS-11 (*Challenge Virus Standard*), assumida como padrão. Para controle negativo da pesquisa, foi utilizada a sequência completa (MT162447) de VHSV (*Viral hemorrhagic septicemia virus*), o Rhabdovirus responsável por causar septicemia hemorrágica viral em trutas arco íris e outros peixes (PANZARIN *et al.*, 2020).

13.3 ANÁLISE DO USO DE CÓDONS

13.3.1 Conteúdo GC

Os valores médios do conteúdo GC total e local, calculados para todos os isolados analisados, estão no quadro 6 abaixo, de acordo com o gene RABV.

Quadro 6 – Conteúdo GC total e local dos isolados RABV

gene RABV	GC total (%)	GC1s (%)	GC2s (%)	GC3s (%)
N	44,35	47,27	39,19	46,60
P	47,77	54,61	37,31	51,40
M	46,42	48,87	38,59	51,82
G	47,23	48,88	42,09	50,73
L	45,08	45,31	39,80	50,11

Fonte: BARONE (2022).

O valor médio do conteúdo GC total dos isolados aqui avaliados, contemplando o genoma completo RABV, foi de 46,17%, com variação entre 44,35% (gene N) e 47,77 (gene P), com desvio padrão de 1,44. Para o conteúdo GC local na 1ª posição do códon, a média foi de 48,99%, com gene L apresentando o menor valor (45,31%) e gene P, o maior (54,61%), essa foi a posição do códon com mais diferença de valores entre os 5 genes, apresentando o maior desvio padrão (3,47). O conteúdo local na 2ª posição do códon teve variações entre 37,31% para gene P e 42,09% para gene G, com média de 39,4% e menor desvio padrão entre as posições (1,77). Por último, a 3ª posição do códon apresentou média de conteúdo CG de 50,13%, com 46,60% para gene N, 51,82% para gene M e desvio padrão de 2,08.

13.3.2 Índice RSCU

Os valores médios de RSCU calculados para os isolados RABV estão indicados na tabela 4, segregados por aminoácido e seus respectivos códons disponíveis. A média foi calculada entre os cinco genes do vírus.

Tabela 4 – RSCU médio entre os genes RABV

aminoácidos	códons	média RSCU entre os 5 genes RABV	genes
Fenilalanina (F)	TTT	0,938	L
	TTC	1,062	N - P - M - G
Leucina (L)	TTA	0,575	-
	TTG	1,368	N - M - G - L
	CTT	0,941	M - G
	CTC	0,895	P
	CTA	0,883	M
	CTG	1,338	N - P - M - G - L
Isoleucina (I)	ATT	0,819	N
	ATC	1,126	M - G - L
	ATA	1,055	N - P - G - L
Valina (V)	GTT	1,063	N - M - G
	GTC	1,205	N - P - M - L
	GTA	0,621	-
	GTG	1,112	M - G - L
Serina (S)	TCT	1,822	N - P - M - G - L
	TCC	1,051	P - G - L
	TCA	1,357	N - P - M - G - L
	TCG	0,548	-
	AGT	0,664	-

	AGC	0,558	-
Prolina (P)	CCT	1,501	N - P - M - G - L
	CCC	1,033	P - G - L
	CCA	0,915	M - G
	CCG	0,552	-
Treonina (T)	ACT	1,232	N - P - M - L
	ACC	1,299	P - M - G - L
	ACA	1,135	N - M - G - L
	ACG	0,334	-
Alanina (A)	GCT	1,281	N - P - M - L
	GCC	1,059	P - L
	GCA	1,313	N - M - G - L
	GCG	0,347	-
Tirosina (Y)	TAT	1,037	N - P - L
	TAC	0,963	M - G
Histidina (H)	CAT	1,140	N - P - M - G - L
	CAC	0,860	-
Glutamina (Q)	CAA	1,024	N - M - G
	CAG	0,976	P - L
Asparagina (N)	AAT	0,909	N - P
	AAC	1,091	M - G - L
Lisina (K)	AAA	0,920	-
	AAG	1,080	N - P - M - G - L
Aspartato (D)	GAT	1,017	M - G
	GAC	0,983	N - P - L
Glutamato (E)	GAA	0,785	-
	GAG	1,215	N - P - M - G - L
Cisteína (C)	TGT	1,341	N - P - M - G - L
	TGC	0,659	-
Arginina (R)	CGT	0,354	-
	CGC	0,283	-
	CGA	0,557	-
	CGG	0,453	-
	AGA	2,647	N - P - M - G - L
	AGG	1,706	N - P - M - G - L
Glicina (G)	GGT	0,663	-
	GGC	0,687	M
	GGA	1,360	N - P - M - G - L
	GGG	1,290	N - P - M - G - L

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Aminoácidos e seus respectivos códons, com valor médio de RSCU entre os cinco genes RABV, indicando a preferência de códon.

Nota-se que os códons CTG (leucina), TCT/TCA (serina), CCT (prolina), CAT (histidina), AAG (lisina), GAG (glutamato), TGT (cisteína), AGA/AGG (arginina) e GGA/GGG (glicina) foram preferencialmente utilizados por todos os genes RABV, em relação aos outros códons disponíveis para codificação do aminoácido. Ao contrário de TTA (leucina), GTA (valina), TCG/AGT/AGC (serina), CCG (prolina), ACG

(treonina), GCG (alanina), CAC (histidina), AAA (lisina), GAA (glutamato), TGC (cisteína), CGT/CGC/CGA/CGG (arginina) e GGT (glicina), códons preteridos pelo cinco genes RABV. Alguns códons foram preferidos apenas por um dos cinco genes virais, como TTT (fenilalanina) preferencial para o gene L, CTC/CTA (leucina) preferido por P e M, respectivamente, ATT (isoleucina), preferido por N e GGC (glicina), preferencialmente utilizado apenas pelo gene M. Os valores de RSCU dos isolados estão representados em cinco *heatmaps*, um para cada gene viral (figuras 26 a 30), facilitando a visualização individual do uso de códons por RABV, para os diferentes isolados aqui analisados.

Códons conservados, que se mostraram preferenciais por 100% dos isolados, estão identificados em vermelho nos *heatmaps* e ilustrados na tabela 5 abaixo. Apenas o gene P não apresentou códon conservado para todos os isolados, gene N com dois códons conservados, seguido de M e G, com três e quatro, respectivamente, e, por fim, o gene L com maior número de códons conservados (onze), em relação aos cinco genes de RABV.

Tabela 5 – Códons conservados

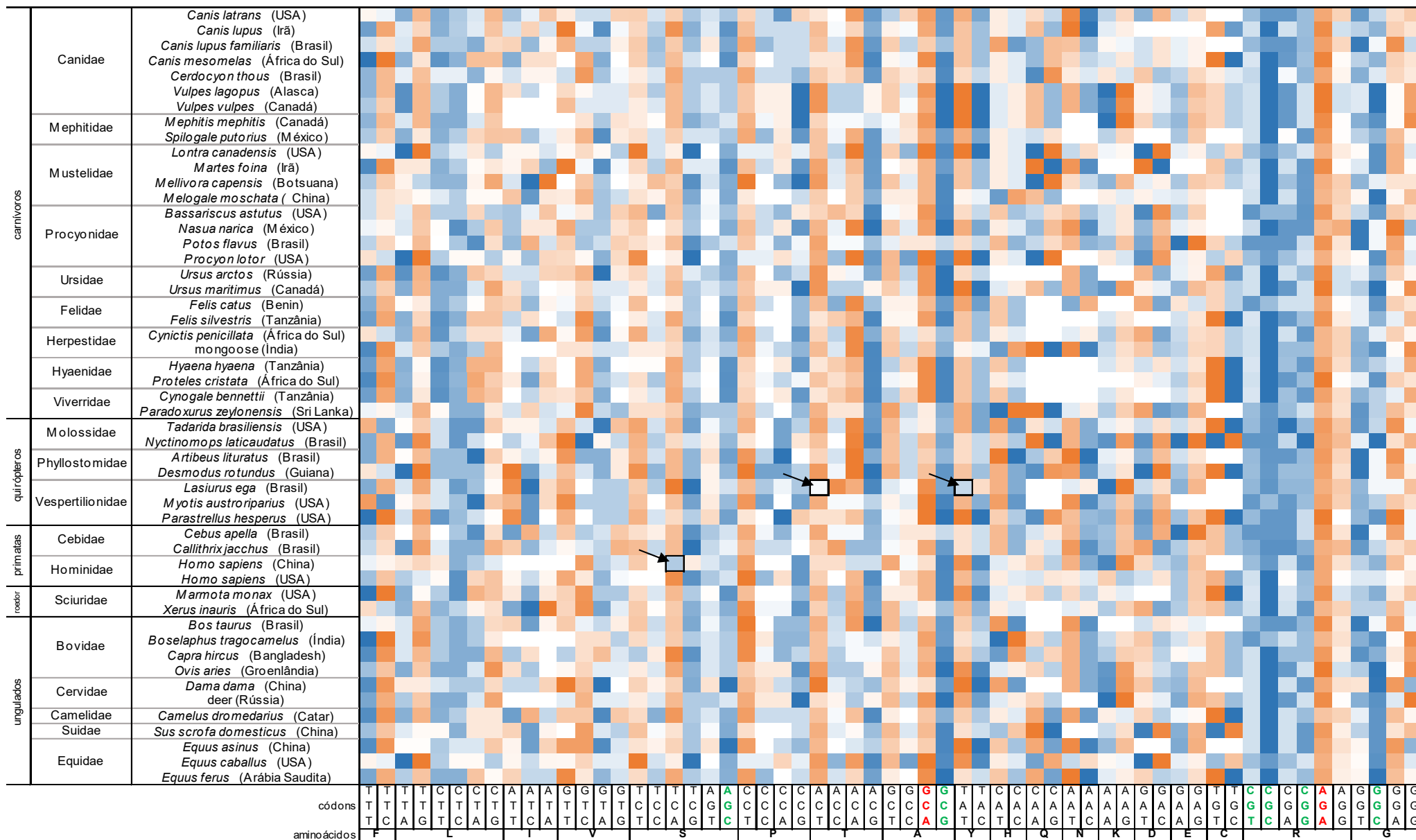
aminoácido	gene N	gene M	gene G	gene L
Leucina (L)	-	-	-	TTG
Serina (S)	-	TCT	-	TCT/TCA
Prolina (P)	-	-	-	CCT
Treonina (T)	-	-	ACC	ACA
Alanina (A)	GCA	-	GCA	GCA
Asparagina (N)	-	-	-	-
Glutamato (E)	-	-	-	GAG
Arginina (R)	AGA	AGA/AGG	AGA	AGA/AGG
Glicina (G)	-	-	GGG	GGA/GGG

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Códons preferencialmente utilizados por todos os isolados, de acordo com o gene.

Em relação aos códons preteridos de uso, que aparecem identificados em verde nos *heatmaps*, nota-se que o códon CGC (arginina) foi o único igualmente preterido por todos os isolados, nos cinco genes RABV. De maneira geral, gene L foi o que apresentou o maior número de códons preteridos, quinze no total, seguido pelo gene G (oito), gene M (sete), gene N (seis) e gene P (cinco).

Figura 26 – Heatmap dos valores de RSCU para o gene N dos isolados RABV e os respectivos hospedeiros originais



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Cada isolado está representado em uma linha, cada coluna representa um códon. Áreas em branco ou azul indicam códons neutros e preteridos, respectivamente; tons mais escuros de azul indicam RSCU próximos de zero. Códon preferido está em laranja e a intensidade do viés é proporcional à intensidade da cor. Códon conservado está identificado em vermelho, os preteridos por todos, em verde. A seta aponta o único isolado com uso de códon divergente dos demais, para determinado aminoácido.

No gene N, destaque para TCA, indicado pela seta preta no *heatmap*, preferido pela maioria dos isolados analisados, com exceção do vírus isolado de *Homo sapiens* (China), que não utilizou esse códon como preferência para tradução de serina, assim como ACT e TAT, preferido por quase todos isolados, exceto pelo quiróptero *Lasiurus ega* (Brasil) para tradução de treonina e tirosina, respectivamente.

Para gene P, o códon ATA apenas não foi preferido pelo isolado *Homo sapiens* (China) para traduzir isoleucina, como também ocorreu com TGT no roedor *Marmota monax* (USA) e AGA no morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Guiana), para tradução de cisteína e arginina, respectivamente. Inversamente ao CGT, preterido em uso por todos os isolados, sendo preferido apenas *Lasiurus ega* (Brasil) para tradução da arginina e TCG, preferido apenas pelo texugo do mel (*Mellivora capensis* - Botswana) para tradução da serina.

Para tradução da cisteína no gene M, somente o quiróptero *Nyctinomops laticaudatus* (Brasil) preferiu usar o códon TGC, quando todos preferiram TGT. Assim como apenas o quiróptero *Parastrellus hesperus* (USA) teve preferência por TTA para codificar leucina, somente o furão (*Melogale moschata* - China) usou ACG com preferência para treonina, a civeta (*Paradoxurus zeylonensis* - Sri Lanka) com preferência por AAT para traduzir asparagina e o isolado do porco (*Sus scrofa domesticus* - China) preferiu GGT para glicina.

No gene G, antílope (*Boselaphus tragocamelus* - Índia) foi o único com preferência por AGC para codificar serina, igualmente ao cão doméstico (*Canis lupus familiaris* - Brasil) e furão (*Melogale moschata* - China), que preferiram CCG para prolina e CGA para arginina, respectivamente.

Com os maiores índices de códons conservados e preteridos por todos os isolados, o gene L apresentou algumas exceções, como CTG que foi considerado códon neutro apenas pelo gambá manchado (*Spilogale putorius* - México), enquanto todos o preferiram para a tradução de leucina. O mesmo ocorreu com ATC no quiróptero *Myotis austroriparius* (USA) e TAT em *Lontra canadensis* (USA), para tradução de isoleucina e tirosina, respectivamente. Enquanto TTA foi preferido apenas por *Lontra canadensis* (USA) e GTA pelo quati (*Nasua narica* - México), para traduzir leucina e valina, respectivamente, nenhum dos outros isolados apresentaram preferência por esses códons.

Finalizando a análise de RSCU, após a conversão dos valores em dados binários, foi gerada uma matriz binária para cada um dos cinco genes RABV,

juntamente com os dados binários de RSCU das sequências de β -actina dos hospedeiros terrestres e dos quirópteros sequenciados neste estudo, resultando em cinco matrizes compostas por 120 sequências de 59 caracteres. Partindo destas matrizes, foram construídas cinco árvores filogenéticas baseadas em RSCU, sendo uma para cada gene RABV, ilustradas nas figuras 31 a 35.

Como o objetivo das árvores de RSCU foi apenas classificar as amostras aqui analisadas, as árvores foram representadas de maneira não enraizada, uma vez que a análise evolutiva não foi o foco desta parte do estudo. Além disso, o comprimento dos ramos foi ignorado nas representações filogenéticas, tendo em vista que não se faz necessário verificar a distância evolutiva das sequências analisadas (VERLI, 2014; CALDART *et al.*, 2016).

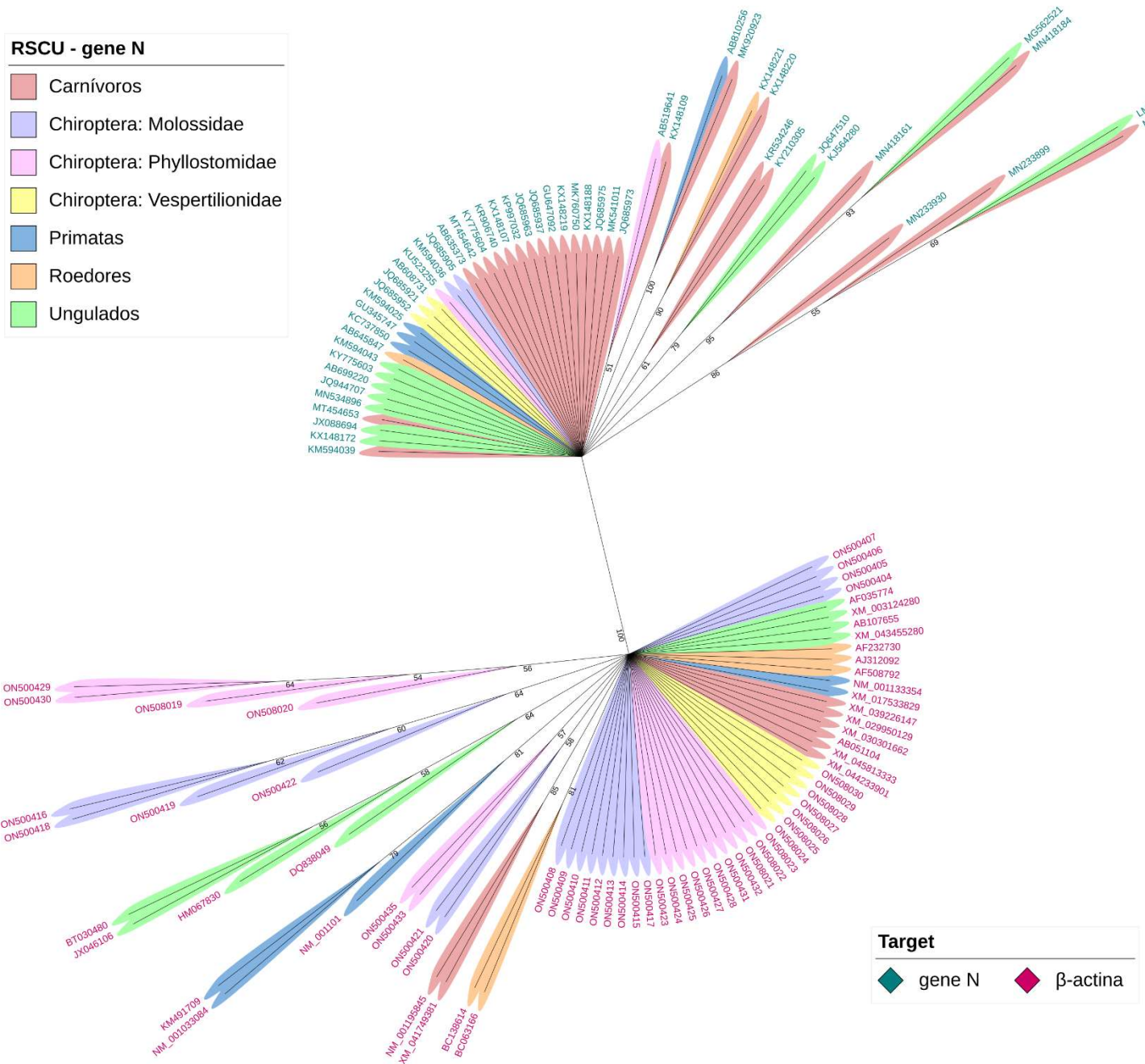
Os grupos de indivíduos foram segregados de acordo com a respectiva ordem de mamíferos (carnívoros, primatas, roedores e ungulados) ou família (Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae), para os morcegos.

As cinco representações filogenéticas segregaram em dois grandes grupos, um com os isolados RABV e outro com as sequências de β -actina, tanto das disponíveis GenBank quanto as de quirópteros geradas na pesquisa. O padrão de distribuição no grande ramo da β -actina ficou muito similar nas cinco árvores. Os isolados RABV tiveram pequenas modificações de arranjos em cada uma das cinco representações, de acordo com a similaridade de suas sequências binárias. A maioria das sequências dos isolados RABV aparecem representadas em ramos distintos, sem mostrar semelhança com os demais isolados.

As sequências dos isolados que aparecem segregadas por ramos, pertencem ao mesmo grupo de mamíferos ou tem semelhança na origem geográfica. No gene N, por exemplo, os ramos com as sequências do morcego *Artibeus lituratus* (AB519641) e do cão doméstico (KX148109), ou de macaco-prego (AB810256) e jupará (MK920923), ambos do Brasil; assim como o isolado de esquilo (KX148221) e suricata (KX148220), da África do Sul e cavalo (MG562521) e guaxinim (MN418184), dos USA ou ainda, ovelha (LM645054) da Groenlândia e urso polar (MN233947) do território Noroeste do Canadá.

Os valores de *bootstrap* para os isolados RABV variaram entre 51 e 100 (genes N/M), 52 e 100 (genes P/G) e 52 e 90 (gene L), para β -actina, variação entre 51 e 90.

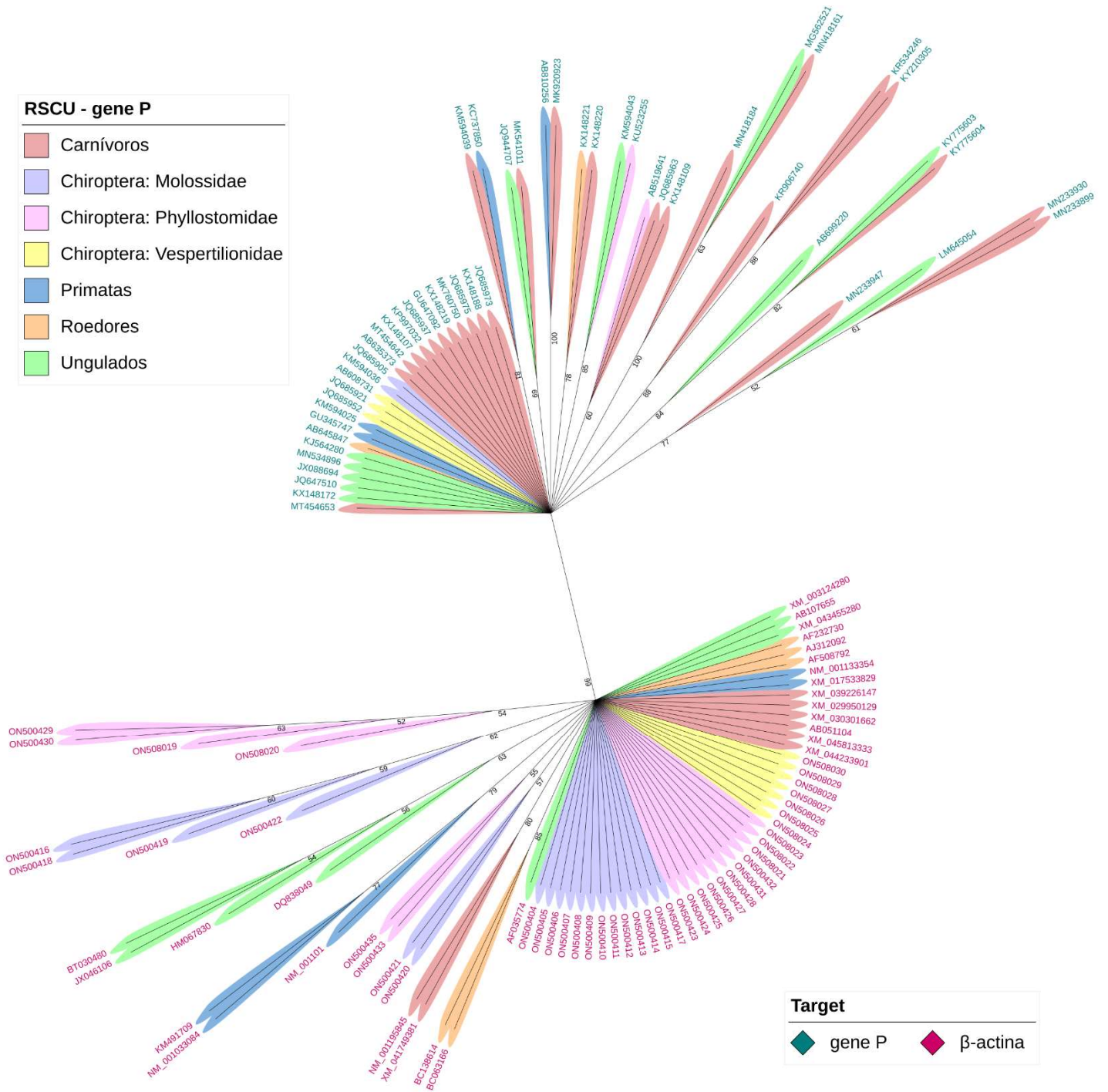
Figura 31 – Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene N)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética de RSCU, a partir do gene N de RABV (localizadas na parte superior da figura, com identificação em verde escuro) e mRNA β-actina (localizadas na parte inferior, com identificação em rosa escuro), usando o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências estão identificadas pelo número de acesso GenBank e segregadas por cor, de acordo com o grupo de mamíferos, conforme legenda à esquerda da figura.

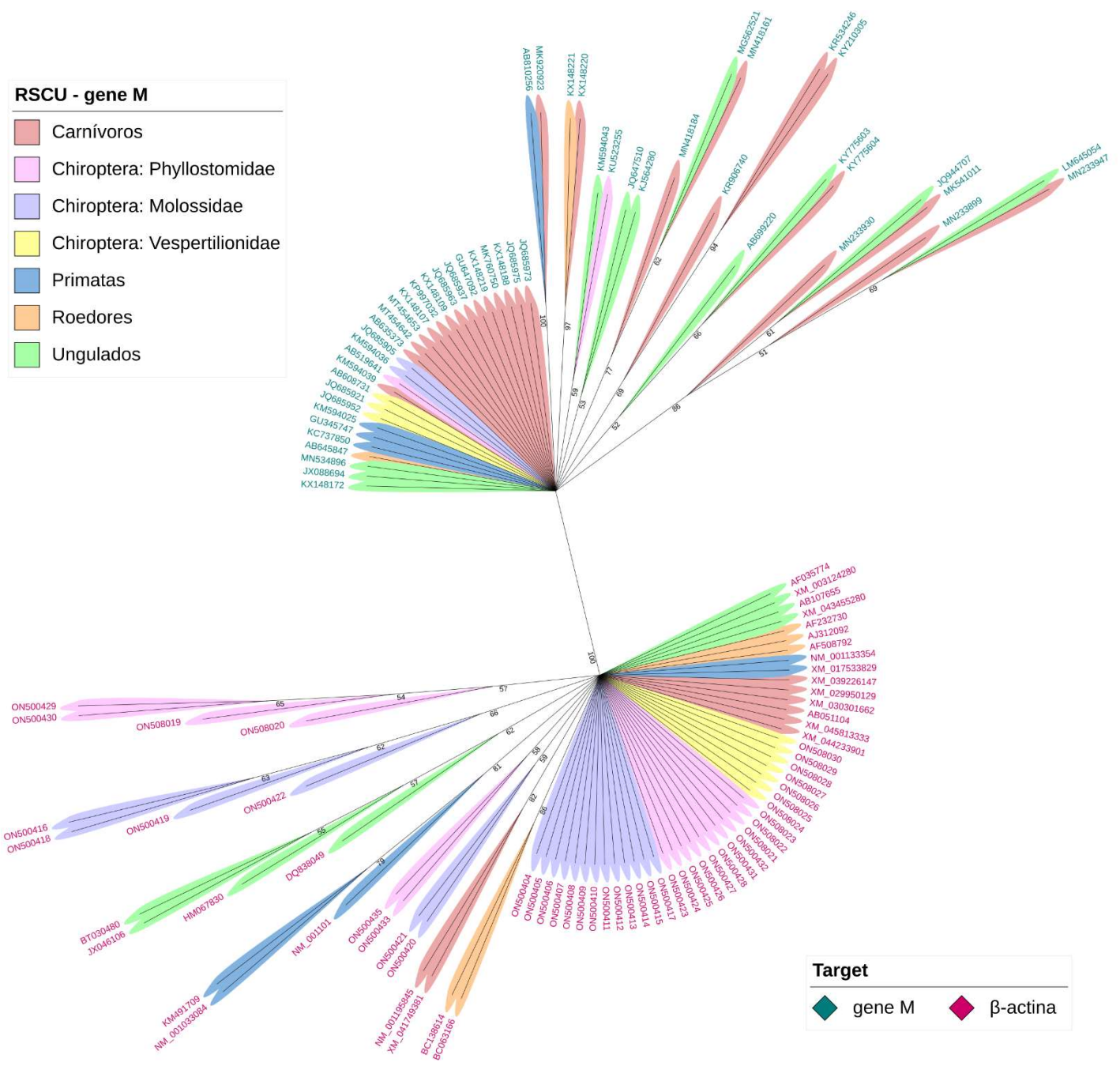
Figura 32 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene P)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética de RSCU, a partir do gene P de RABV (localizadas na parte superior da figura, com identificação em verde escuro) e mRNA de β-actina (localizadas na parte inferior, com identificação em rosa escuro) usando o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências estão identificadas pelo número de acesso GenBank e segregadas por cor, de acordo com o grupo de mamíferos, conforme legenda à esquerda da figura.

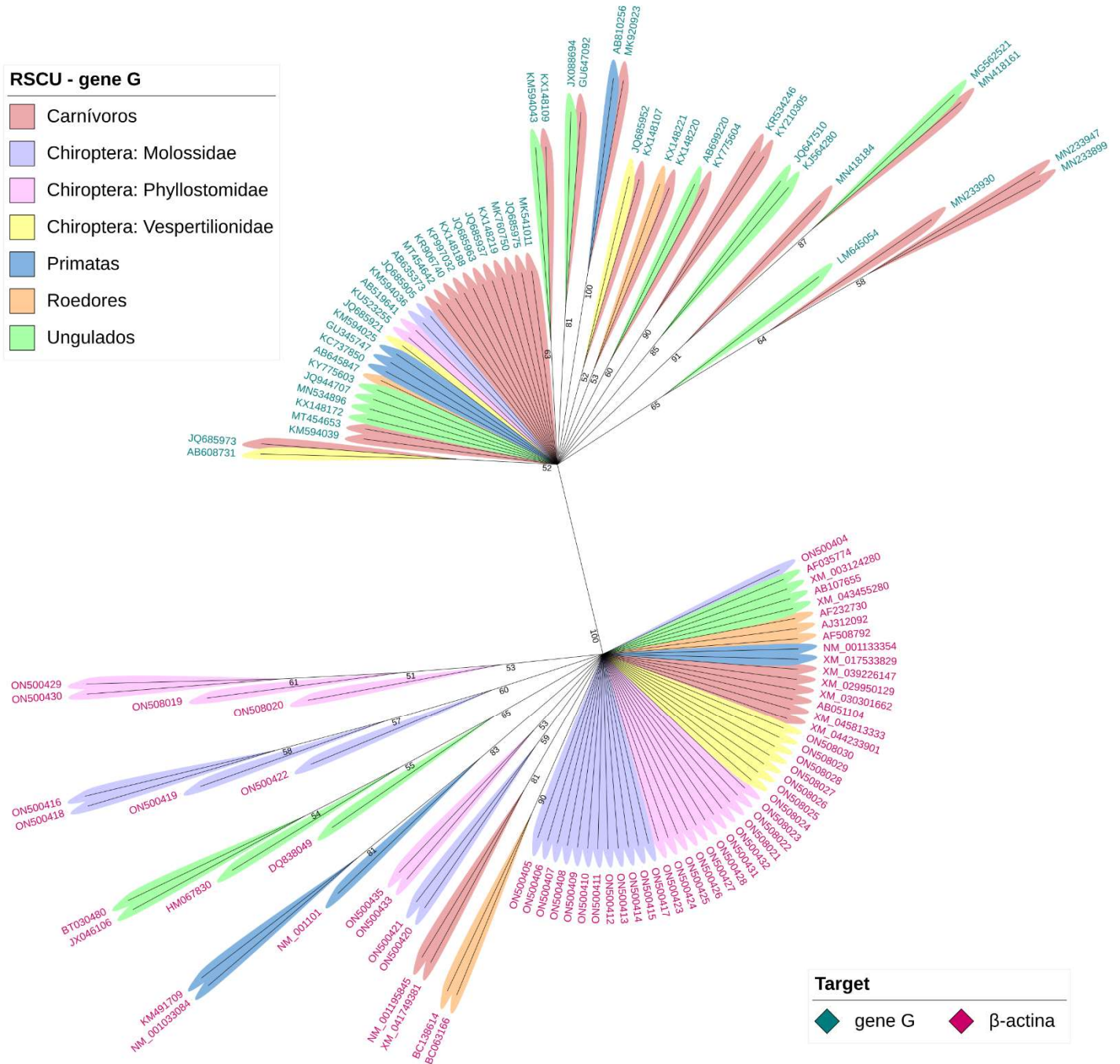
Figura 33 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene M)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética de RSCU, a partir do gene M de RABV (localizadas na parte superior da figura, com identificação em verde escuro) e mRNA de β-actina (localizadas na parte inferior, com identificação em rosa escuro) usando o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências estão identificadas pelo número de acesso GenBank e segregadas por cor, de acordo com o grupo de mamíferos, conforme legenda à esquerda da figura.

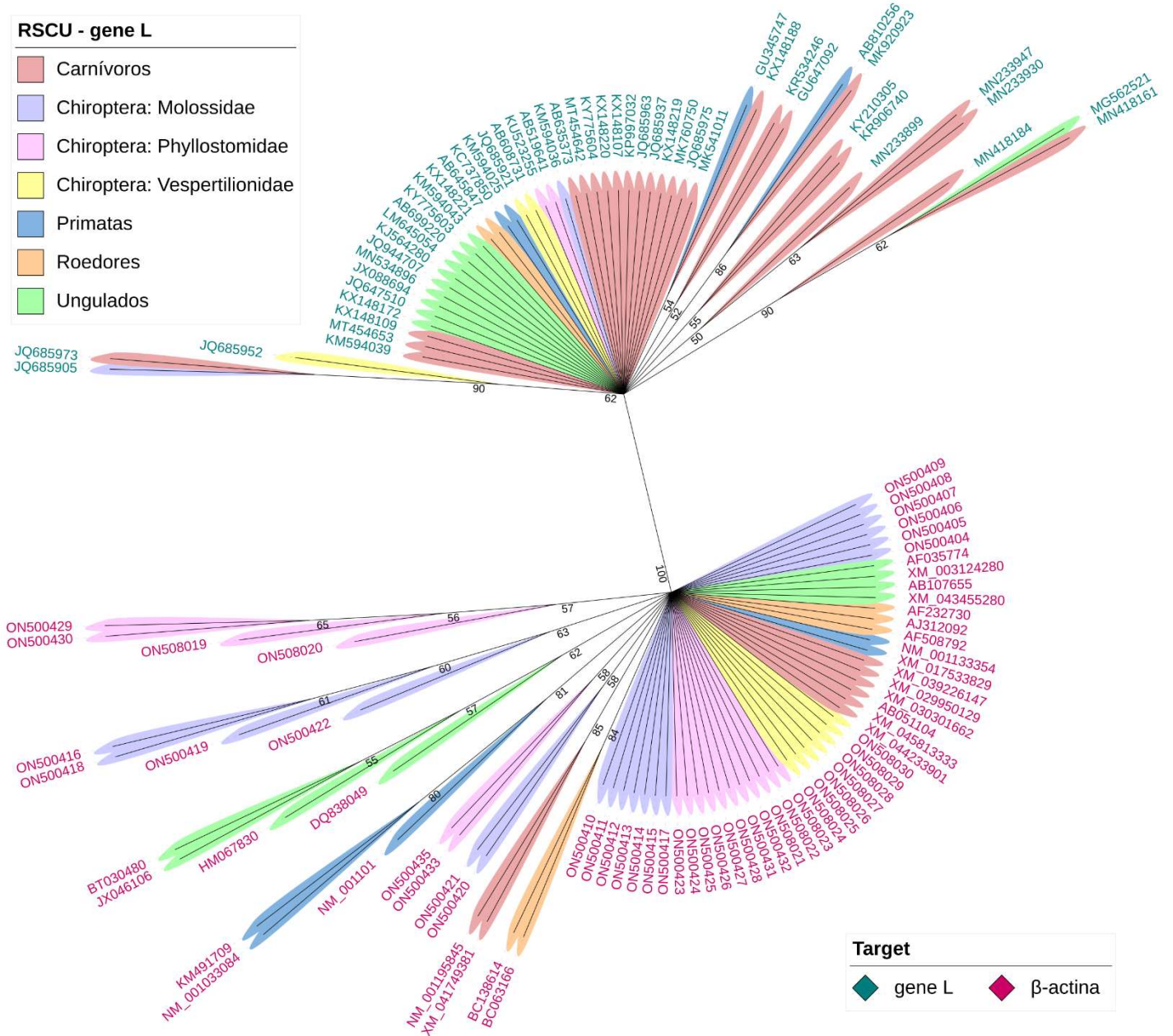
Figura 34 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene G)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética de RSCU, a partir do gene G de RABV (localizadas na parte superior da figura, com identificação em verde escuro) e mRNA de β -actina (localizadas na parte inferior, com identificação em rosa escuro) usando o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências estão identificadas pelo número de acesso GenBank e segregadas por cor, de acordo com o grupo de mamíferos, conforme legenda à esquerda da figura.

Figura 35 - Árvore filogenética de RSCU (isolados - gene L)



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Árvore filogenética de RSCU, a partir do gene L de RABV (localizadas na parte superior da figura, com identificação em verde escuro) e mRNA de β-actina (localizadas na parte inferior da figura, com identificação em rosa escuro) usando o método de distância *Neighbor-Joining* (NJ), com 1000 repetições de bootstrap. As sequências estão identificadas pelo número de acesso GenBank e segregadas por cor, de acordo com o grupo de mamíferos, conforme legenda à esquerda da figura.

13.3.3 Índice Enc

Os valores de Enc obtidos para os cinco genes RABV estão disponíveis no quadro 7 abaixo. O valor médio de Enc entre todos os genes dos isolados analisados, foi de 57,25, variando de 54,09 (isolado JQ685905 - gene M) a 59,74 (isolado GU647092 - gene N), indicando baixo viés de uso de códons por RABV em seus cinco genes.

Quadro 7 – Valores de Enc para os cinco genes RABV

gene RABV	Enc médio	Enc mínimo	Enc máximo	desvio padrão
N	57,53	55,87	59,74	0,90
P	57,05	55,01	58,87	0,77
M	55,95	54,09	57,38	0,71
G	57,30	55,04	59,00	0,83
L	58,41	57,28	59,26	0,48

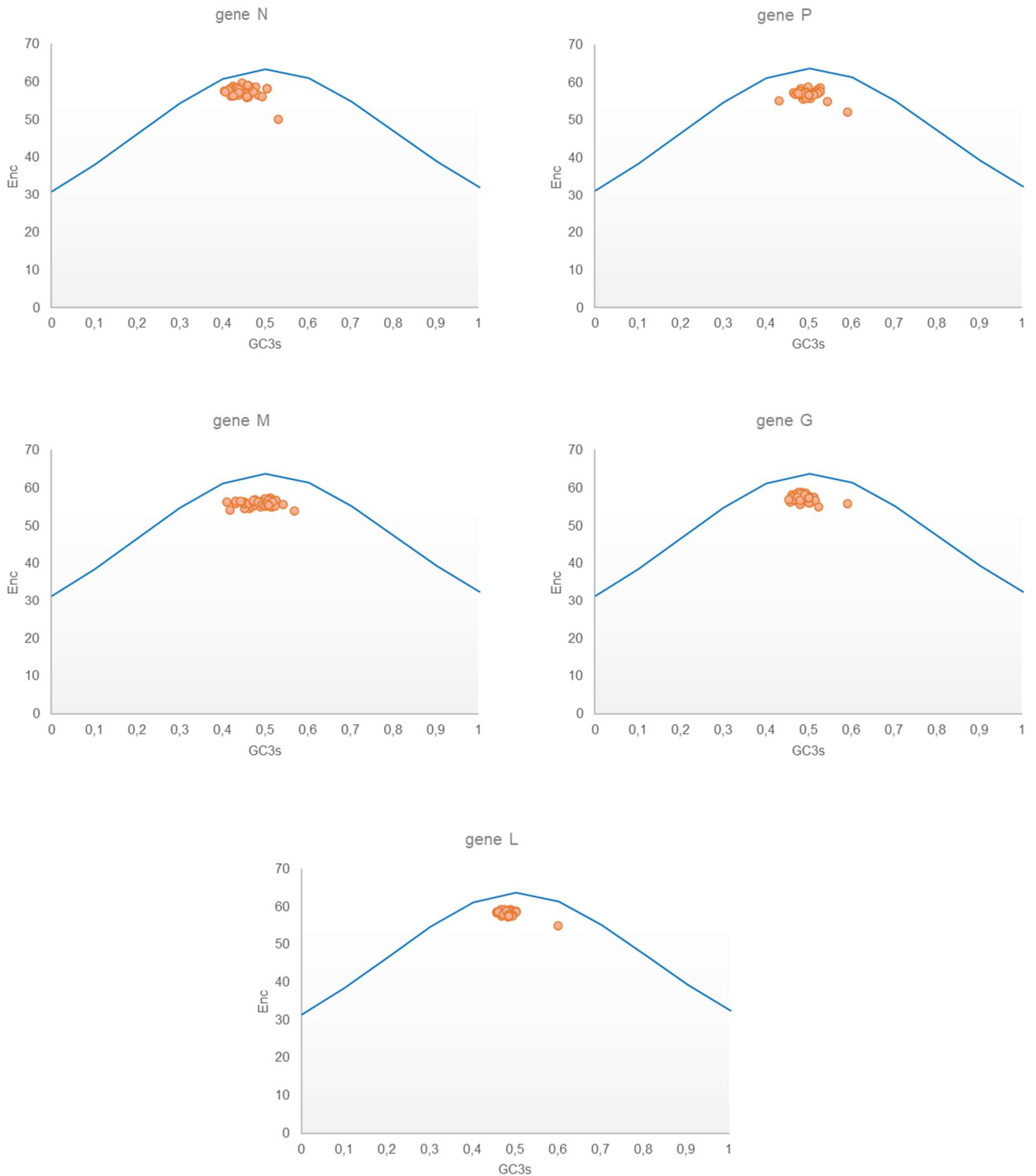
Fonte: BARONE (2022).

Nota: Quadro apresentando valores médio, mínimo e máximo de Enc, com respectivo desvio padrão para cada um dos cinco genes RABV.

Os gráficos apresentados na figura 36 representam o Enc-plot de cada gene RABV, os valores obtidos de Enc quando influenciados apenas pelos valores obtidos de GC na 3ª posição dos códons. Foram construídos com auxílio do *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Analisando os gráficos de Enc-plot, em que os pontos laranja em dispersão representam as amostras dos isolados RABV, é possível notar que eles estão abaixo da curva esperada, em azul, o que indicaria que a seleção natural está atuando no viés de uso de códons.

Figura 36 – Representação gráfica de Enc-plot para os cinco genes RABV



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Gráficos representando os valores observados de Enc em relação ao conteúdo GC na 3ª posição dos códons, para cada gene RABV. Os valores de Enc dos isolados estão identificados pelos pontos laranja em dispersão, a curva normal em azul representa os valores de Enc esperados para cada amostra. O ponto laranja localizado à direita das demais amostras refere-se ao isolado de VHSV, utilizado como controle negativo da pesquisa.

13.3.4 Índice CAI

A função do índice CAI, neste estudo, foi indicar a similaridade de uso de códons sinônimos entre os cinco genes RABV quando comparados ao gene da β -actina, que é altamente expressa em mamíferos, além de inferir sua expressão em cada sistema usado como referência.

Os baixos valores de CAI obtidos, apresentados no quadro 8, mostram similaridade entre todos os isolados RABV, independente do gene viral e do grupo de possíveis hospedeiros ao qual foram comparados (terrestres ou quirópteros).

O teste de Kolmogorov-Smirnov, aplicado no cálculo de e-CAI, apontou valores maiores que o nível de significância estatística ($p < 0,05$), indicando que os dados apresentaram uma distribuição normal entre si.

Quadro 8 - Valores médios de CAI para os cinco genes RABV em comparação com a β -actina

gene RABV	hospedeiros terrestres (GenBank)			quirópteros (sequenciados no estudo)		
	CAI	desvio padrão	e-CAI ($p < 0,05$)	CAI	desvio padrão	e-CAI ($p < 0,05$)
N	0,194	0,010	0,240	0,173	0,011	0,208
P	0,212	0,011	0,260	0,174	0,012	0,204
M	0,222	0,020	0,259	0,182	0,018	0,208
G	0,201	0,011	0,265	0,175	0,012	0,217
L	0,189	0,006	0,246	0,169	0,007	0,197

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Quadro com valores médios de CAI, obtidos para os cinco genes RABV, quando comparados com as sequências de β -actina dos possíveis hospedeiros terrestres (GenBank) e com as sequências de quirópteros geradas neste estudo. Valores de CAI esperado (e-CAI) foram calculados com base no teste de Kolmogorov-Smirnov, como parte do *software CAIcal Server*.

Em segundo momento, as sequências RABV foram usadas em comparação com os conjuntos de referência de uso de códons do *software CAIcal*. Foram encontradas apenas três espécies de quirópteros disponíveis para utilização: *Carollia perspicillata*, *Myotis lucifugus* e *Desmodus rotundus*, também foram utilizados os conjuntos referência disponíveis de *Mus musculus* e *Homo sapiens*.

Os valores obtidos estão dispostos no quadro 9 e mostram que as três espécies de quirópteros, usadas como referência de genes altamente expressos, apresentaram um considerável aumento em seus valores de CAI, em comparação ao uso das sequências geradas da β -actina, como gene de referência. Os valores obtidos para os

conjuntos referência de genes altamente expressos de *Mus musculus* e *Homo sapiens* apresentaram-se com índices ainda maiores em todos os genes RABV.

Quadro 9 - Valores médios de CAI para os cinco genes RABV comparados ao conjunto de referência CAIcal

gene RABV	<i>Carollia perspicillata</i>		<i>Myotis lucifugus</i>		<i>Desmodus rotundus</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Homo sapiens</i>	
	CAI	desvio	CAI	desvio	CAI	desvio	CAI	desvio	CAI	desvio
N	0,416	0,014	0,560	0,012	0,589	0,018	0,742	0,009	0,748	0,010
P	0,449	0,015	0,576	0,016	0,586	0,025	0,746	0,009	0,751	0,010
M	0,466	0,018	0,602	0,025	0,617	0,038	0,756	0,015	0,759	0,015
G	0,422	0,011	0,563	0,020	0,609	0,024	0,738	0,009	0,742	0,008
L	0,437	0,007	0,563	0,007	0,563	0,010	0,745	0,006	0,750	0,005

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Quadro com valores médios de CAI, obtidos para os cinco genes RABV, quando comparados com o conjunto de referência de genes altamente expressos disponíveis no *software CAIcal Server*.

13.3.5 Índice RCDI

Os valores obtidos para o índice RCDI estão detalhados no quadro 10 abaixo e mostram que, tanto os possíveis hospedeiros terrestres aqui analisados, quanto os quirópteros sequenciados, apresentaram altos índices de desotimização de códons (quando RCDI >1).

Quadro 10 – Valores de RCDI para os cinco genes RABV em comparação com a β -actina

gene RABV	hospedeiros terrestres (GenBank)			quirópteros (sequenciados no estudo)		
	RCDI	intervalo	e-RCDI (p<0,05)	RCDI	intervalo	e-RCDI (p<0,05)
N	28,55	18,31 - 39,98	37,91	39,51	13,16 - 51,19	16,52
P	26,08	17,49 - 37,70	34,83	35,96	12,52 - 50,75	16,19
M	26,79	19,35 - 41,92	35,37	35,25	12,64 - 48,38	15,93
G	26,03	17,84 - 37,63	34,86	34,75	12,37 - 45,80	15,05
L	28,96	20,78 - 45,49	38,31	37,10	13,30 - 50,39	16,26

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Quadro com valores de RCDI (mediana), obtidos para os cinco genes RABV, quando comparados com as sequências de β -actina dos possíveis hospedeiros terrestres (GenBank) e com as sequências de quirópteros geradas neste estudo. Valores de RCDI esperado (e-RCDI) foram calculados com base no teste de Kolmogorov-Smirnov, como parte do *software CAIcal Server*.

Entre as espécies utilizadas como referência, a β -actina dos possíveis hospedeiros terrestres, os roedores apresentaram os menores índices de RCDI, enquanto que os ungulados foram os indivíduos com os valores mais altos.

Quando as sequências RABV foram comparadas com os mesmos conjuntos de referência já utilizados no cálculo do índice CAI, os resultados de RCDI obtidos foram inferiores ao das sequências de β -actina, mas, ainda assim, permaneceram elevados (RCDI >1), como indica o quadro 11 a seguir. Os valores obtidos para o conjunto referência de *Mus musculus* e *Homo sapiens* mostraram os menores índices em todos os genes RABV – assim como ocorreu anteriormente, de maneira inversamente proporcional, nos resultados do índice CAI.

Quadro 11 - Valores de RCDI para os cinco genes RABV comparados ao conjunto de referência CAIcal

gene RABV	<i>Carollia perspicillata</i>		<i>Myotis lucifugus</i>		<i>Desmodus rotundus</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Homo sapiens</i>	
	RCDI	e-RCDI	RCDI	e-RCDI	RCDI	e-RCDI	RCDI	e-RCDI	RCDI	e-RCDI
N	3,78	5,05	2,87	3,93	14,24	26,23	1,35	1,49	1,34	1,46
P	2,88	3,89	3,06	4,25	15,13	27,85	1,33	1,46	1,30	1,43
M	3,13	4,27	3,16	4,35	13,00	25,27	1,33	1,46	1,32	1,45
G	3,46	4,72	3,07	4,32	13,04	25,00	1,32	1,45	1,32	1,45
L	3,60	4,91	3,16	4,36	15,10	28,07	1,35	1,49	1,33	1,47

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Quadro com valores de RCDI (mediana), obtidos para os cinco genes RABV, quando comparados com o conjunto de referência de genes altamente expressos disponíveis no *software CAIcal Server*.

Entre as espécies dos conjuntos de referência de genes altamente expressos, *Homo sapiens* e *Mus musculus* se mostraram com índices RCDI próximos de 1 (média entre os genes de 1,32 e 1,34, respectivamente), indicando similaridade entre o uso de códons por RABV e esses hospedeiros. Seguidos pelos quirópteros *Myotis lucifugus* (média de 3,06) e *Carollia perspicillata* (média de 3,37), com valores parecidos. Já o morcego hematófago *Desmodus rotundus* se destacou pelos mais altos índices de RCDI entre todos os conjuntos (média de 14,10).

13.4 ENSAIOS *in vivo*

A quantificação referente à carga viral RABV encontrada no quiróptero (3257/21) e em cada camundongo, das dez passagens realizadas, estão disponíveis na tabela 6, em que também é possível verificar o tempo de incubação do vírus no hospedeiro, até o aparecimento do primeiro sintoma neurológico.

Tabela 6 – Carga viral RABV

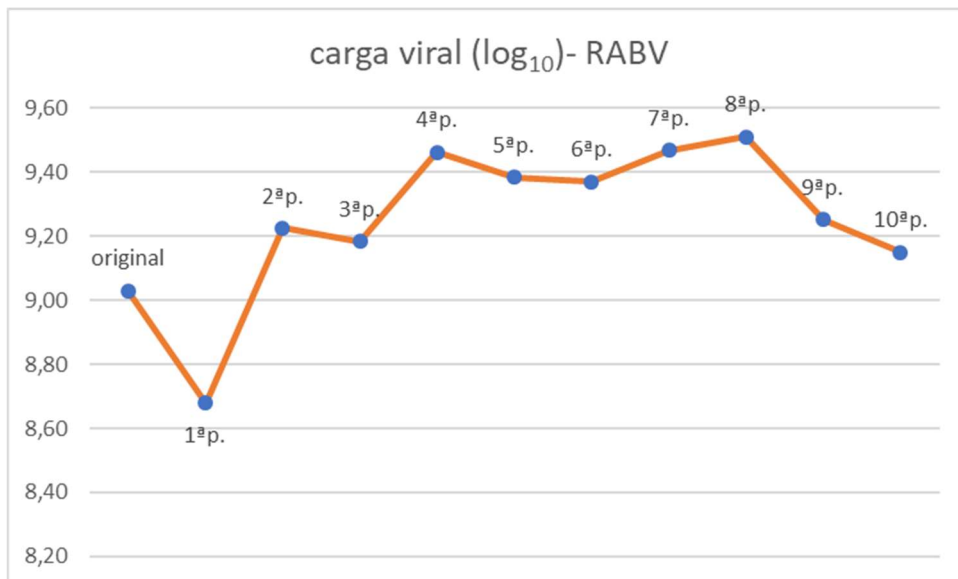
amostra/ nº da passagem	período de incubação	nº de cópias de RNA/mL	log ₁₀
original	-	1.068.128.585,06	9,03
1ª p.	8 dias	477.065.895,28	8,68
2ª p.	6 dias	1.676.284.453,40	9,22
3ª p.	6 dias	1.527.560.517,76	9,18
4ª p.	6 dias	2.888.832.112,91	9,46
5ª p.	6 dias	2.420.684.570,47	9,38
6ª p.	6 dias	2.341.449.115,55	9,37
7ª p.	6 dias	2.927.139.845,02	9,47
8ª p.	6 dias	3.237.841.433,47	9,51
9ª p.	5 dias	1.782.363.652,24	9,25
10ª p.	4 dias	1.408.536.392,92	9,15

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Tabela com a identificação da amostra e sua respectiva carga viral.

Os valores de cópias de RNA viral/mL foram convertidos em logaritmo na base 10, para otimizar a representação gráfica, em que é possível notar queda da carga viral da amostra original de quiróptero para a 1ª passagem em camundongo, seguida de aumento e provável estabilidade viral até a 8ª passagem, em que, aparentemente, há pequena diminuição da carga viral (figura 37). Nota-se que, neste mesmo momento, o período de incubação foi reduzido em 1 e 2 dias, respectivamente na 9ª e 10ª passagens.

Figura 37 – Representação gráfica da carga viral RABV

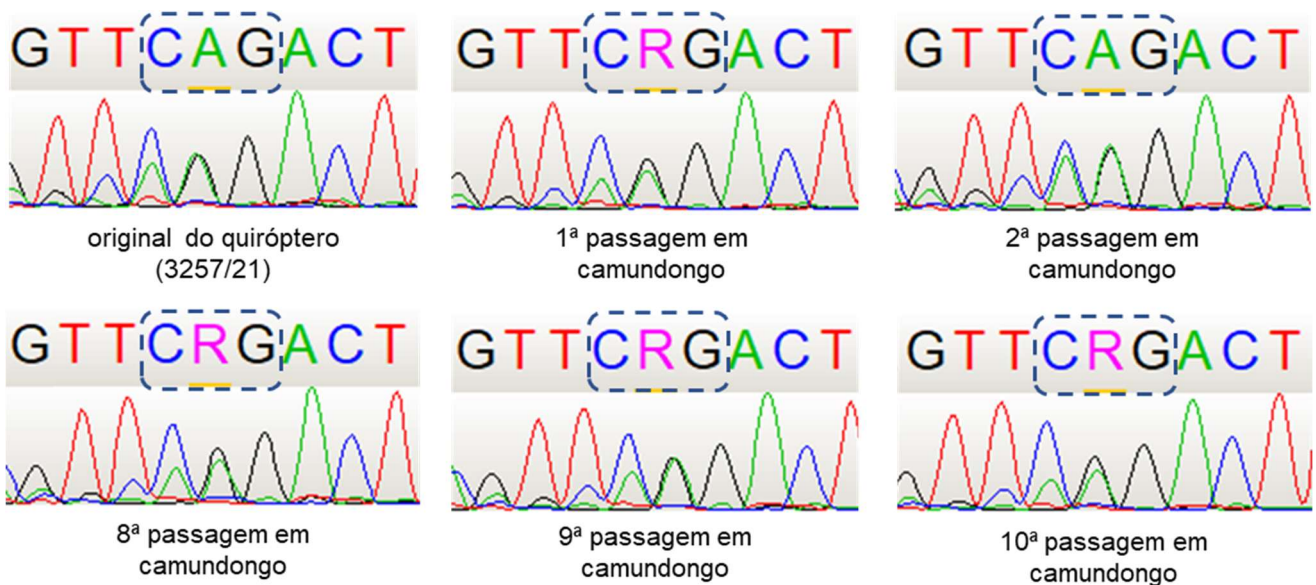


Fonte: BARONE (2022).

Avaliando geneticamente as sequências da amostra original de quiróptero 3257/21 e das passagens em camundongos, não houve mutação no gene N parcial, em todas as passagens o vírus permaneceu como originalmente foi encontrado. No gene G, em que o sequenciamento foi completo já na amostra original do quiróptero 3257/21, é possível notar a presença de dois nucleotídeos na mesma posição (pico duplo), no códon 333.

Apesar do *software* atribuir o nucleotídeo Adenina para esta posição, a presença de ambos os nucleotídeos (Adenina e Guanina) é evidente, desde a amostra original até a 10ª passagem, como mostra a figura 38.

Figura 38 – Eletroferogramas referente ao aminoácido 333 do gene G de RABV



Fonte: BARONE (2022).

Nota: Imagem ilustrativa dos eletroferogramas, evidenciando a presença de dois picos (com os nucleotídeos Adenina e Guanina) na 2ª posição do códon no aminoácido 333 do gene G de RABV, destacado com retângulo pontilhado. O esquema ilustra a amostra original do quiróptero 3257/21, primeiras e últimas passagens em camundongo.

Para a análise do índice CAI, ao qual este experimento *in vivo* foi proposto, foram utilizadas as sequências dos genes N e G de RABV, da amostra original do quiróptero 3257/21 e das passagens em camundongos e, como conjunto de referência de genes altamente expressos, as sequências de β -actina geradas do *Artibeus lituratus* e do camundongo albino suíço foram empregadas.

Os valores encontrados estão dispostos no quadro 12 e mostram total concordância com os valores de CAI vistos anteriormente, quando foram usados os cinco genes RABV de isolados disponíveis no GenBank, em comparação com o conjunto de referência da β -actina das amostras de quirópteros geradas neste estudo, além de sequências da β -actina disponíveis de possíveis hospedeiros terrestres.

Para finalizar a análise, o índice RCDI também foi avaliado nestas sequências RABV e com os mesmos conjuntos de referência da β -actina do *Artibeus lituratus* e do camundongo. Os dados estão incluídos no quadro 12 e mostraram, mais uma vez, que são inversamente proporcionais aos valores de CAI.

Quadro 12 - Valores de CAI e RCDI para os genes N e G de RABV, β -actina como referência

genes RABV	<i>Artibeus lituratus</i>				camundongo albino suíço			
	CAI médio	desvio padrão	RCDI médio	desvio padrão	CAI médio	desvio padrão	RCDI médio	desvio padrão
N	0,169	0,0	13,733	0,0	0,291	0,0	7,543	0,0
G	0,190	0,001	12,419	0,012	0,291	0,001	7,736	0,017

Fonte: BARONE (2022).

Nota: Valores médios de CAI e RCDI, referente à amostra original do quiróptero 3257/21 e dez passagens em camundongos. Obtidos para os genes N e G de RABV, utilizando como conjunto de referência as sequências da β -actina de *Artibeus lituratus* e camundongo albino suíço, geradas neste estudo.

Os valores de CAI para o gene N e referência de β -actina de *Artibeus lituratus* tiveram variação nula (desvio padrão=0,0) entre a amostra original e as dez passagens, sendo que todas apresentaram CAI=0,169. O mesmo ocorreu com os valores de CAI e referência da β -actina de camundongo albino suíço, sem variações entre a amostra original e as passagens (CAI=0,291). Para o gene G, houve mínima variação (desvio padrão=0,001) nos valores de CAI entre a amostra original do quiróptero 3257/21 e as dez passagens: 0,190 - 0,191 e 0,290 - 0,292, respectivamente para *Artibeus lituratus* e camundongo.

Valores de RCDI reproduziram os resultados de CAI, desvio padrão=0,0 nas passagens no gene N e pequena variação para gene G: de 12,399 - 12,428 para *Artibeus lituratus* (desvio padrão=0,012) e 7,721 - 7,755 para camundongo albino suíço (desvio padrão=0,017).

14 DISCUSSÃO

Com base no valor médio do conteúdo CG total dos isolados (46,17%), nota-se que RABV é rico em nucleotídeos A+T em sua composição, fato reconhecido tanto para RABV quanto para os outros *Lyssavirus* (HERSHBERG; PETROV, 2008; HE *et al.*, 2017), exceto para ELBV-1 (ZHANG *et al.*, 2018). Valores semelhantes já foram relatados em pesquisas anteriores envolvendo RABV, como 47,36% encontrado por Morla; Makhija; Kumar (2016) e 45,63% relatados por Zhang *et al.* (2018).

Essa preferência por nucleotídeos A+T também é observada em outros vírus RNA, como o HeV – Hendra vírus (KUMAR *et al.*, 2018a), NiV – Nipah vírus (KHANDIA *et al.*, 2019), HTNV - hantavírus (ATA *et al.*, 2021) e SARS-CoV-2 (HUSSAIN; RASOOL; POTTATHIL, 2021), por exemplo.

Durante a análise dos valores de RSCU, foi possível elencar os 18 códons sinônimos mais utilizados por RABV, sendo a maioria deles terminados em A/T, resultado equivalente ao encontrado por He *et al.*, (2017) e Zhang *et al.* (2018), ao analisarem diferentes isolados do vírus.

Para os isolados analisados neste estudo, os cinco genes que formam o genoma do RABV apresentaram baixo viés de utilização de códons e pouca variação entre eles, concordando com Jenkins e Holmes (2003), o que foi aqui evidenciado pela média de Enc (57,25) assim como os valores de 55,94, 56,33 e 53,84, encontrados por Morla; Makhija; Kumar (2016), He *et al.*, (2017) e Zhang *et al.* (2018), respectivamente.

O baixo viés também é observado em outros vírus RNA, como exemplo do EBOV (Ebola vírus), H5N1 (influenza A aviária), HeV, HTNV, NiV, PAstVs (astrovírus porcino), SARS-CoV-2, WNV (febre do Nilo Ocidental) e ZIKV (Zika vírus) (MORATORIO *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2018a; KHANDIA *et al.*, 2019; WU, *et al.*, 2020; ATA *et al.*, 2021; HUSSAIN; RASOOL; POTTATHIL, 2021; NAMBOU; ANAKPA; TONG, 2022), sendo essa uma característica bastante conhecida de RABV, considerado o representante com menor viés de uso de códons entre os *Lyssavirus*, segundo Zhang *et al.* (2018).

Geralmente os vírus que possuem número reduzido de hospedeiros tem viés mais forte que os vírus com maior diversidade de hospedeiros (TIAN *et al.*, 2018). O baixo viés de RABV pode auxiliar o vírus a transpor os mecanismos de defesa do

hospedeiro, diminuindo as barreiras que impediriam sua replicação, permitindo uma infecção bem-sucedida (ZHANG *et al.*, 2018).

Ao analisar os gráficos de Enc-plot, ficou evidente que todos os isolados RABV aparecem abaixo da curva esperada para os cinco genes, e, assim como indicado anteriormente por Chen (2013); Morla; Makhija e Kumar (2016); He *et al.*, (2017) e Zhang *et al.*, (2018), torna-se possível inferir que o viés de uso de códons por RABV permanece sob influência da seleção natural.

Os baixos valores de CAI obtidos para os isolados RABV aqui analisados podem indicar, em primeiro momento, um baixo *fitness* viral em relação aos códons dos possíveis hospedeiros utilizados como conjuntos de referência (β -actina de terrestres GenBank e β -actina dos quirópteros sequenciados). Ao comparar os mesmos isolados RABV com outros conjuntos de referência, observou-se um aumento significativo nos valores CAI, principalmente para as referências de *Mus musculus* e *Homo sapiens*. Estes resultados, quando nos referimos aos quirópteros, poderiam justificar o maior tempo de incubação de RABV nesses animais – de até 180 dias, segundo Davis, Dupuis e Rudd (2012), quando comparado aos cães e humanos, onde o vírus permanece em incubação entre 1 e 2 meses (CHARLTON *et al.*, 1997) ou aos camundongos, que possuem um período de incubação reduzido para até 30 dias (BELL; MOORE, 1974; BAER *et al.*, 1977).

Um menor valor de CAI indica menor expressão dos genes virais e, por consequência, menor virulência e resposta imune. Com isso, os resultados de CAI obtidos neste estudo poderiam sugerir menor adaptação do RABV aos quirópteros, quando comparados aos humanos e camundongos, por exemplo, o que seria contraditório, tendo em vista que os morcegos são reservatórios de RABV, além de outros vírus zoonóticos (FUMAGALLI; ZAPPER; LA PORTA, 2021).

Entretanto, Khandia *et al.* (2019) observaram o mesmo resultado em experimentos com Nipah vírus, quando compararam seu hospedeiro modelo (*ferret*) a outros hospedeiros. Resultado igualmente obtido por Furió *et al.*, (2012), em experimentos como o VSV (vírus da estomatite vesicular) – um Rhabdoviridae da mesma subfamília onde RABV está inserido (Alpharhabdovirinae).

Portanto, os baixos valores de CAI obtidos neste estudo concordam com o exposto por Kumar *et al.* (2018a) ao concluírem que menores índices de CAI em hospedeiros reservatórios podem ser resultado da baixa replicação viral nesses hospedeiros.

Esse resultado foi corroborado pelos elevados índices RCDI encontrados para as sequências de β -actina dos quirópteros (média de 37,10 entre os cinco genes) e baixos índices para as referências de *Mus musculus* (1,34) e *Homo sapiens* (1,32), sugerindo que nos quirópteros, a expressão de RABV possa ocorrer em fase de incubação viral (PUIGBÒ; ARAGONES; GARCIA-VALLVÉ, 2010; KUMAR *et al.*, 2018a; KHANDIA *et al.*, 2019). Caso semelhante foi divulgado por Nasrullah *et al.* em 2015, ao observar que MARV (Marburg vírus) demonstrou maior adaptação em seu hospedeiro terminal (*Homo sapiens*) em comparação ao seu reservatório natural, o morcego egípcio (*Rousettus aegyptiacus*).

Baixa replicação viral ou expressão em fase de latência podem levar a um padrão alternativo de uso de códons, até que o vírus possa se estabelecer com sucesso no hospedeiro (KUMAR *et al.*, 2018a). Uma replicação viral acentuada seria capaz de aumentar o sucesso de invasão ao SNC do hospedeiro, resultando em resposta do sistema imunológico e provável eliminação do vírus (MARSTON *et al.*, 2018). Respostas clínicas graves são desastrosas para a sobrevivência viral, portanto, a manutenção de baixa taxa de replicação em um hospedeiro bem adaptado pode ser uma estratégia evolutiva para escapar do sistema de defesa hospedeiro (HUSSAIN; RASOOL; POTTATHIL, 2021).

Considerando que a coevolução dos *Lyssavirus* com os quirópteros definiu o RABV como o conhecemos hoje (MARSTON *et al.*, 2018) e tomando por base a afirmação de Tian *et al.*, (2018) de que a extensão do viés de uso de códons afeta diretamente a sobrevivência e o *fitness* viral e que ambos precisam coevoluir para que o vírus possa se replicar de maneira eficiente, é possível inferir que as diferenças de utilização de códons possam explicar o fato de RABV apresentar-se fatal para humanos, domésticos e outros mamíferos, mas nem sempre em morcegos (HOLMES *et al.*, 2002).

É possível que estes menores índices de adaptação de códons do RABV aos quirópteros sejam resultado do longo processo de coevolução entre eles, concordando com Luo *et al.*, (2018), ao apontar que os vírus emergentes têm menores índices de adaptação em seus hospedeiros reservatórios, em comparação aos hospedeiros terminais, sendo um facilitador para a circulação viral a longo prazo e para a coexistência dos vírus e seus reservatórios.

Assim, não se comprova a hipótese de que padrões de utilização de códons podem explicar variações na virulência de linhagens de RABV entre quirópteros e mamíferos terrestres.

Deve-se ressaltar que o viés de utilização de códons é apenas uma das diversas unidades de seleção que devem ser levadas em consideração em estudos de coevolução vírus-hospedeiros. Estudos sob o ponto de vista de Biologia de Sistemas que associem este tipo de análise aquelas baseadas em, por exemplo, afinidade por diferentes receptores, proteômica viral e celular durante a infecção em diversos hospedeiros, resposta imune celular e humoral e a cinética de replicação viral em diferentes tipos celulares, são essenciais para um entendimento mais acurado dos modos de evolução do RABV.

15 CONCLUSÕES

15.1 A diversidade nos padrões de uso de códons por RABV é influenciada pela coevolução entre vírus e hospedeiros, principalmente os quirópteros.

15.2 Diferenças de adaptação de códons de RABV em quirópteros e camundongos, quando medidas em relação ao gene da β -actina, não explicam completamente as diferenças de virulência entres estes animais.

15.3 A seleção natural molda o viés de uso de códons de RABV.

REFERÊNCIAS

AFELT, A. *et al.* Bats, bat-borne viruses, and environmental changes. In: Heimo Mikkola (ed.), **Bats**. Chapter 8. p.113-132, 2018.

ALCALA, N. *et al.* Host shift and cospeciation rate estimation from co-phylogenies. **Ecology Letters**, 20: 1014-1024, 2017.

ATA, G. *et al.* Edging on Mutational Bias, Induced Natural Selection From Host and Natural Reservoirs Predominates Codon Usage Evolution in Hantaan Virus. **Front. Microbiol.** 12:699788, 2021.

AVISE, J. C. *et al.* Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Ann. Rev. Ecol. Sys**, 18:489-522, 1987.

AVISE, J. C. Phylogeography: Retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, 36, 3-15, 2009.

BADRANE, H.; TORDO, N. Host Switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. **Journal of Virology**. V.75:17, 2001.

BAER, G. M. *et al.* Characteristics of 11 Rabies Virus Isolates in Mice: Titers and Relative Invasiveness of Virus, Incubation Period of Infection, and Survival of Mice with Sequelae. **The Journal of Infectious Diseases**. v.136, n.3, p.336-345, 1977.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL A. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. **Mol. Biol. Evol.** 16(1):37-48, 1999.

BARTLETT, S. N.; Mc DONOUGH, M. M.; AMMERMAN, L. K. Molecular systematics of bonneted bats (Molossidae: *Eumops*) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Journal of Mammalogy**, 94(4):867–880, 2013.

BATISTA, H. B. C. R.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. Raiva: uma breve revisão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 125-144, 2007.

BELL, J. F.; MOORE, G. J. Effects of High Ambient Temperature on Various Stages of Rabies Virus Infection in Mice. **Infection and Immunity**. v.10, n. 3, p.510-515, 1974.

BEHURA, S. K.; SEVERSON, D. W. Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. **Biological Reviews**, 88, pp. 49-61, 2013.

- BEST, T. L. *et al.* *Eumops auripendulus*. **Mammalian Species**, n.708, pp 1-5, 2002.
- BRADLEY, R.; BAKER, R. J. A test of the genetic species concept: cytochrome-b sequences and mammals. **Journal of Mammalogy**, 82(4):960-973, 2001.
- BRANDÃO, P. E. Avian coronavirus spike glycoprotein ectodomain shows a low codon adaptation to *Gallus gallus* with virus-exclusive codons in strategic amino acids positions. **Journal of Molecular Evolution**, v. 75, n1-2, p. 19-24, 2012.
- BRANDÃO, P. E. The evolution of codon usage in structural and non-structural viral genes: The case of *Avian coronavirus* and its natural host *Gallus gallus*. **Virus Research**, 178, 264-271, 2013.
- BROOK, C. E.; DOBSON, A. P. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends in Microbiology**, v.23, n.3, p.172-180, 2015.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.
- CALDART, E. T. *et al.* Análise filogenética: conceitos básicos e suas utilizações como ferramenta para virologia e epidemiologia molecular. **Acta Scientiae Veterinariae**, 44: 1392, 2016.
- CARINI, A. Sur une grande epizootie de rage. **Annales de l'Institut Pasteur**. V.25, p.843-846, 1911.
- CARNIELI Jr, P. *et al.* Identification of Different Species of Mammals Involved in Zoonoses as Reservoirs or Hosts by Sequencing of the Mitochondrial DNA Cytochrome B Gene. **Annual Research & Review in Biology** 10(1): 1-8, 2016.
- CHARLTON, K. M. *et al.* The long incubation period in rabies: delayed progression of infection in muscle at the site of exposure. **Acta Neuro pathol.** 94:73-77, 1997.
- CHEN, Y. A comparison of synonymous codon usage bias patterns in DNA and RNA virus genomes: Quantifying the relative importance of mutational pressure and natural selection. **BioMed Research International**. V.2013, 2013.
- CLARE, E. L. *et al.* DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**, 7, 184–190, 2007.
- CLARE, E. L. Cryptic Species? Patterns of Maternal and Paternal Gene Flow in Eight Neotropical Bats. **PLoS ONE** 6 (7), 2011.

CLARE, E. L. *et al.* Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. **PloS ONE** 6 (7), 2011.

CRUZ-SALAZAR, B.; *et al.* Genetic Diversity of Tropical Bats and Its Relationship with Ecological Role in a Tropical Semievergreen Rain Forest in El Ocote Biosphere Reserve, Chiapas, Mexico. **Tropical Conservation Science**, v.11:1-21, 2018.

DARRIBA, D. *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat Methods**, 9, 772, 2012.

DAVIS, A. D.; DUPUIS, M.; RUDD, R. J. Extended Incubation Period of Rabies Virus in a Captive Big Brown Bat (*Eptesicus fuscus*). **Journal of Wildlife Diseases**. 48(2), p. 508-511, 2012.

DAVIS, B. M.; RALL, G. F.; SCHNELL, M. J. Everything you always wanted to know about Rabies Virus (but were afraid to ask). **Annu. Rev. Virol.**, 2(1) p.451-471, 2015.

DING, N. Z. *et al.* A permanent host shift of rabies virus from Chiroptera to Carnivora associated with recombination. **Scientific Reports**, 7:289, 2017.

DITCHFIELD, A. D. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**, 9, 1307–1318, 2000.

DORIC, S.; BILELA, L. L. Comparison of codon usage in mitochondrial genomes of *Rhinolophid* and *Hipposiderid* bats. **The 5th International Symposium on Sustainable Development**, p.39-45, 2014.

DUTTA, R.; BURAGOHAJ, L.; BORAH, P. Analysis of codon usage of severe acute respiratory syndrome corona virus 2 (SARS-CoV-2) and its adaptability in dog. **Virus Research**, 288, 2020.

FISHER, C.; STREICKER, D. G.; SCHNELL, M. J. The spread and evolution of rabies virus: conquering new frontiers. **Nature Reviews**, 16. P.241-255, 2018.

FISHER, C. R. *et al.* *Lyssavirus* vaccine with a chimeric glycoprotein protects across phylogroups. **Cell Reports**, v. 32, n. 3, 2020.

FOLMER, O. *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**. 3(5), 294-299, 1994.

FUGLSANG, A. The ‘effective number of codons’ revisited. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 317, 957-964, 2004.

FUGLSANG, A. Impact of bias discrepancy and amino acid usage on estimates of the effective number of codons used in a gene, and a test for selection on codon usage. **Gene**. 410, p. 82-88, 2008.

FUMAGALLI, M. R.; ZAPPERI, S.; LA PORTA, C. A. M. Role of body temperature variations in bat immune response to viral infections. **J. R. Soc. Interface** 18: 20210211, 2021.

FURIÓ, V. *et al.* Relationship between within-Host Fitness and Virulence in the Vesicular Stomatitis Virus: Correlation with Partial Decoupling. **Journal of Virology**. v.86, n.22, 2012.

GARDNER, A. L. Mammals of South America: marsupials, xenarthrans, shrews and bats. **The University of Chicago Press**, Chicago, 2007

GREEN, A. L.; CARPENTER, L. R.; DUNN, J. R. Rabies Epidemiology, Risk Assessment, and Pre and Post Exposure Vaccination. **Vet Clin Exot Anim** 14, 507-518, 2011.

GREGORIN, R. *et al.* A new species of *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from southeastern Brazil and Bolivia. **Mammalian Biology**, 81, 235–246, 2016.

GUPTA, P. *et al.* Bats and viruses: a death-defying friendship. **VirusDis.**, 32(3):467–479, 2021.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 41, p. 95-98, 1999.

HE, W. *et al.* Codon usage bias in the N gene of rabies virus. **Infection, Genetics and Evolution**, 54, 458–465, 2017.

HE, Z.; GAN, H.; LIANG, X. Analysis of Synonymous Codon Usage Bias in Potato Virus M and Its Adaption to Hosts. **Viruses**, 11, 752, 2019.

HEBERT, P. D. N. *et al.* Biological identifications through DNA barcodes. **Proc. R. Soc. Lond. B**. 270, 313–321, 2003.

HEPPERLE, D. **DNA Dragon** 1.9.1 – DNA Sequence Contig Assembler Software. <www.dna-dragon.com>, 2011. Acesso em 06 de setembro de 2022.

HERSHBERG, R.; PETROV, D. A. Selection on Codon Bias. **Annual Review of Genetics**, 42:287-99, 2008.

HOLMES, E.C. *et al.* Genetic constraints and the adaptive evolution of rabies virus in nature. **Virology**, 292, 247-257, 2002.

HUSSAIN, S.; RASOOL, S.T.; POTTATHIL S. The Evolution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 during Pandemic and Adaptation to the Host. **Journal of Molecular Evolution**, 89, 341–356, 2021.

JENKINS, G. M.; HOLMES, E. C. The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. **Virus Research**, 92 1/7, 2003.

JIANG, J. J. *et al.* The complete mitochondrial genome of insect-eating brandt's bat, *Myotis brandtii* (*Myotis*, Vespertilionidae). **Mitochondrial DNA Part A**, 27 (2): 1403-1404, 2016.

KHANDIA, R. *et al.* Analysis of Nipah Virus codon usage and adaptation to hosts. **Frontiers in Microbiology**, 10:886, 2019.

KIBBE, W. A. OligoCalc: an on-line oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.43-46, 2007.

KORSTIAN, J. M. *et al.* Using DNA barcoding to improve bat carcass identification at wind farms in the United States. **Conservation Genet Resour** 8, 27–34, 2016.

KUMAR, N. *et al.*, Evolution of Codon Usage Bias in Henipaviruses Is Governed by Natural Selection and Is Host-Specific. **Viruses**, 10 (11), 604, 2018a.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol. Biol. Evol.** 35(6):1547–1549, 2018b.

KUZMIN, I. V. *et al.* Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. **Emerging Health Threats Journal**, 4:1, 7159, 2011.

KUZMIN, I. V. *et al.* Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. **Plos Pathogens**, 8:6, 2012.

LARSEN, R. J. *et al.* Genetic Diversity of Neotropical *Myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) with na Emphasis on South American Species. **PloS ONE** 7(10), 2012.

LEE, S. *et al.* Relative codon adaptation index, a sensitive measure of codon usage bias. **Evolutionary Bioinformatics**. v. 6, p. 47-55, 2010.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 49, 2021.

LONGDON, B. *et al.* The evolution and genetics of virus host shifts. **PloS Pathog.**, 10 (11), 2014.

LONGDON, B. *et al.* The causes and consequences of changes in virulence following pathogen host shifts. **PloS Pathogens**, 11 (3), 2015.

LÓPEZ-BAUCELLS, A. *et al.* Molecular, morphological and acoustic identification of *Eumops maurus* and *Eumops hansae* (Chiroptera: Molossidae) with new reports from Central Amazonia. **Tropical Zoology**, v.31, n.1, 1-20, 2018.

LUIS, A. D. *et al.* A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? **Proceedings of the Royal Society B**, 280, 2013.

LUO, W. *et al.*, Host Adaptation and Evolutionary Analysis of Zaire ebolavirus: Insights from Codon Usage Based Investigations. **Front. Microbiol.** 11:570131, 2020.

MARSTON, D. A. *et al.* The *Lyssavirus* host-specificity conundrum – rabies virus – the exception not the rule. **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 68-73, 2018.

MARTINS, F. M. *et al.* Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **J Zool Syst Evol Res**, 45(4), 372–378, 2007.

MEDINA, C. E. *et al.* A new species of *Eumops* (Chiroptera: Molossidae) from southwestern Peru. **Zootaxa** 3878 (1): 19-36, 2014.

MEGANATHAN, P. R. *et al.* Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera. **Gene**, 492:121-129, 2012.

MIFSUD, C. M.; VELLA, A. Mitochondrial genetic diversity of bat species from the Maltese Islands and applications for their conservation. **Nesciences**, 4(3): 276-292, 2019.

MOOERS, A. O.; HOLMES, E. C. The evolution of base composition and phylogenetic inference. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, 365-369, 2000.

MORATELLI, R.; CALISHER, C. H. **Bats and zoonotic viruses**: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.110, n.1, p.1-22, 2015.

MORATELLI, R. *et al.* Geographic variation in South American populations of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera, Vespertilionidae), with the description of two new species. **Mammalian Biology** 76, 592–607, 2011.

MORATORIO, G. *et al.*, A detailed comparative analysis on the overall codon usage patterns in West Nile virus. **Infection, Genetics and Evolution**. 14, 396-400, 2013.

MORLA, S.; MAKHIJA, A.; KUMAR, S. Synonymous codon usage pattern in glycoprotein gene of rabies virus. **Gene**, 584, 1-6, 2016.

MOTA, T. F. M. *et al.* DNA Barcode is Efficient for Identifying Bat Species. **Journal of Mammalian Evolution** 29:63–75, 2022.

MUELLER, S. *et al.* Reduction of the Rate of Poliovirus Protein Synthesis through Large-Scale Codon Deoptimization Causes Attenuation of Viral Virulence by Lowering Specific Infectivity. **Journal of Virology**, v.80, n.19, 2006.

MURPHY, W. J. *et al.* Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, v.409, 2001.

NAMBOU, K.; ANAKPA, M.; TONG, Y. S. Human genes with codon usage bias similar to that of the nonstructural protein 1 gene of influenza A viruses are conjointly involved in the infectious pathogenesis of influenza A viruses. **Genetica**, 150:97-115, 2022.

NASRULLAH, I. *et al.*, Genomic analysis of codon usage shows influence of mutation pressure, natural selection, and host features on Marburg virus Evolution. **BMC Evolutionary Biology**. 15, 174, 2015.

O'SHEA, T. J. *et al.* Bat flight and zoonotic viruses. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.5, 2014.

ONUMA, M. *et al.* A Close Relationship of Chiroptera with Eulipotyphla (Core Insectivora) Suggested by Four Mitochondrial Genes. **Zoological Science** 17: 1327–1332, 2000.

ORCIARI, L. A. *et al.* Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. **Vaccine**, v.19, p.4511-4518, 2001.

PANTHA, S. *et al.* Review of rabies in Nepal. **One Health**, 10, 2020.

PANZARIN, V. *et al.* VHSV single amino acid polymorphisms (SAPs) associated with virulence in rainbow trout. **Frontiers in Microbiology**, 11:1984, 2020.

PLOTKIN, J. B.; KUDLA, G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. **Nature Reviews Genetics**, 12, 32-42, 2011.

PODLUTSKY, A. J. *et al.* A new field record for bat longevity. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**. v. 60A, n.11, p. 1366-1368, 2005.

POWELL, J. R.; MORIYAMA, E. N. Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94, p. 7784-7790, 1997.

PRASETYA, D. A. *et al.* Resolving the Shortest Path Problem using the Haversine Algorithm. **Journal of Critical Reviews**. 7, 1, 2020.

PUIGBÒ, P.; BRAVO, I. G.; GARCIA-VALLVÉ, S. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. **Biology Direct**, 3:38, 2008a.

PUIGBÒ, P.; BRAVO, I. G.; GARCIA-VALLVÉ, S. E-CAI: a novel server to estimate the expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). **BMC Bioinformatics**, 9:65, 2008b.

PUIGBÒ, P.; ARAGONÈS, L.; GARCIA-VALLVÉ, S. RCDI/eRCDI: a web-server to estimate codon usage deoptimization. **BMC Res Notes**, 3, 87, 2010.

RAHMAN, M. M. *et al.* Complete mitochondrial genome sequence of the Indian pipistrelle *Pipistrellus coromandra* (Vespertilionidae). **Animal Cells and Systems**, v.20, n°2, p.86-94, 2016.

REIS, N. R. *et al.* **Morcegos do Brasil**. 253p, 2007.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System. **Molecular Ecology Notes**, 2007.

RODHAIN, F. Chauves-souris et virus: des relations complexes / Bats and viruses: complex relationship. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** 108. p.272-289, 2015.

ROSA, A. J. M.; PAIVA, S. R. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. **Embrapa Documentos**, 254, 35 p., 2009.

ROZAS, J. *et al.* DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Mol. Biol. Evol.** 34(12):3299–3302, 2017.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.327-343, 2002.

RUPPRECHT, C.; KUZMIN, I.; MESLIN, F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. **F1000Research**, 6:184, 2017.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SATO, G. *et al.* Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of rabies virus isolated from several species in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 7, p. 747-753, 2004.

SCHLOTTAU, K. *et al.* Rapid molecular species identification of indigenous bats from Germany for surveillance purposes. **Infection, Genetics and Evolution**, 78, 2020.

SHARP, P. M.; LI, W. H. An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. **Journal of Molecular Evolution**, 24, 28–38, 1986.

SHARP, P. M.; LI, W. H. The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.1281-1295, 1987.

SHEN, Y. Y. *et al.* Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. **PNAS** v.107, n.19, p.8666-8671, 2010.

SMITH, I.; WANG, L. F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. **Current Opinion in Virology**, 3:84-91, 2013.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. **Phylogenetic analysis using parsimony** (*and Other Methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAO, X. Y. *et al.* Molecular phylodynamic analysis indicates lineage displacement occurred in chinese rabies epidemics between 1949 to 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(7), 2013.

TIAN, L. *et al.* The adaptation of codon usage of +ssRNA viruses to their hosts. **Infection Genetics and Evolution**. 63, p. 175-179, 2018.

TORDO, N.; KOUKNETZOFF, A. The rabies virus genome: an overview. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, 60:263-269, 1993.

TROUPIN, C. *et al.* Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. **Plos Pathogens**, 12, 2016.

VELASCO-VILLA, A. *et al.* The history of rabies in the Western Hemisphere. **Antiviral Research**, 146, 221-232, 2017.

VELAZCO, P. M.; PATTERSON, B. D. Diversification of the yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* (Chiroptera, Phyllostomidae), in the New World tropics. **Mol Phylogenet Evol** 68:683-698, 2013.

VELAZCO, P. M.; PATTERSON, B. D. Two new species of yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* Gray, 1842 (Chiroptera, Phyllostomidae) from Costa Rica, Panama and western Ecuador. **Zookeys**, 402:42-65, 2014.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. SBBq, 282p., 1. ed. 2014.

VICARIO, S.; MORIYAMA, E. N.; POWELL, J. R. Codon usage in twelve species of *Drosophila*. **BMC Evolutionary Biology**, 7:226, 2007.

VIZOTTO, L. D.; TADDEI, V. A. **Chave para a determinação de quirópteros brasileiros**. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1973.

WAGNER, A. *et al.* Mitochondrial Genetic and Epigenetic Regulations in Cancer: Therapeutic Potential. **Int. J. Mol. Sci**, 23(14), 2022.

WAKELEY, P. R. *et al.* Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of *Lyssavirus* genotypes 1, 5, and 6. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2786-2792, 2005.

WANG, L. F.; WALKER, P. T.; POON, L. L. M. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? **Current Opinion in Virology** 1:649-657, 2011.

WANG, Y.; GUO, S. Research Progress of Rabies Vaccine. **Journal of Applied Virology**. v.1. n.1, 2012.

WEI, L. *et al.* Analysis of codon usage bias of mitochondrial genome in *Bombyx mori* and its relation to evolution. **BMC Evolutionary Biology** 14:262, 2014.

WHO, WHO **Expert Consultation on Rabies**: Third Report, World Health Organization, Geneva, 2018.

WILKINSON, G. S.; SOUTH, J. M. Life history, ecology and longevity in bats. **Aging Cell** 1:124-131, 2002.

WOBESSI, J. N. S. *et al.* Incidence and seroprevalence of rabies virus in humans, dogs and other animal species in Africa, a systematic review and meta-analysis. **One Health**, 13, 100285, 2021.

WRIGHT, F. The 'effective number of codons' used in a gene. **Gene**. 87, p.23-29, 1990.

WU, *et al.*, Comprehensive Analysis of Codon Usage on Porcine Astrovirus, **Viruses**, 12(9), 991, 2020.

WYNNE, J. W.; WANG, L.F. Bats and viruses: friend or foe? **Plos Pathogens** v.9:10, 2013.

XIA, X. An improved implementation of codon adaptation index. **Evolutionary Bioinformatics**, 3, 53-58, 2007.

XIA, X. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution** 35:1550–1552, 2018.

NAKAMURA, Y.; GOJOBORI, T.; IKEMURA, T. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000, **Nucleic Acids Research**, 28, 1, 2000,

YOON, K. B.; PARK, Y. C. Complete mitochondrial genome and codon usage of the Nepalese whiskered bat *Myotis muricola* (Vespertilionidae). **Genet. Mol. Res.**, 14 (4):14637-14645, 2015.

ZHANG, Y. *et al.* Cross-border spread, lineage displacement and evolutionary rate estimation of rabies virus in Yunnan Province, China. **Virology Journal**, 14:102, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Comprehensive analysis of codon usage on Rabies virus and other Lyssaviruses. **International Journal of molecular Sciences**. 19, 2397, 2018.

APÊNDICE A – Sequências do gene COI de quirópteros utilizadas como banco de dados, disponíveis no GenBank

Família	Espécie	Acesso GenBank	Voucher	Origem
Molossidae	<i>Cynomops planirostris</i>	OK493382	IP1661/2015	Brasil
	<i>Cynomops planirostris</i>	EF080319	ROM 97854	Guiana
	<i>Eumops auripendulus</i>	JF454657	ROM 103342	Guiana
	<i>Eumops auripendulus</i>	JF448843	ROM 105526	Equador
	<i>Eumops glaucinus</i>	OM169004	IP2052/2015	Brasil
	<i>Eumops glaucinus</i>	OM169002	IP1843/2015	Brasil
	<i>Molossops neglectus</i>	EF080461	ROM 108483	Guiana
	<i>Molossops neglectus</i>	EF080458	ROM 108447	Guiana
	<i>Molossus molossus</i>	JF455091	ROM 103558	Guiana
	<i>Molossus molossus</i>	JF448977	ROM F41836	Equador
	<i>Molossus rufus</i>	JF455100	ROM 107250	Guiana
	<i>Molossus rufus</i>	JF447688	ROM 116999	Suriname
	<i>Nyctinomops femorosaccus</i>	HQ980028	CIBNOR 7900	México
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	JF447304	ROM 96422	México
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	JF447302	ROM FN30234	México
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	EF080535	ROM 108485	Guiana
	<i>Promops centralis</i>	MH185192	ROM F49133	México
	<i>Promops davisoni</i>	MH185193	ROM F125587	Peru
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	JF446884	ROM FN31378	Guatemala
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	HQ575930	CIBNOR 5396	México
Phyllostomidae	<i>Artibeus fimbriatus</i>	JF446311	ROM 111160	Brasil
	<i>Artibeus fimbriatus</i>	JF446310	ROM 111097	Brasil
	<i>Artibeus lituratus</i>	JF447524	ROM 116972	Suriname
	<i>Artibeus lituratus</i>	JF452885	ROM 101037	Guiana
	<i>Artibeus planirostris</i>	JF447783	ROM 107888	Venezuela
	<i>Artibeus planirostris</i>	JF453675	ROM 102924	Guiana
	<i>Carollia perspicillata</i>	JF448007	ROM 112173	Nicarágua
	<i>Carollia perspicillata</i>	JF448006	ROM 97499	México
	<i>Glossophaga soricina</i>	JF448045	ROM 113898	Suriname
	<i>Glossophaga soricina</i>	JF446796	ROM 99236	Guatemala
	<i>Micronycteris megalotis</i>	JF448925	ROM 118782	Equador
	<i>Micronycteris megalotis</i>	JF435493	ROM 97452	México
	<i>Phyllostomus discolor</i>	JF448100	ROM 101304	El Salvador
	<i>Phyllostomus discolor</i>	JF446815	ROM 98494	Guatemala
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	JF446382	ROM 111084	Brasil
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	JF446381	ROM 111156	Brasil
<i>Sturnira lilium</i>	JF449192	ROM 105965	Equador	
<i>Sturnira lilium</i>	JF447732	ROM 117090	Suriname	
Vespertilionidae	<i>Eptesicus furinalis</i>	JF499012	BCBF-132	Belize
	<i>Eptesicus furinalis</i>	HQ545594	ROM 120131	Suriname
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	JF448048	ROM 104285	Panamá

<i>Lasiurus blossevillii</i>	JF446799	ROM 99784	Guatemala
<i>Lasiurus cinereus</i>	GU722968	TN59	USA
<i>Lasiurus cinereus</i>	GU722963	CA7979	Panamá
<i>Myotis albescens</i>	JF455112	ROM 107047	Guiana
<i>Myotis albescens</i>	JF447689	ROM 117001	Suriname
<i>Myotis nigricans</i>	JQ601631	ROM 106162	Equador
<i>Myotis nigricans</i>	JQ601612	ROM F37461	Equador
<i>Myotis</i> sp.	OK413003	IP1206/2015	Brasil

APÊNDICE B – Quirópteros da família Molossidae utilizados para amplificação do gene COI

Espécie	Origem	n° amostra	Acesso GenBank
<i>Cynomops planirostris</i>	São Paulo	831/20_SP	OM802850
	Sorocaba	874/20_SOC	OM807198
	Sorocaba	876/20_SOC	OM811674
	Jundiaí	1111/20_JAI	OM830231
	Jundiaí	1113/20_JAI	OM818816
	Sorocaba	1129/20_SOC	OM818817
	Sorocaba	1130/20_SOC	OM819019
	Sorocaba	1136/20_SOC	OM830229
	Campinas	1173/20_CAS	OM824460
	Campinas	1175/20_CAS	OM830230
	Campinas	1177/20_CAS	OM829805
	Campinas	1183/20_CAS	OM836428
	Jundiaí	1215/20_JAI	OM830310
	Sorocaba	1250/20_SOC	OM830331
	Sorocaba	1253/20_SOC	OM830487
	Campinas	1274/20_CAS	OM830711
	Piracicaba	1285/20_PAA	OM836430
	Jundiaí	1297/20_JAI	OM836427
São Paulo	2256/20_SP	OM831944	
São Paulo	2257/20_SP	OM836426	
<i>Eumops auripendulus</i>	São José dos Campos	1290/20_SJC	OM831945
	São Paulo	1485/20_SP	OM831947
	São Paulo	1742/20_SP	OM839779
	Águas de São Pedro	2021/20_ASO	OM839778
	Cotia	2897/20_COA	OM839769
	São José dos Campos	2941/20_SJC	OM839758
	Itu	261/21_ITU	OM839768
	São Paulo	2607/21_SP	OM839765
<i>Eumops glaucinus</i>	São José dos Campos	841/20_SJC	OM839776
	Sorocaba	878/20_SOC	OM839777

	Piracicaba	894/20_PAA	OM839773
	Jundiaí	920/20_JAI	OM839766
	Osasco	1044/20_OCO	OM839783
	Campinas	1065/20_CAS	OM849657
	Piracicaba	1124/20_PAA	OM849655
	Sorocaba	1132/20_SOC	OM849654
	Piracicaba	1207/20_PAA	OM849652
	Sorocaba	1251/20_SOC	OM849646
	Campinas	1277/20_CAS	OM849643
	Piracicaba	1284/20_PAA	OM849645
	Piracicaba	1287/20_PAA	OM849658
	Jundiaí	1295/20_JAI	OM849642
	Campinas	1319/20_CAS	OM849660
	Piracicaba	1353/20_PAA	OM849662
	Campinas	1414/20_CAS	OM839767
	Piracicaba	1451/20_PAA	OM839771
	Jundiaí	1457/20_JAI	OM839782
	Campinas	1811/20_CAS	OM839772
<i>Eumops perotis</i>	Piracicaba	843/20_PAA	OM843135
	Mairiporã	844/20_MAR	OM849659
	São Paulo	1080/20_SP	OM849656
	Sorocaba	1137/20_SOC	OM843136
	São Paulo	1303/20_SP	OM849653
	Campinas	1316/20_CAS	OM849647
	Campinas	1410/20_CAS	OM849663
	São Paulo	1440/20_SP	OM849650
	São Paulo	1446/20_SP	OM843217
	Jundiaí	1461/20_JAI	OM849661
	Campinas	1501/20_CAS	OM849641
	Campinas	1507/20_CAS	OM844020
	Campinas	1711/20_CAS	OM849644
	Sorocaba	2129/20_SOC	OM849651
	Campinas	2462/20_CAS	OM845232
	Campinas	218/21_CAS	OM849649
	São José do Rio Preto	1107/21_SRR	OM849640
Sorocaba	1937/21_SOC	OM849648	
Campinas	2179/21_CAS	OM845234	
<i>Molossops neglectus</i>	São Paulo	856/20_SP	OM849245
	São Paulo	880/20_SP	OM863950
	São Paulo	2048/20_SP	OM850171
<i>Molossus molossus</i>	Barueri	810/20_BRE	OM855542
	São José do Rio Preto	835/20_SRR	OM855549
	São José dos Campos	838/20_SJC	OM855559
	São José dos Campos	839/20_SJC	OM855570
	Barueri	842/20_BRE	OM863948

	Piracicaba	845/20_PAA	OM856343
	Piracicaba	846/20_PAA	OM856827
	Sorocaba	875/20_SOC	OM863946
	São Paulo	888/20_SP	OM857594
	São José dos Campos	890/20_SJC	OM863947
	Piracicaba	896/20_PAA	OM857920
	Piracicaba	900/20_PAA	OM857921
	São Paulo	904/20_SP	OM863953
	Jundiaí	923/20_JAI	OM863954
	Jundiaí	926/20_JAI	OM859333
	Águas de São Pedro	1123/20_ASO	OM859332
	Caraguatatuba	1243/20_CGT	OM863951
	Caraguatatuba	1245/20_CGT	OM863949
	Itu	1491/20_ITU	OM863952
	Saltinho	1585/20_SALN	OM860202
<i>Molossus rufus</i>	São Paulo	829/20_SP	OM860261
	São José do Rio Preto	837/20_SRR	OM860304
	São José do Rio Preto	1100/20_SRR	OM864532
	São Paulo	1126/20_SP	OM864533
	Sorocaba	1131/20_SOC	OM864575
	Sorocaba	1249/20_SOC	OM864574
	Jundiaí	1258/20_JAI	OM864580
	Campinas	1309/20_CAS	OM864585
	São José dos Campos	1325/20_SJC	OM864596
	São José dos Campos	1356/20_SJC	OM864636
	Sorocaba	1622/20_SOC	OM867237
	Jundiaí	1656/20_JAI	OM887447
	Itu	1751/20_ITU	OM884011
	Campinas	1937/20_CAS	OM884027
	Piracicaba	2022/20_PAA	OM887448
	Piracicaba	2023/20_PAA	OM887445
	Piracicaba	2024/20_PAA	OM887444
	Itu	271/21_ITU	OM884032
	Barueri	2087/21_BRE	OM887443
	São José dos Campos	2266/21_SJC	OM884035
<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Sorocaba	867/20_SOC	OM902674
	Sorocaba	870/20_SOC	OM902676
	São José dos Campos	942/20_SJC	OM902684
	São Paulo	1227/20_SP	OM912378
	São José dos Campos	1234/20_SJC	OM903878
	Caraguatatuba	1244/20_CGT	OM903882
	Americana	1264/20_AMR	OM903883
	São Paulo	1288/20_SP	OM912376
	São José dos Campos	1324/20_SJC	OM903886
	São Paulo	1437/20_SP	OM903887

	São Paulo	1496/20_SP	OM912380
	Sorocaba	1517/20_SOC	OM903924
	Campinas	1525/20_CAS	OM903953
	Campinas	1546/20_CAS	OM904046
	São Paulo	2154/20_SP	OM904932
	Campinas	2682/21_CAS	OM904938
<i>Nyctinomops macrotis</i>	São Paulo	940/20_SP	OM909248
	Barueri	1125/20_BRE	OM912370
	São José dos Campos	1209/20_SJC	OM910704
	São Paulo	1349/20_SP	OM910741
	São Paulo	1393/20_SP	OM912373
	São Paulo	1552/20_SP	OM912374
	São Paulo	1823/20_SP	OM912371
	São Paulo	2016/20_SP	OM913591
	São Paulo	2247/20_SP	OM913594
	São Paulo	247/21_SP	OM913593
	São Paulo	358/21_SP	OM913588
	São Paulo	380/21_SP	OM913595
	São Paulo	500/21_SP	OM913589
	São Paulo	728/21_SP	OM913590
	São Paulo	973/21_SP	OM913592
	São Paulo	1026/21_SP	OM924048
	São Paulo	1161/21_SP	OM924054
	São Paulo	1508/21_SP	OM924043
	Piracicaba	2385/21_PAA	OM924046
	São José do Rio Preto	2827/21_SRR	OM924049
<i>Promops nasutus</i>	Sorocaba	805/20_SOC	OM918261
	Sorocaba	807/20_SOC	OM924058
	Sorocaba	877/20_SOC	OM924035
	Campinas	2423/20_CAS	OM918263
	São Paulo	2430/20_SP	OM918264
	Campinas	2567/20_CAS	OM918265
	Campinas	2610/20_CAS	OM924040
	Jundiaí	2640/20_JAI	OM924032
	São José dos Campos	2647/20_SJC	OM918374
	São José dos Campos	2649/20_SJC	OM918377
	São José dos Campos	2785/20_SJC	OM924051
	Sorocaba	3100/20_SOC	OM924033
	São Paulo	303/21_SP	OM918378
	São Paulo	499/21_SP	OM918379
	Jundiaí	582/21_JAI	OM924036
	São Paulo	742/21_SP	OM924034
	São Paulo	1058/21_SP	OM924038
Campinas	3238/21_CAS	OM924055	
<i>Tadarida brasiliensis</i>	São Paulo	812/20_SP	OM918380

São Paulo	832/20_SP	OM924052
São Paulo	855/20_SP	OM924060
São Paulo	881/20_SP	OM924039
São Paulo	905/20_SP	OM924045
Jundiaí	922/20_JAI	OM920026
São Paulo	936/20_SP	OM920029
São Paulo	937/20_SP	OM920032
São Paulo	1228/20_SP	OM924053
São Paulo	1334/20_SP	OM920034
São Paulo	1515/20_SP	OM924061
São Paulo	1542/20_SP	OM924057
São Paulo	1543/20_SP	OM924056
São Paulo	1578/20_SP	OM924037
São Paulo	1591/20_SP	OM924050
Guarulhos	1723/20_GRS	OM924047
Osasco	1725/20_OCO	OM924059
São Paulo	1737/20_SP	OM924062
São Paulo	1826/20_SP	OM924042
Campinas	1941/20_CAS	OM920068

APÊNDICE C – Quirópteros da família Phyllostomidae utilizados para amplificação do gene COI

Espécie	Origem	n° amostra	Acesso GenBank
<i>Artibeus fimbriatus</i>	São Paulo	1262/20_SP	OM920069
	São Paulo	1401/20_SP	OM920071
	Campinas	1416/20_CAS	OM924041
	São Paulo	1516/20_SP	OM920072
	São Paulo	1784/20_SP	OM921006
	Presidente Prudente	546/21_PPE	OM921009
	São Paulo	998/21_SP	OM924044
	São Paulo	2056/21_SP	OM921395
	São Paulo	2057/21_SP	OM925489
	São Paulo	3193/21_SP	OM932503
<i>Artibeus lituratus</i>	Piracicaba	1122/20_PAA	OM936864
	Sorocaba	1252/20_SOC	OM956398
	São Paulo	1255/20_SP	OM957497
	Campinas	1276/20_CAS	OM957537
	São Paulo	1281/20_SP	OM957540
	Águas de São Pedro	1286/20_ASO	OM959660
	Campinas	1308/20_CAS	OM959661
	Campinas	1322/20_CAS	OM959229
	São Paulo	1333/20_SP	OM959619

	São Paulo	1336/20_SP	OM959656
	Campinas	1342/20_CAS	OM959657
	São Paulo	1350/20_SP	OM960560
	Guarulhos	1352/20_GRS	OM960632
	São Paulo	1366/20_SP	OM960967
	Sorocaba	1371/20_SOC	OM960970
	Piracicaba	1396/20_PAA	OM960971
	São Paulo	1426/20_SP	OM963131
	Jundiaí	1462/20_JAI	OM960972
	São Paulo	2022/21_SP	OM963130
	Campinas	2138/21_CAS	OM961046
<i>Artibeus planirostris</i>	São José do Rio Preto	907/20_SRR	OM961052
	Presidente Prudente	504/21_PPE	OM961057
	Presidente Prudente	505/21_PPE	OM961141
	Presidente Prudente	509/21_PPE	OM961178
	Presidente Prudente	515/21_PPE	OM961395
	Presidente Prudente	518/21_PPE	OM963132
	Presidente Prudente	519/21_PPE	OM962796
	Presidente Prudente	521/21_PPE	OM962874
	Presidente Prudente	522/21_PPE	OM962966
	Presidente Prudente	526/21_PPE	OM962967
	Presidente Prudente	549/21_PPE	OM962970
	<i>Carollia perspicillata</i>	Sorocaba	871/20_SOC
Barueri		1373/20_BRE	OM962991
Campinas		1670/20_CAS	OM964473
Campinas		1679/20_CAS	OM964492
Campinas		1809/20_CAS	OM964561
Presidente Prudente		513/21_PPE	OM964560
Presidente Prudente		525/21_PPE	OM964562
Presidente Prudente		536/21_PPE	OM964595
Presidente Prudente		555/21_PPE	OM964646
Presidente Prudente		556/21_PPE	OM967480
Presidente Prudente		557/21_PPE	OM967481
Araçatuba		2157/21_ARC	OM967476
Campinas		2231/21_CAS	OM967477
Águas de Santa Bárbara		3059/21_ABB	OM967466
Águas de Santa Bárbara		3076/21_ABB	OM967478
Águas de Santa Bárbara		3086/21_ABB	OM967468
Águas de Santa Bárbara		3089/21_ABB	OM967470
Águas de Santa Bárbara		3094/21_ABB	OM967472
Águas de Santa Bárbara		3095/21_ABB	OM967494
Águas de Santa Bárbara	3106/21_ABB	OM967483	
<i>Glossophaga soricina</i>	Guarulhos	917/20_GRS	OM967484
	Guarulhos	918/20_GRS	OM970094
	Campinas	1063/20_CAS	OM970243

	São Paulo	1096/20_SP	OM970244
	São Paulo	1097/20_SP	OM970245
	Jundiaí	1112/20_JAI	OM971655
	Jundiaí	1114/20_JAI	OM971656
	Sorocaba	1141/20_SOC	OM971657
	São Paulo	1144/20_SP	OM971658
	São Paulo	1146/20_SP	OM971659
	Campinas	1161/20_CAS	OM971660
	São Paulo	1205/20_SP	OM971661
	São Paulo	1218/20_SP	OM971662
	Piracicaba	1238/20_PAA	OM971663
	Barueri	1259/20_BRE	OM971664
	Piracicaba	1283/20_PAA	OM971665
	São Paulo	1293/20_SP	OM971666
	Mogi das Cruzes	1382/20_MCZ	OM971667
	Jandira	1572/20_JAD	OM971668
	São Paulo	2148/21_SP	OM971669
<i>Micronycteris microtis</i>	Piracicaba	1992/21_PAA	OM972021
	Piracicaba	1994/21_PAA	OM972022
<i>Phyllostomus discolor</i>	Piracicaba	1397/20_PAA	OM972724
	Campinas	1506/20_CAS	OM972725
	Campinas	1950/20_CAS	OM972726
	Presidente Prudente	510/21_PPE	OM972727
	Presidente Prudente	511/21_PPE	OM972728
	Presidente Prudente	514/21_PPE	OM972729
	Campinas	1465/21_CAS	OM972730
	Campinas	2051/21_CAS	OM972731
	Campinas	2217/21_CAS	OM972732
	Campinas	2340/21_CAS	OM972733
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	São Paulo	817/20_SP	OM973949
	São Paulo	818/20_SP	OM973950
	São Paulo	819/20_SP	OM973951
	Sorocaba	869/20_SOC	OM973952
	São Paulo	915/20_SP	OM973953
	Campinas	1155/20_CAS	OM973954
	São Paulo	1385/20_SP	OM973955
	Barueri	1573/20_BRE	OM973956
	Jundiaí	1599/20_JAI	OM973957
	Guarulhos	1724/20_GRS	OM973958
	São Paulo	1753/20_SP	OM973959
	Campinas	1805/20_CAS	OM973960
	Campinas	1810/20_CAS	OM973961
	São Paulo	2067/20_SP	OM973962
	Campinas	2089/20_CAS	OM973963
	Campinas	2363/20_CAS	OM973964

	São Paulo	2507/20_SP	OM973965
	São Paulo	2542/20_SP	OM973966
	Campinas	2613/20_CAS	OM973967
	São Paulo	2620/20_SP	OM973968
<i>Sturnira lilium</i>	São Paulo	858/20_SP	OM978242
	Sorocaba	1139/20_SOC	OM978243
	Osasco	1222/20_OCO	OM978244
	Barueri	1294/20_BRE	OM978245
	Jundiaí	1363/20_JAI	OM978246
	Barueri	1374/20_BRE	OM978247
	Campinas	1413/20_CAS	OM978248
	Campinas	1418/20_CAS	OM978249
	São Paulo	55/21_SP	OM978250
	Jundiaí	575/21_JAI	OM978251
	São Paulo	741/21_SP	OM978252
	Jundiaí	791/21_JAI	OM978253
	Jundiaí	792/21_JAI	OM978254
	Jundiaí	793/21_JAI	OM978255
	Jundiaí	795/21_JAI	OM978256
	São Paulo	1122/21_SP	OM978257
	São Paulo	1124/21_SP	OM978258
	São Paulo	1169/21_SP	OM978259
	Campinas	1516/21_CAS	OM978260
	São Paulo	2857/21_SP	OM978261

APÊNDICE D – Quirópteros da família Vespertilionidae utilizados para amplificação do gene COI

Espécie	Origem	n° amostra	Acesso GenBank
<i>Eptesicus furinalis</i>	Campinas	1273/20_CAS	OM978280
	Cabreúva	1403/20_CVA	OM978281
	São Paulo	1593/20_SP	OM978282
	São Paulo	1738/20_SP	OM978283
	Campinas	2093/20_CAS	OM978284
	Sorocaba	2132/20_SOC	OM978285
	Campinas	2189/20_CAS	OM978286
	São Paulo	2434/20_SP	OM978287
	Piracicaba	2628/20_PAA	OM978288
	Jundiaí	986/21_JAI	OM978289
	Campinas	1814/21_CAS	OM978290
	Campinas	2448/21_CAS	OM978291
	Campinas	2517/21_CAS	OM978292
	Campinas	2848/21_CAS	OM978293

	Sorocaba	3189/21_SOC	OM978294
	Campinas	3237/21_CAS	OM978295
<i>Lasiurus blossevillii</i>	São José do Rio Preto	833/20_SRR	OM978297
	Jundiaí	60/21_JAI	OM978298
	Itu	259/21_ITU	OM978299
	Campinas	1098/21_CAS	OM978300
	Campinas	2218/21_CAS	OM978301
<i>Lasiurus cinereus</i>	Campinas	2687/20_CAS	OM978302
	São Paulo	2495/21_SP	OM978303
<i>Myotis albescens</i>	Campinas	1268/20_CAS	OM978304
	Piracicaba	1395/20_PAA	OM978305
	Jundiaí	1536/20_JAI	OM978306
	Campinas	1612/20_CAS	OM978307
	Campinas	2190/20_CAS	OM978308
	Sorocaba	2218/20_SOC	OM978309
	Sorocaba	2219/20_SOC	OM978310
	Presidente Prudente	531/21_PPE	OM978311
	Presidente Prudente	533/21_PPE	OM978312
	Presidente Prudente	534/21_PPE	OM978313
	São Paulo	726/21_SP	OM978314
	Campinas	2756/21_CAS	OM978315
	São Paulo	2763/21_SP	OM978316
	São Paulo	2777/21_SP	OM978317
<i>Myotis nigricans</i>	Piracicaba	2952/21_PAA	OM978318
	Piracicaba	2953/21_PAA	OM978319
	Valinhos	1263/20_VOS	OM978322
	Cabreúva	1364/20_CVA	OM978323
	São Paulo	2398/20_SP	OM978324
	Presidente Prudente	540/21_PPE	OM978325
	Jundiaí	2486/21_JAI	OM978326
	Águas de Santa Bárbara	3069/21_ABB	OM978327
	Águas de Santa Bárbara	3081/21_ABB	OM978328
Águas de Santa Bárbara	3091/21_ABB	OM978329	
<i>Myotis sp.</i>	Jundiaí	927/20_JAI	OM985909
	Campinas	1031/20_CAS	OM985910
	Campinas	1038/20_CAS	OM985911
	Campinas	1040/20_CAS	OM985912
	Sorocaba	1138/20_SOC	OM985913
	São Paulo	1145/20_SP	OM985914
	Jundiaí	1256/20_JAI	OM985915
	Campinas	1267/20_CAS	OM985916
	Campinas	1272/20_CAS	OM985917
	Campinas	1315/20_CAS	OM985918
	Águas de São Pedro	1354/20_ASO	OM985919
São Paulo	1399/20_SP	OM985920	

Piracicaba	1586/20_PAA	OM985921
Sorocaba	2276/21_SOC	OM985922
São Paulo	2373/21_SP	OM985923
Piracicaba	2384/21_PAA	OM985924
Sorocaba	2615/21_SOC	OM985925
Jundiaí	2738/21_JAI	OM985926
Sorocaba	2825/21_SOC	OM985927
Jundiaí	2853/21_JAI	OM985928

APÊNDICE E – Sequências parciais de mRNA de β -actina de possíveis hospedeiros terrestres

Ordem	Família	Acesso GenBank	Espécie	Origem
Carnivora	Canidae	NM_001195845	<i>Canis lupus familiaris</i>	USA
		XM_041749381	<i>Vulpes lagopus</i>	Ártico
	Mustelidae	XM_044233901	<i>Neogale vison</i>	USA
	Ursidae	XM_045813333	<i>Ursus americanus</i>	USA
	Felidae	AB051104	<i>Felis catus</i>	Japão
		XM_030301662	<i>Lynx canadensis</i>	USA
Herpestidae	XM_029950129	<i>Suricata suricatta</i>	África do Sul	
Hyaenidae	XM_039226147	<i>Hyaena hyaena</i>	Alemanha	
Primates	Cebidae	XM_017533829	<i>Cebus imitator</i>	Costa Rica
	Cercopithecidae	KM491709	<i>Macaca fascicularis</i>	Japão
		NM_001033084	<i>Macaca mulatta</i>	USA
	Hominidae	NM_0011101	<i>Homo sapiens</i>	USA
NM_001133354		<i>Pongo abelii</i>	Indonésia	
Rodentia	Caviidae	AF508792	<i>Cavia porcellus</i>	Austrália
	Cricetidae	AJ312092	<i>Mesocricetus auratus</i>	Holanda
	Muridae	BC138614	<i>Mus musculus</i>	Canadá
		BC063166	<i>Rattus norvegicus</i>	USA
Sciuridae	AF232730	<i>Marmota monax</i>	Canadá	
Artiodactyla	Bovidae	DQ838049	<i>Bos grunniens</i>	China
		BT030480	<i>Bos taurus</i>	USA
		JX046106	<i>Capra hircus</i>	China
		HM067830	<i>Ovis aries</i>	Austrália
	Cervidae	XM_043455280	<i>Cervus canadensis</i>	USA
	Camelidae	AB107655	<i>Lama glama</i>	Japão
	Suidae	XM_003124280	<i>Sus scrofa</i>	USA
Perissodactyla	Equidae	AF035774	<i>Equus caballus</i>	USA

APÊNDICE F – Sequências do genoma completo de RABV isolado de diversos hospedeiros

Ordem	Família	Acesso GenBank	Espécie	Origem
Carnivora	Canidae	JQ685973	<i>Canis latrans</i>	USA
		KX148188	<i>Canis lupus</i>	Irã
		KX148109	<i>Canis lupus familiaris</i>	Brasil
		MT454653	<i>Canis mesomelas</i>	África do Sul
		KM594039	<i>Cerdocyon thous</i>	Brasil
		MN233899	<i>Vulpes lagopus</i>	Alasca
		MN233930	<i>Vulpes vulpes</i>	Canadá
	Mephitidae	MK541011	<i>Mephitis mephitis</i>	Canadá
		JQ685975	<i>Spilogale putorius</i>	México
	Mustelidae	MN418161	<i>Lontra canadensis</i>	USA
		MK760750	<i>Martes foina</i>	Irã
		KX148219	<i>Mellivora capensis</i>	Botswana
		GU647092	<i>Melogale moschata</i>	China
	Procyonidae	JQ685937	<i>Bassariscus astutus</i>	USA
		JQ685963	<i>Nasua narica</i>	México
		MK920923	<i>Potos flavus</i>	Brasil
		MN418184	<i>Procyon lotor</i>	USA
	Ursidae	KP997032	<i>Ursus arctos</i>	Rússia
		MN233947	<i>Ursus maritimus</i>	Canadá
	Felidae	KX148107	<i>Felis catus</i>	Benin
KR906740		<i>Felis silvestris</i>	Tanzânia	
Herpestidae	KX148220	<i>Cynictis penicillata</i>	África do Sul	
	KY775604	'mongoose'	Índia	
Hyaenidae	KY210305	<i>Hyaena hyaena</i>	Tanzânia	
	MT454642	<i>Proteles cristata</i>	África do Sul	
Viverridae	KR534246	<i>Cynogale bennettii</i>	Tanzânia	
	AB635373	<i>Paradoxurus zeylonensis</i>	Sri Lanka	
Chiroptera	Molossidae	JQ685905	<i>Tadarida brasiliensis</i>	USA
		KM594036	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	Brasil
	Phyllostomidae	AB519641	<i>Artibeus lituratus</i>	Brasil
		KU523255	<i>Desmodus rotundus</i>	Guiana Francesa
	Vespertilionidae	AB608731	<i>Lasiurus ega</i>	Brasil
JQ685921		<i>Myotis austroriparius</i>	USA	
JQ685952	<i>Parastrellus hesperus</i>	USA		
Primates	Cebidae	AB810256	<i>Cebus apella</i>	Brasil
		KM594025	<i>Callithrix jacchus</i>	Brasil
	Hominidae	GU345747	<i>Homo sapiens</i>	China
		KC737850	<i>Homo sapiens</i>	USA

Rodentia	Sciuridae	AB645847	<i>Marmota monax</i>	USA
		KX148221	<i>Xerus inauris</i>	África do Sul
Artiodactyla	Bovidae	KM594043	<i>Bos taurus</i>	Brasil
		KY775603	<i>Boselaphus tragocamelus</i>	Índia
		AB699220	<i>Capra hircus</i>	Bangladesh
		LM645054	<i>Ovis aries</i>	Groenlândia
	Cervidae	KJ564280	<i>Dama dama</i>	China
		JQ944707	'deer'	Rússia
Camelidae	MN534896	<i>Camelus dromedarius</i>	Catar	
Suidae	JX088694	<i>Sus scrofa domesticus</i>	China	
Perissodactyla	Equidae	JQ647510	<i>Equus asinus</i>	China
		MG562521	<i>Equus caballus</i>	USA
		KX148172	<i>Equus ferus</i>	Arábia Saudita

APÊNDICE G – Sequências parciais de mRNA de β -actina de quirópteros geradas no estudo

Família	Espécie	Origem	Amostra	Acesso GenBank
Molossidae	<i>Cynomops abrasus</i>	Jundiaí - SP	924/20_JAI	ON500404
	<i>Cynomops planirostris</i>	Piracicaba - SP	1285/20_PAA	ON500405
	<i>Eumops auripendulus</i>	São Paulo - SP	1485/20_SP	ON500406
	<i>Eumops auripendulus</i>	Cotia - SP	2897/20_COA	ON500407
	<i>Eumops glaucinus</i>	São José dos Campos - SP	841/20_SJC	ON500408
	<i>Eumops perotis</i>	Sorocaba - SP	1937/21_SOC	ON500409
	<i>Eumops perotis</i>	Campinas - SP	2179/21_CAS	ON500410
	<i>Molossops neglectus</i>	São Paulo - SP	2048/20_SP	ON500411
	<i>Molossus molossus</i>	São Paulo - SP	888/20_SP	ON500412
	<i>Molossus molossus</i>	São Paulo - SP	904/20_SP	ON500413
	<i>Molossus rufus</i>	Itu - SP	271/21_ITU	ON500414
	<i>Molossus rufus</i>	São José dos Campos - SP	2266/21_SJC	ON500415
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São Paulo - SP	1288/20_SP	ON500416
	<i>Nyctinomops laticaudatus</i>	São Paulo - SP	2175/20_SP	ON500417
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	São Paulo - SP	1161/21_SP	ON500418
	<i>Nyctinomops macrotis</i>	São Paulo - SP	1508/21_SP	ON500419
	<i>Promops nasutus</i>	Sorocaba - SP	877/20_SOC	ON500421
	<i>Promops nasutus</i>	São Paulo - SP	499/21_SP	ON500420
	<i>Tadarida brasiliensis</i>	São Paulo - SP	905/20_SP	ON500422
Phyllostomidae	<i>Artibeus fimbriatus</i>	São Paulo - SP	998/21_SP	ON500423
	<i>Artibeus fimbriatus</i>	São Paulo - SP	2056/21_SP	ON500424
	<i>Artibeus lituratus</i>	São Paulo - SP	1281/20_SP	ON500425
	<i>Artibeus lituratus</i>	São Paulo - SP	2022/21_SP	ON500426

	<i>Artibeus planirostris</i>	Presidente Prudente	504/21_PPE	ON500427
	<i>Artibeus planirostris</i>	Presidente Prudente	515/21_PPE	ON500428
	<i>Carollia perspicillata</i>	Campinas - SP	1679/20_CAS	ON500429
	<i>Carollia perspicillata</i>	Campinas - SP	2231/21_CAS	ON500430
	<i>Glossophaga soricina</i>	São Paulo - SP	820/20_SP	ON500431
	<i>Glossophaga soricina</i>	São Paulo - SP	2148/21_SP	ON500432
	<i>Micronycteris microtis</i>	Piracicaba - SP	1992/21_PAA	ON500435
	<i>Micronycteris microtis</i>	Piracicaba - SP	1994/21_PAA	ON500433
	<i>Phyllostomus discolor</i>	Piracicaba - SP	1397/20_PAA	ON508019
	<i>Phyllostomus discolor</i>	Campinas - SP	2217/21_CAS	ON508020
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	São Paulo - SP	819/20_SP	ON508021
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	São Paulo - SP	1385/20_SP	ON508022
	<i>Sturnira lilium</i>	São Paulo - SP	1124/21_SP	ON508023
Vespertilionidae	<i>Eptesicus furinalis</i>	Campinas - SP	1273/20_CAS	ON508024
	<i>Lasiurus blossevillii</i>	Campinas - SP	2218/21_CAS	ON508025
	<i>Lasiurus cinereus</i>	Campinas - SP	2687/20_CAS	ON508026
	<i>Myotis albescens</i>	Campinas - SP	1268/20_CAS	ON508027
	<i>Myotis albescens</i>	Sorocaba - SP	2219/20_SOC	ON508028
	<i>Myotis</i> sp.	Sorocaba - SP	2276/21_SOC	ON508029
	<i>Myotis</i> sp.	Jundiaí - SP	2853/21_JAI	ON508030