



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**Forma, função e evolução da folha nasal em Phyllostomidae**

**(Mammalia, Chiroptera)**

Luisa de Souza Aguiar Machado

Brasília

- Agosto de 2021 –



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**Forma, função e evolução da folha nasal em Phyllostomidae**

**(Mammalia, Chiroptera)**

Luisa de Souza Aguiar Machado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Orientador(a): Professora Dra. Julia Klaczko

Brasília

- Agosto de 2021 –

## Dedicatória

Dedico essa dissertação ao meu eu do passado, que nunca desistiu de ir atrás do que realmente gosta, a minha orientadora Prof. Julia Klaczko que possibilitou a realização desse trabalho e aos meus pais, que me ensinaram a amar o estudo da vida.

“Eu não percebo onde tem alguma coisa que não seja natureza. Tudo é natureza. O cosmos é natureza. Tudo em que eu consigo pensar é natureza.”

— Ailton Krenak, Ideias para adiar o fim do mundo



## **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Pós-Graduação em Zoologia pelo auxílio financeiro para realização do trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a execução e melhoria da dissertação.

A Thais e Anderson que passaram horas no laboratório processando peças de histologia.

A Leticia que contribuiu com os dados de crânio e gastou horas colocando marcos anatômicos.

A Izabel que ajudou a melhorar as imagens dessa dissertação.

A Professora Fernanda Paulini pela ajuda imensa no desenvolvimento da análise histológica.

Ao Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos pelos espécimes cedidos para a realização da dissertação.

Aos meus pais e amigos mais próximos que assistiram todas as apresentações e leram as versões da dissertação.

A minha psicóloga e psiquiatra, sem elas não conseguiria concluir o trabalho.

E especialmente a Prof. Julia por me orientar, me apoiar e me ajudar a conseguir trabalhar com o que realmente gosto

## Conteúdo

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<i>FOLHA NASAL DE MORCEGOS.....</i>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>11</b>
ABSTRACT: .....	11
INTRODUÇÃO .....	12
MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
<i>Material Analisado.....</i>	16
<i>Medidas Corporais.....</i>	18
<i>Crânios.....</i>	19
<i>Dados ecológicos.....</i>	21
<i>Filogenia.....</i>	23
ANÁLISES .....	23
<i>Análise Morfométrica da Folha Nasal.....</i>	23
<i>Análise Morfométrica dos Crânios.....</i>	23
<i>Análises Filogenéticas Comparativas.....</i>	23
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO .....	34
REFERÊNCIAS .....	38
<b>CAPITULO 2 .....</b>	<b>43</b>
ABSTRACT .....	43
INTRODUÇÃO .....	44
MATERIAL E MÉTODO .....	47
<i>Análise histológica da Folha Nasal.....</i>	47
<i>Protocolo.....</i>	47
RESULTADOS.....	48
<i>Artibeus lituratus.....</i>	49
<i>Anoura geoffroyi.....</i>	51
DISCUSSÃO .....	55
REFERÊNCIAS .....	58
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>62</b>

**Resumo****Forma, função e evolução da folha nasal em Phyllostomidae****(Mammalia, Chiroptera)**

Luisa de Souza Aguiar Machado

Orientadora: Julia Klaczko

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

A família Phyllostomidae é composta por 56 gêneros e 214 espécies. É exclusiva da região Neotropical e engloba todas as guildas tróficas presentes na ordem dos mamíferos, com exceção de carniceiros. Um caráter distintivo dos morcegos da família Phyllostomidae é a presença de uma folha nasal, que apesar de ser um caráter conspícuo da família, tem morfologia e função ainda não totalmente esclarecidas. A folha nasal é comumente associada à ecolocalização. Assim, descrevemos a variação da forma da folha nasal, relacionando-a a variáveis ecológicas, morfológicas e filogenéticas, e descrevemos a composição histológica das folhas, evidenciando a estrutura tecidual da folha nasal bem como a presença de células e tecidos indicativos de função sensorial para a folha nasal.

Palavras-chave: Folha Nasal; Corpo Neuronal; Sinal Filogenético; Função Sensorial; Morfometria Geométrica; Histologia.

Brasília  
Agosto/ 2021

**Abstract****Forma, função e evolução da folha nasal em Phyllostomidae****(Mammalia, Chiroptera)**

Luisa de Souza Aguiar Machado

Orientadora: Julia Klaczko

*Abstract* da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

The Phyllostomidae family comprises 56 genera and 214 species and is exclusive to the Neotropical region. It encompasses all trophic guilds present in the Mammalia order, with the exception of scavengers. A distinctive feature of bats of this family is the presence of a nose leaf, which despite being a conspicuous character of the family has its morphology and function not fully understood yet. The nose leaf is commonly associated with echolocation. Thus, we describe the variation in the nose leaf shape relating it to ecological, morphological and phylogenetic variables, and describe the nose leaf histological composition showing the tissue structures as well as the presence of cells and tissues indicative of sensory function of the nasal leaf.

**Keywords:** Chiroptera; Nose Leaf; Neuronal Body; Phylogenetic Signal; Sensory Function; Geometric Morphometry.

Brasília

Agosto/ 2021

## **Introdução**

Morcegos são mamíferos pertencentes à ordem Chiroptera, que é caracterizada pela ampla distribuição e alta diversidade de espécies (Fenton e Simmons, 2015). Morcegos são os únicos mamíferos que realizam o voo verdadeiro (Nowak 1999) e possuem um sistema de orientação para navegar no escuro denominado ecolocalização. A ecolocalização é um sistema bastante complexo que se difere entre os morcegos pelo meio de emissão do som, que pode ser via nasal, laringe ou click da língua, além de possuir uma variação de chamados e frequências. Por meio dela, diversas vantagens evolutivas foram alcançadas pelo grupo, como a grande irradiação das espécies e a ocupação de diversos nichos ecológicos (Griffin 1958; Moss e Sinha, 2006). A ecolocalização dos morcegos varia bastante entre as espécies, apresentando diferenças na frequência, intensidade, e intervalo entre os chamados, que variam de acordo com as famílias, subfamílias e espécies, dependendo do comportamento de forrageamento (Kalko e Schnitzler, 1993).

Em uma revisão molecular recente da ordem dos quirópteros foram reconhecidos dois grandes grupos monofiléticos denominados Yangochiroptera (que corresponde ao antigo Microchiroptera), que inclui um extenso número de famílias além do Velho Mundo, e Yinpterochiroptera, que inclui os Pteropodidae e Rhinolophoidea (Teeling et al. 2005). Yangochiroptera é o grupo que engloba a maioria das famílias de morcegos, incluindo a Phyllostomidae. Essa família é a mais conspícua, originária e endêmica da região Neotropical (Teeling et al. 2002; Paglia et al. 2012).

A família Phyllostomidae é extremamente diversa, com cerca de 56 gêneros e 214 espécies reconhecidas, o segundo maior número de espécies

dentre os morcegos (Teeling et al. 2002; Paglia et al. 2012; Simmons, 2005; Burgin et al. 2018). Os morcegos dessa família apresentam ampla variação de forma, tamanho e dieta, com espécies hematófagas, frugívoras, carnívoras, nectarívoras e insetívoras (Gardner, 1977; Villalobos e Arita, 2010). Essa diversidade de guildas tróficas torna os morcegos Phyllostomidae, componentes fundamentais da diversidade neotropical, pois apresentam a maior diversidade alimentar já observada em qualquer família de mamíferos (Gardner, 1977). Essa grande variação torna também a história evolutiva da família, sua radiação e especializações bastante únicas dentro da evolução do grupo Chiroptera (Freeman, 2000).

O monofiletismo da família é corroborado por uma série de estudos, e a relação entre as espécies vem sendo testada por filogenias utilizando caracteres morfológicos e moleculares (Wetterer et al. 2000; Teeling et al. 2005; Botero-Castro et al. 2013; Rojas et al. 2016; Amador et al. 2018). Um caráter distintivo dos Phyllostomidae é a presença de uma estrutura anatômica formada por tecido mole e cartilagem, ligada a cavidade nasal, com grande variação de forma e tamanho, dividida em duas grandes estruturas primárias: uma base em forma de ferradura e uma lança vertical conectada a essa base. (Schnitzler e Grinnel, 1977; Arita, 1990) chamada folha nasal (Fenton e Simmons, 2014). Ainda que algumas famílias do Velho Mundo (Hipposideridae, Rhinolophidae, e Megadermatidae) apresentem uma estrutura de folha nasal similar a dos Phyllostomidae, a estrutura embrionária (Gobbel, 2002) e externa (Arita, 1990) são mais complexas e diferentes. Apesar de ser um caráter conspícuo de uma família tão rica em espécies, a morfologia e a função da folha nasal permanecem pouco esclarecidas (Fenton, 1984; Novick, 1977), sendo

relacionada primordialmente como um órgão de auxílio na emissão sonora. (Hartley e Suthers, 1987; Kuc, 2010; Vanderelst, 2010).

#### *Folha nasal de morcegos*

Os Phyllostomidae são emissores nasais de som (Hartley e Suthers, 1987) apesar da possibilidade de algumas espécies também emitirem som via bucal (Gessinger et al., 2016), o que sugere uma possível associação entre a estrutura da folha nasal e o tipo de ecolocalização das espécies da família. Já foi demonstrado, por meio de experimentos com a espécie *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758) que a folha nasal influencia na emissão e direcionalidade da ecolocalização, e quando bloqueada em determinados pontos de sua estrutura, a emissão do som é alterada, bem como sua direcionalidade (Hartley e Suthers, 1987). Experimentos com as espécies *Micronycteris microtis* e *Phyllostomus discolor*. também indicaram o uso da folha nasal para a ecolocalização. A utilização da folha nasal pode variar de acordo com a espécie e provavelmente com seu nicho ecológico (Vanderelst et al. 2010), e também está associada a outros fatores ecológicos como comportamento de forrageamento, que varia de acordo com o tipo de recurso alimentar de cada espécie e uso de habitat (Schnitzler e Grinnell, 1977; Kuc, 2010; Vanderelst, 2010;). Indo um pouco além, Leiser-Miller e Santana (2020) encontraram, não apenas relação entre aspectos morfológicos da folha nasal e o padrão de emissão acústica, mas sugeriram uma associação entre a folha nasal e o tipo de forrageamento de cada espécie, ressaltando que morcegos Phyllostomidae se utilizam de outros órgãos sensoriais para localizar presas e se movimentarem.

Se as espécies de morcegos forrageiam de maneiras diferentes, as variações interespecíficas na morfologia facial podem refletir o papel da folha

nasal não apenas na ecolocalização, mas também no forrageamento. Análises morfológicas posteriores ao estudo de Arita (1990) demonstraram a relação entre ecolocalização, forrageamento e morfologia da folha nasal (Bogdanowicz et al. 1997). Autores como Belwood (1998) e Neuweiler (1984) já sugeriam a correlação entre a ecologia trófica, a morfologia da folha nasal e a capacidade de ecolocalização com o comportamento de forrageamento e habitat. A associação da variação de forma com a ampla diversificação de guildas alimentares da família Phyllostomidae demonstrada por Arita (1990) e as associações entre a forma, função e ecologia da folha nasal demonstrada por outros autores trazem indicações do uso da folha nasal para as espécies. Entretanto ainda existem lacunas no conhecimento das possíveis funções dessa estrutura bem como demonstrações de quais outras variáveis, como morfologia das espécies, ou parentesco entre elas poderiam influenciar a variação da forma da folha nasal.

Eiting et al. (2014) avaliaram em laboratório o fluxo de ar dentro da cavidade nasal e as diferenças neuroanatômicas no sistema olfatório das espécies *Mimon crenulatum*, *Anoura geoffroyi*, *Carollia perspicillata*, *Artibeus jamaicensis*, *Glossophaga soricina* e *Macrotus waterhousii*. A cavidade nasal e a folha nasal estão relacionadas não somente com percepção olfatória, uma vez que a folha se encontra ligada às narinas com inserções musculares que prendem a estrutura ao osso nasal. Aspectos histológicos da face de morcegos norte americanos, incluindo a folha nasal das espécies de Phyllostomidae das subfamílias Phyllostominae, Glossophaginae, Carollinae, Stenodernatinae e Desmodontinae (Dalquest e Werner, 1954), demonstraram a presença de termo receptores para frio e calor em *Desmodus rotundus*, uma espécie de morcego



hematófaga, que se alimenta de presas quentes, sugerindo o uso desses termo receptores para a localização de presas e a identificação dos locais mais apropriados para a mordida e o consumo do sangue (Kürten e Schmidt, 1982; 1984); demonstraram também que a estrutura histológica e óssea da folha nasal de morcegos do Velho Mundo e Phyllostomidaes são estruturas ontogeneticamente distintas, devido à história evolutiva dos grupos (Göbbel, 2002). Assim, a histologia contribui com o aumento de dados acerca da composição celular da folha nasal e sua estrutura histológica, auxiliando na elucidação da função dessa estrutura tão conspícua e tão pouco estudada.

Dentro deste contexto, esse trabalho pretende averiguar e responder (1) por que as folhas nasais possuem uma variação de forma tão ampla; (2) quais fatores influenciam a variação da forma das folhas nasais; (3) as variáveis que possuem mais relação com a história evolutiva da família, como dieta, habitat, história filogenética, também influenciam a forma da folha nasal? (4) A folha nasal poderia ter função sensorial além de ser auxiliadora na emissão e recepção da ecolocalização? Por isso foram testadas as seguintes hipóteses: (a) a variação da forma da folha nasal está relacionada à filogenia das espécies, ou seja, espécies mais aparentadas vão apresentar folhas nasais de formas similares; (b) a forma da folha estaria relacionada com o tamanho dos morcegos (antebraço e cabeça-corpo). Assim, morcegos grandes teriam folhas nasais grandes enquanto morcegos pequenos teriam folhas nasais pequenas, e estas seriam diferentes entre si; (c) a variação da forma da folha nasal está relacionada a dieta e habitat, ou seja morcegos com dieta semelhante que vivem em habitats semelhantes têm folhas nasal semelhantes; (4) A morfologia craniana está relacionada com a morfologia da folha nasal em Phyllostomidaes,

ou seja, crânios grandes tem folhas nasais grandes e pequenos folhas pequenas; (5) Se a folha nasal serve como uma estrutura receptora de som, ela teria células nervosas em sua estrutura, indicando essa função sensorial?.

### **Objetivos**

Assim, são objetivos gerais desse trabalho descrever e avaliar a variação nas folhas nasais, e como objetivos específicos:

a. Descrever a variação da forma da folha nasal em espécies da família Phyllostomidae por meio da morfometria geométrica utilizando métodos de Análise da Elipse de Fourier (EFA).

b. Descrever a variação da forma do crânio em Phyllostomidae

c. Testar relação entre a folha nasal e morfologia corporal: tamanho cabeça-cauda, tamanho de antebraço e morfologia craniana.

d. Testar a relação entre variação da forma da folha nasal e fatores ecológicos: dieta e habitat

e. Quantificar o sinal filogenético das folhas nasais, averiguando a importância dos processos de especiação com a diversificação da forma.

f. Relacionar a variação da forma da folha com possíveis funções da folha nasal.

g. Realizar uma análise histológica para descrever a composição tecidual e celular da folha nasal das espécies: *Anoura geoffroyi* e *Artibeus lituratus*, a fim de verificar a possível presença de células nervosas que indiquem uma função sensorial do aparato.

Como está organizada a dissertação

Esta dissertação foi organizada em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda a variação da forma da folha nasal utilizando morfometria geométrica e quais variáveis estão relacionadas à essa variação, enquanto o segundo capítulo consiste em uma análise histológica da folha nasal, fazendo uma descrição estrutural e tecidual.

## Referências

- Amador LI, Arévalo RLM, Almeida FC, Catalano AS & Giannini NP 2018 Bat Systematics in the Light of Unconstrained Analyses of a Comprehensive Molecular Supermatrix. *J Mamm Evol.* 25: 37–70.
- Arita HT 1990 Noseleaf morphology and ecological correlates in phyllostomatid bats. *Journal of Mammalogy* 71: 36–47.
- Belwood JJ 1988. Foraging Behavior, Prey Selection, and Echolocation in Phyllostomine Bats (Phyllostomidae). In: Nachtigall P.E., Moore P.W.B. (eds) *Animal Sonar. NATO ASI Science (Series A: Life Sciences)*, vol 156. Springer, Boston, MA
- Bogdanowicz W, Csada RD & Fenton MB 1997 Structure of noseleaf, echolocation, and foraging behavior in the Phyllostomidae (Chiroptera). *Journal of Mammalogy* 78: 942–953.
- Botero-Castro F, Tilak MK, Justy F, Catzeflis F, Delsuc F & Douzery EJ 2013 Next-generation sequencing and phylogenetic signal of complete mitochondrial genomes for resolving the evolutionary history of leaf-nosed bats (Phyllostomidae), *Mol. Phylogenet. Evol.* 69: 728-739.
- Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL & Upham NS 2018. How many species of mammals are there? *J. Mamm.* 99, 1–14.
- Dalquest, W. W., & Werner, H. J. (1954). Histological aspects of the faces of North American bats. *Journal of Mammalogy*, 35(2), 147-160.
- Eiting TP, Smith TD & Dumont ER. 2014. Olfactory epithelium in the olfactory recess: a case study in New World Leaf-nosed Bats. *Anat Rec* 297: 2105–2112.

- Fenton MB 1984 Echolocation: implications for ecology and evolution of bats. *Q Rev Biol* 59:33–53
- Fenton MB & Simmons NB 2015: *Bats. A World of Science and Mystery*. University of Chicago Press, Chicago, 240 pp
- Freeman PW 2000 Macroevolution in Microchiroptera: recoupling morphology and ecology with phylogeny. *Evolutionary Ecology Research* 2, 317–335.
- Gardner AL 1977 Feeding habits. *Special Publications of the Museum, Texas Tech University* 13, 293–350.
- Gessinger G, Gonzalez-Terrazas TP, Page RA, Jung Kirsten & Tschapka M 2019 Unusual Echolocation Behaviour of the Common Sword-Nosed Bat *Lonchorhina Aurita*: An Adaptation to Aerial Insectivory in a Phyllostomid Bat? *Royal Society Open Science* 6 (7): 182165.
- Griffin DR 1958 *Listening in the Dark: The Acoustic Orientation of Bats and Men*. New Haven, CT: Yale University Press.
- Hartley DJ & Suthers RA 1987. The sound emission pattern and the acoustical role of the noseleaf in the echolocating bat, *Carollia perspicillata*. *Journal of the Acoustical Society of America* 82: 1892–1900.
- Kalko EKV & Schnitzler HU 1993 Plasticity in echolocation signals of European pipistrelle bats in search flight: implications for habitat use and prey detection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 33: 415–428.
- Kürten L and Schmidt U 1982 Thermoperception in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J Comp Physiol* 146: 223–228
- Kürten L, Schmidt U & Schäfer K 1984 Warm and cold receptors in the nose of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Naturwissenschaften* 71:327
- Kuc R 2010 Morphology suggests noseleaf and pinnae cooperate to enhance bat echolocation. *J Acoust Soc Am* 128: 3190–3199.
- Leiser-Miller LB & Santana SE. 2020 Morphological diversity in the sensory system of phyllostomid bats: implications for acoustic and dietary ecology. *Funct Ecol.* 34 (7): 1416-1427.

- Moss, C. F., & Sinha, S. R. (2003). Neurobiology of echolocation in bats. *Current opinion in Neurobiology*, 13(6), 751-758.
- Neuweiler G .1984 Foraging ecology and audition in bats. *Naturwissenschaften*,71:446-455.
- Novick, A. 1977. Acoustic orientation, in *Biology of Bats*, W.A. Wimsatt, ed., vol. III, Academic Press, New York.
- Nowak RM 1999 *Walker's Mammals of the World (Volume 1)*. 6th Edition, Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1166-1170.
- Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG, Leite YLR, Costa LP, Siciliano S, Kierulff MCM, Mendes SL, Tavares VC, Mittermeier RA & Patton JL 2012 Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. *Occasional Papers in Conservation Biology*, 6: 1–76.
- Rojas D, Warsi OM, Dávalos LM 2016 Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant Neotropical diversity. *Syst Biol* 65(3): 432–448
- Simmons NB 2005 Order Chiroptera. In *Mammal Species of the World, a Taxonomic and Geographic Reference* (eds. D. E. Wilson and D. M. Reeder), pp. 312–529. Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
- Schnitzler HU & Grinnell AD 1977. Directional sensitivity of echolocation in horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. I. Directionality of sound emission. *Journal of Comparative Physiology* 116: 51–61.
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ & Murphy WJ 2005 A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307: 580–584.
- Teeling EC, Madsen O, Van Den Bussche RA, de Jong WW, Stanhope MJ & Springer MS 2002 Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats, *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1431-1436.
- Vanderelst D, De Mey F, Peremans H, Geipel I, Kalko EKV & Firzlaff U 2010 What noseleaves do for FM bats depends on their degree of sensorial specialization. *PLoS ONE* 5: e11893.

Villalobos F & Arita HT 2010 The diversity field of New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae). *Glob. Ecol. Biogeogr.* 19: 200–211.

Wetterer, A.L., M.V. Rockman and N.B. Simmons. 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia, Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 248:1–200

## Capítulo 1

### A INFLUÊNCIA DA FILOGENIA E DIETA NA VARIAÇÃO DA FORMA DA FOLHA NASAL

Luisa S Aguiar-Machado, Leticia Guimarães, Ludmilla M S Aguiar e Julia Klaczko

Intenção de submissão para a revista *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*

#### Abstract:

A folha nasal dos morcegos Phyllostomidae é o caráter diagnóstico da família. Mesmo sendo um caráter tão significativo para demarcar essa família, as forças evolutivas que atuam na complexidade e variação de forma e tamanho da folha nasal continuam desconhecidas. Por meio do método de Análise de Elipses de Fourier (EFA) descrevemos a variação da forma da folha nasal e as relações com variáveis ecológicas, morfológicas e filogenéticas. Verificamos que a variação da forma da folha está relacionada com a variação dieta, filogenia do grupo e mostra uma tendência a ter relação com a forma do crânio. Assim, demonstramos que a variação da forma da folha nasal vai além de uma participação na emissão e recepção de som. A variação da forma da folha está associada com a variação na dieta, filogenia e crânio dos morcegos Phyllostomidae.

**Keywords:** Chiroptera, morfologia, morfometria geométrica, análise de Fourier, análise de componente principal.

## Introdução

Morcegos Phyllostomidae são reconhecidos pela estrutura conspícua da folha nasal (Figura 1). Apesar de existirem famílias do velho mundo com folha nasal (Rhinolophidae, Hipposideridae, Rhinopomatidae, Megadermatidae e Nycteridae) a complexidade da folha nasal dos Phyllostomidae, sua história evolutiva e sua ampla variedade em forma e tamanho se diferem bastante das famílias do Velho Mundo (Gobbel, 2002). As forças evolutivas que levaram a essa maior complexidade estrutural (Gobbel, 2002) e que ainda atuam na manutenção da variação de forma e tamanho da folha nasal, ainda não são amplamente conhecidas e estudadas. A folha nasal dos Phyllostomidae pode ser dividida em duas estruturas principais: uma base fixa no rosto em forma de ferradura e uma livre em forma de lança vertical ligada á essa base (Schnitzler e Grinnel, 1977).

Os primeiros estudos com folha nasal investigaram a orientação acústica dos morcegos neotropicais e mostraram as características dos chamados de ecolocalização e as formas de emissão do som. Estes estudos sugeriram que a folha nasal teria uma função na emissão do som uma vez que Phyllostomidae são emissores nasais (Griffin e Novick 1955; Novick 1963, 1977). Outros trabalhos posteriores demonstraram experimentalmente que a folha nasal, além do papel de auxiliar na emissão do som nasal, deixava esses chamados mais eficientes em comparação com os chamados em ausência da folha nasal. Essa eficiência foi demonstrada experimentalmente por meio do bloqueio da folha nasal, e foi observado uma variação na eficiência da ecolocalização dos emissores nasais (Hartley e Suthers, 1987; Bogdanowicz et al, 1999; Vanderelst et al. 2010; Zhuang e Müller, 2006; Brinkløv et al, 2011). Com o avanço do



entendimento de padrões de emissão sonora dos chamados de ecolocalização dos Phyllostomidae, observou-se que a variação dos chamados não corresponde à grande variação de forma e tamanho das folhas nasais (Belwood, 1988). Assim, outras perguntas surgiram acerca da folha nasal e sua função, uma vez que, se a folha nasal possuísse funções apenas relacionadas com a ecolocalização, essa correlação ainda não explicava a grande variação de formas das folhas.

Estudos começaram a surgir procurando outras variáveis que poderiam estar associadas a variabilidade da forma da folha e que pudessem elucidar outras funções desse caráter. O primeiro estudo comparativo da morfologia da folha nasal em Phyllostomidae (Arita, 1990) utilizou sete medidas lineares para descrever a variação da forma das folhas, sugerindo uma relação entre o tamanho e a forma com a dieta das espécies analisadas. Esse mesmo autor também sugeriu uma possível função da folha nasal, relacionada ao tipo de forrageamento das espécies, uma vez que as espécies utilizam a emissão de som para navegar (ecolocalização), o que foi também estudado por Bogdanowicz (1999) e por Leiser-Miller e Santana (2020).

A variação da função da folha nasal também foi abordada a luz da relação entre filogenia e forma (Bogdanowicz et al, 1999; Wetterer et al, 2000; Leiser-Miller e Santana, 2020) e associação entre a morfologia e função sensorial olfativa (Brokaw e Smotherman 2020), uma vez que morcegos Phyllostomidae se utilizam de outros sentidos, além da ecolocalização, para navegar e forragear. Outras associações foram propostas com os caracteres morfológicos dos morcegos como tamanho corporal (Arita 1990; Bogdanowicz et al, 1999); estrutura da orelha (Kuc 2010; Leiser-Miller e Santana 2020); e forma craniana

(Pedersen, 1998), que é um conjunto de caracteres morfológicos que pode refletir a variação alimentar da família (Monteiro e Nogueira, 2011; Freeman 2000; Wetterer 2000). A variação da forma do crânio está relacionada com a filogenia, sendo um caráter morfológico importante na história evolutiva da família, possuindo adaptações morfológicas que possibilitaram uma grande variedade na guilda trófica da família (Freeman, 2000; Monteiro e Nogueira, 2011; Hedrick e Dumont, 2018; Rossoni et al. 2019).

Uma análise ampla da filogenia de Phyllostomidae ainda é necessária (Shi e Rabosky, 2015) carecendo de maior representatividade de espécies. Análises que incluam mais espécies, com maior número amostral, tornarão possível inferências mais robustas sobre a evolução da forma, com que permitam correlacionar a variação presente nas folhas nasais com os fatores filogenéticos, ecológicos, biológicos, propiciando uma melhor compreensão da história evolutiva da folha nasal (Arita 1990, Leiser-Miller e Santana, 2020).

Uma ferramenta de análise de formas é a morfometria geométrica, uma técnica amplamente utilizada para descrever a variação na forma de estruturas biológicas, sendo uma ferramenta importante para estudos de evolução (Monteiro e Nogueira, 2011;2010). A morfometria geométrica utiliza marcos anatômicos homólogos gerando coordenadas cartesianas para as análises estatísticas da variação da forma e sua covariação com outras variáveis (Bookstein, 1991). Essa técnica já foi amplamente utilizada em morcegos para avaliar a relação entre forma de asa e tipo de voo (Birch, 1997), relação entre estrutura e função pulmonar (Maina e King, 1991), relação morfométricas de dentes (Jansky et al. 2016), dentre outras variações de estruturas e suas variadas relações.

A análise da Elipse de Fourier utiliza o contorno das estruturas para verificar a variação na forma, ao invés de marcos anatômicos, utilizados na morfometria geométrica clássica (Crampton, 1995). Esse método possibilita o estudo de estruturas que não possuem marcos anatômicos homólogos por terem grande variação em sua forma, por serem estruturas moles, sem suturas, ou estruturas muito complexas (Crampton, 1995).

Nesse estudo, realizamos análise morfométrica de folhas nasais, utilizando o método de Análise de Elipses de Fourier (EFA), para (a) descrever a variação da forma da folha nasal, (b) testar a relação da forma da folha nasal com variáveis ecológicas (dieta e habitat) e morfológicas (tamanho corporal e forma do crânio), (c) medir o sinal filogenético da variação da folha (d) descrever a forma do crânio utilizando a morfometria geométrica tradicional e (e) testar se há associação entre a variação morfológica dos crânios e a variação da forma das folhas nasais.

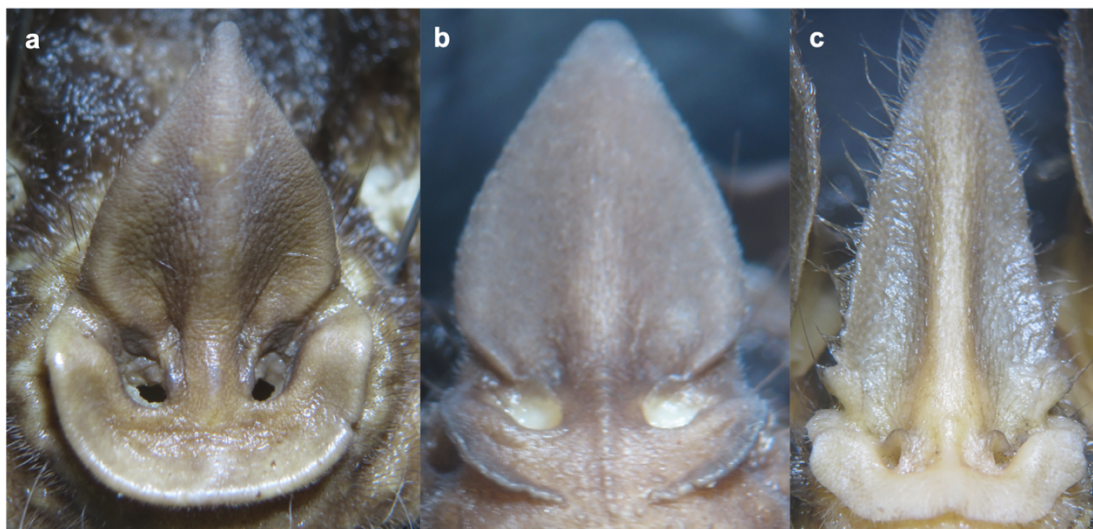


Figura 1. Fotos frontais de folhas nasais de *Phyllotomus hastatus* (a), *Anoura geoffroyi* (b) e *Mimon crenulatum* (c) representando a diversificação morfológica encontrada na folha nasal.

## Materiais e Métodos

### *Material Analisado*

#### *Folha Nasal*

Foram utilizados 139 indivíduos adultos (Anexo 3) preservados em álcool, totalizando 35 espécies identificadas de acordo com a Chave de identificação dos morcegos da América do Sul (Díaz, et al 2016), (Tabela 1). Os espécimes são provenientes da coleção de morcegos do Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos da UnB e do Museu Americano de História Natural.

Tabela 1. Espécies, números de indivíduos, sexo e idade dos espécimes utilizados para análises da forma da folha nasal.

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>Nº de Femeas e Machos</b>
<i>Anoura caudifer</i>	5	3F e 2M
<i>Anoura geoffroyi</i>	5	1F e 4M
<i>Artibeus concolor</i>	2	2F e 0M
<i>Artibeus fimbriatus</i>	3	1F e 2M
<i>Artibeus lituratus</i>	5	1F e 4M
<i>Artibeus obscurus</i>	5	0F e 5M
<i>Artibeus planirostris</i>	5	2F e 0M
<i>Carollia perspicillata</i>	5	0F e 5M
<i>Chiroderma doriae</i>	5	2F e 3M
<i>Chiroderma villosum</i>	1	1F e 0M
<i>Chrotopterus auritus</i>	5	3F e 2M
<i>Desmodus rotundus</i>	5	2F e 3M
<i>Diaemus youngi</i>	1	0F e 1M
<i>Diphylla ecaudata</i>	5	2F e 3M
<i>Glossophaga soricina</i>	5	1F e 4M
<i>Glyphonycteris benhii</i>	2	2F e 0M
<i>Glyphonycteris sylvestris</i>	1	0F e 1M
<i>Lonchophylla dekeyseri</i>	5	3F e 2M
<i>Lonchorhina aurita</i>	2	1F e 1M
<i>Lophostoma carrikeri</i>	3	2F e 1M

<i>Micronycteris minuta</i>	5	0F e 5M
<i>Micronycteris microtis</i>	5	1F e 4M
<i>Micronycteris schmidtorum</i>	5	4F e 1M
<i>Mimon bennettii</i>	5	1F e 4M

Tabela 1 - continuação

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Individuos</b>	<b>Nº de Femeas e Machos</b>
<i>Phyllostomus discolor</i>	4	2F e 2M
<i>Phyllostomus elongatus</i>	1	0F e 1M
<i>Phyllostomus hastatus</i>	5	3F e 2M
<i>Platyrrhinus incarum</i>	5	3F e 2M
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	5	2F e 3M
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	3	2F e 1M
<i>Rhinophylla pumilio</i>	1	1F e 0M
<i>Sturnira liliium</i>	5	3F e 2M
<i>Sturnira tildae</i>	4	2F e 2M
<i>Tonatia bidens</i>	1	0F e 1M
<i>Trachops cirrhosus</i>	5	1F e 4M
<i>Vampyressa pusilla</i>	5	0F e 5M

A face dos espécimes foi fotografada de modo padronizado em laboratório, utilizando uma câmera (Canon DS 126171) acoplada a uma mesa fotográfica. Os contornos das folhas nasais foram obtidos a partir das imagens, no programa *tpsDig2* 1.1 (Rohlf, 2015). Em cada contorno, foram estabelecidos 300 marcos igualmente distribuídos automaticamente pelo programa TPS. (Figura 2), e suas coordenadas gravadas em TPS.

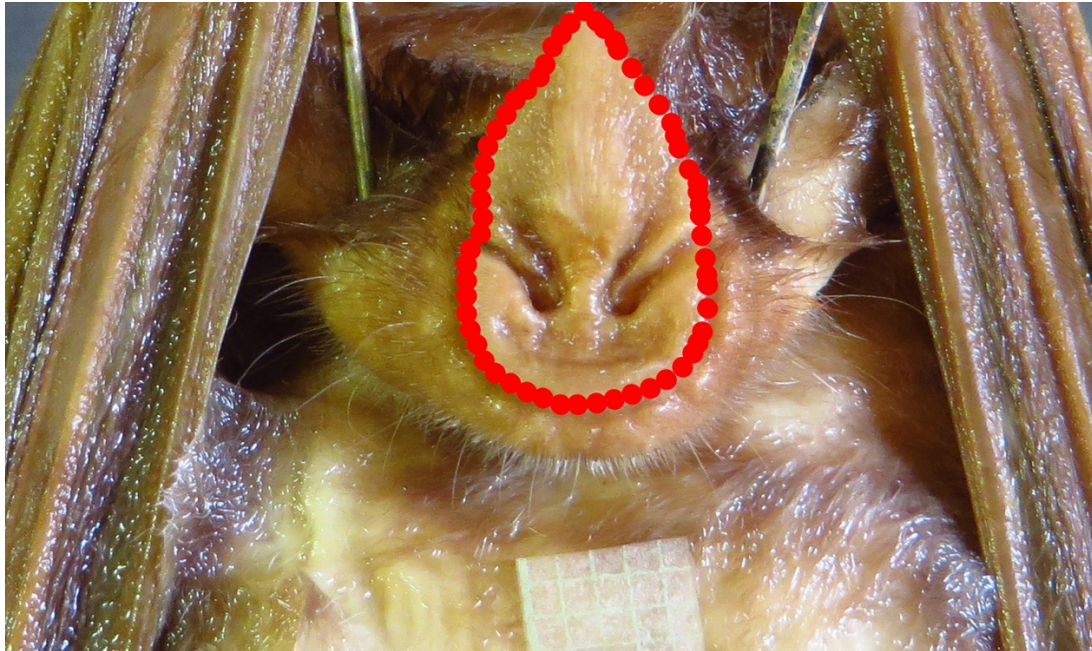


Figura 2. Foto da folha nasal de *Phyllostomus hastatus* com pontos representando os marcos anatômicos feitos no contorno da folha no programa TPS. Escala: 1mm

#### *Medidas Corporais*

Os espécimes utilizados foram os mesmos espécimes fotografados para os dados de morfometria da folha nasal. Duas medidas de tamanho de cada espécime, foram tomadas com uso de paquímetro analógico: (a) cabeça-corpo, incluindo a cauda quando presente e (b) antebraço (Figura 3).

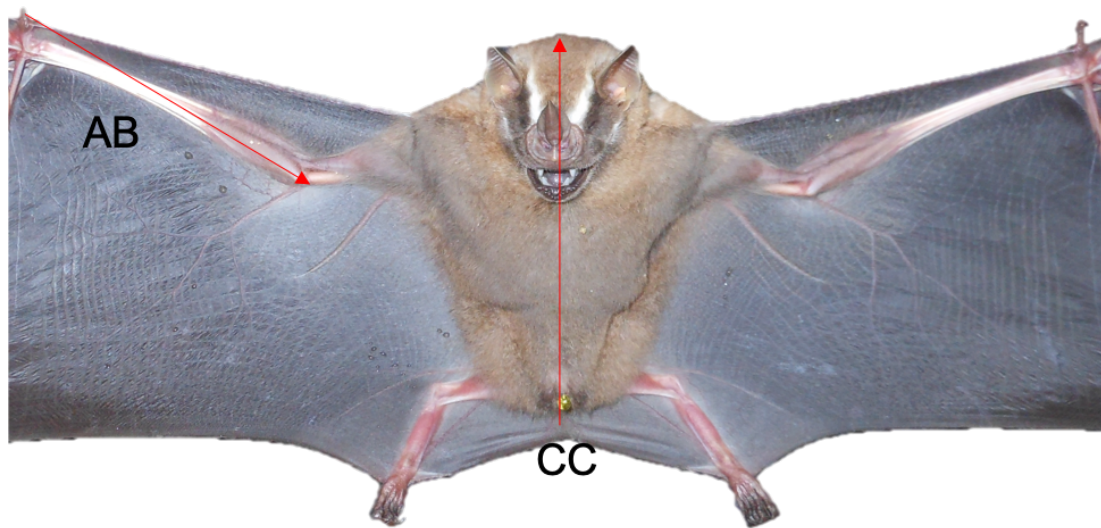


Figura 3. Foto ventral de *Artibeus lituratus* para demonstração das medidas morfológicas de **AB**= antebraço e **CC**= cabeça-corpo com inclusão da cauda quando presente. Foto cedida por Renato Rosa. Tamanho corporal do indivíduo: 91mm.

### Crânios

Foram utilizados 104 indivíduos adultos (Anexo 2) totalizando 28 espécies (Tabela 2) provenientes da coleção de morcegos do Laboratório de Biologia e Conservação de Morcegos da UnB. Entre as espécies utilizadas, havia pelo menos dois indivíduos para representar cada uma das guildas (frugívoros, insetívoros, carnívoros, onívoros, nectarívoros e hematófagos) presentes na família Phyllostomidae

Tabela 2. Espécies utilizadas para análise morfométrica da forma dos crânios e o número de indivíduos para cada espécie.

<b>Espécie</b>	<b>Nº de Indivíduos</b>	<b>Nº de Fêmeas e Machos</b>
<i>Anoura caudifer</i>	3	1F e 2M
<i>Anoura geoffroyi</i>	5	0F e 4M
<i>Artibeus lituratus</i>	5	0F e 5M
<i>Artibeus concolor</i>	3	0F e 5M
<i>Artibeus obscurus</i>	4	1F e 3M
<i>Artibeus fimbriatus</i>	2	1F e 1M
<i>Artibeus planirostris</i>	3	0F e 3M
<i>Carollia perspicillata</i>	5	1F e 4M
<i>Chrotopterus auritus</i>	2	0F e 3M
<i>Desmodus rotundus</i>	4	0F e 4M
<i>Diphylla ecaudata</i>	4	0F e 4M
<i>Glossophaga soricina</i>	5	0F e 4M
<i>Lonchophylla dekeyseri</i>	5	0F e 5M
<i>Lonchorhina aurita</i>	3	0F e 3M
<i>Mimon bennettii</i>	4	0F e 4M
<i>Mimon crenulatum</i>	2	0F e 2M
<i>Phyllostomus discolor</i>	2	0F e 2M
<i>Phyllostomus hastatus</i>	3	0F e 3M
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	5	0F e 5M
<i>Sturnira lilium</i>	4	0F e 4M
<i>Trachops cirrhosus</i>	2	0F e 2M
<i>Chiroderma villosum</i>	4	3F e 1M
<i>Diaemus youngi</i>	4	1F e 3M
<i>Lonchophylla thomasi</i>	3	1F e 2M
<i>Micronycteris minuta</i>	3	2F e 1M
<i>Phyllostomus elongatus</i>	4	4F e 0M
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	3	1F e 2M
<i>Rhinophylla pumilio</i>	3	1F e 2M
<i>Sturnira tildae</i>	4	2F e 2M

Os crânios foram fotografados de forma padronizada, em vista lateral e em cada crânio, todas as fotos foram tiradas com a mesma configuração ISO, abertura e velocidade e a mesma distância. A câmera utilizada foi a Canon DS 126171 com a Canon EF 100mm. Foram digitalizados 10 marcos e 8 semi-



marcos (Figura 4) no programa TPSdig (Rohlf 2006), seguindo os marcos utilizados por Nogueira et al. (2009).

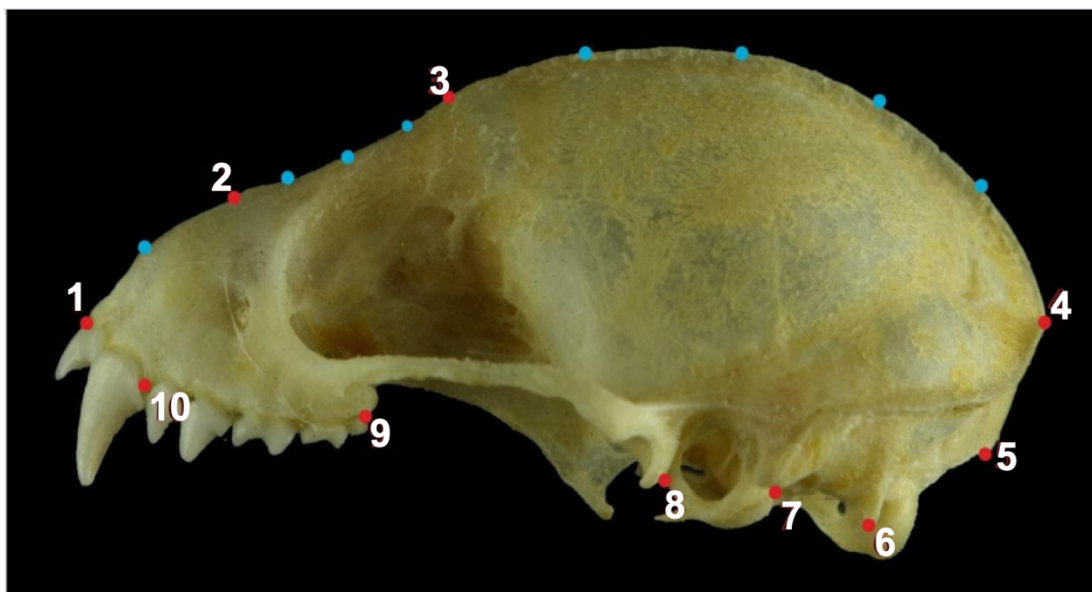


Figura 4. representação dos marcos (vermelho) e semimarcos (azul) utilizados, em crânio de *Sturnira lilium* em vista lateral esquerda. 1- ponto mais anterior do premaxilar; 2- ponto de inflexão entre a abertura nasal e o “teto” da região rostral; 3- ponto de inflexão entre a região rostral e cerebral 4- ponto mais posterior do crânio; 5- ponto mais posterior do forame magno; 6- processo paracondilar; 7- ponto posterior da região entre a bula auditiva e a região mastoide; 8- ponto anterior da intersecção entre a bula auditiva e o basicrânio; 9- ponto mais posterior do último molar superior; 10- ponto posterior do canino superior, no nível de inserção do osso maxilar.

#### *Dados ecológicos*

Os dados de dieta (Tabela 3) também foram categorizados de acordo com a dieta primária de cada espécie, já que as espécies costumam complementar suas dietas primárias com outros recursos. Os dados de dieta foram retirados de Gardner et al. (1977) e Paglia et al. (2012).

As categorias de habitat (Tabela 3) foram organizadas em “Mata”, “Cerrado” e “Caverna”, de acordo com Reis et al. (2007) e Paglia et al. (2012).

Sabendo que a grande maioria das espécies acabam transitando entre quase todas as categorias, selecionamos o(s) ambiente(s) de acordo com o maior índice de ocorrência e prevalência dessas espécies nesses habitats (Reis et al. 2007; Paglia et al. 2012).

Tabela 3. Dados de dieta e habitat por espécie.

<b>Espécie</b>	<b>Dieta</b>	<b>Habitat</b>
<i>Anoura caudifer</i>	Nectarívoro	F
<i>Artibeus concolor</i>	Nectarívoro	F e Ce
<i>Artibeus fimbriatus</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Anoura geoffroyi</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Artibeus lituratus</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Artibeus obscurus</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Artibeus planirostris</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Carollia perspicillata</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Chiroderma doriae</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Chiroderma villosum</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Chrotopterus auritus</i>	Carnívoro	F e Ce
<i>Desmodus rotundus</i>	Hematófago	F, Ce e Ca
<i>Diaemus youngi</i>	Hematófago	Ca
<i>Diphylla ecaudata</i>	Hematófago	Ca
<i>Glossophaga soricina</i>	Nectarívoro	F
<i>Glyphonycteris sylvestris</i>	Insetívoro	F
<i>Lonchophylla dekeyseri</i>	Nectarívoro	F e Ca
<i>Lonchorhina aurita</i>	Insetívoro	F e Ce
<i>Lophostoma carrikeri</i>	Insetívoro	F e Ce
<i>Micronycteris minuta</i>	Insetívoro	F
<i>Micronycteris microtis</i>	Insetívoro	F
<i>Micronycteris schmidtorum</i>	Insetívoro	F
<i>Mimon bennettii</i>	Insetívoro	F e Ce
<i>Phyllostomus discolor</i>	Onívoro	F
<i>Phyllostomus elongatus</i>	Onívoro	F
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Onívoro	F
<i>Platyrrhinus incarum</i>	Frugívoro	F e Ca
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Frugívoro	F e Ca
<i>Pygoderma bilabiatum</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Rhinophylla pumilio</i>	Frugívoro	F
<i>Sturnira liliium</i>	Frugívoro	F e Ce
<i>Sturnira tildae</i>	Frugívoro	F
<i>Tonatia bidens</i>	Insetívoro	F
<i>Trachops cirrhosus</i>	Carnívoro	F

### *Filogenia*

Para análise do sinal filogenético utilizamos a árvore filogenética proposta por Rojas et al. 2016 disponível em <https://treebase.org/treebase-web/search/study/summary.html?id=17602> e foi importada com o uso do pacote *Ape* em R (Paradis et al. 2004). A árvore foi cortada para conter apenas as espécies analisadas nesse estudo utilizando o pacote *Phytools* (Revell, 2012) em R.

### Análises

#### *Análise Morfométrica da Folha Nasal*

Uma vez obtidos os contornos, utilizamos o pacote *Momocs* em R (Bonhomme et al., 2014) para gerar as elipses que descrevem as formas das folhas nasais e gerar as harmônicas, que mostram quantas elipses são necessárias para descrever a forma. Em seguida, realizamos uma análise de componentes principais (PCA) utilizando os dados das elipses e harmônicas geradas. Os valores da PCA geraram o espaço da forma, onde a relação entre as espécies nesse espaço é utilizada para compreender quanto cada uma diverge uma da outra.

#### *Análise Morfométrica dos Crânios*

Para as análises morfométricas geométricas do crânio, realizamos uma Análise de Procrustes e Componentes Principais (PCA) usando o pacote *Geomorph* em R.

#### *Análises Filogenéticas Comparativas*

Todas as análises filogenéticas comparativas feitas no software R, utilizamos os pacotes *Geomorph* (Adams et al. 2020), *Ape* (Paradis et al. 2012) e *Phytools* (Revell 2012).

Calculamos o sinal filogenético forma da folha nasal, e da forma do crânio utilizando dois métodos: *lambda* (Paradis et al. 2004) e método “K” de Blomberg (Blomberg et al. 2003). Para visualizar a relação entre a filogenia *versus* a forma das folhas nasais e da forma dos crânios, a árvore filogenética foi plotada no espaço da forma de cada conjunto de dados.

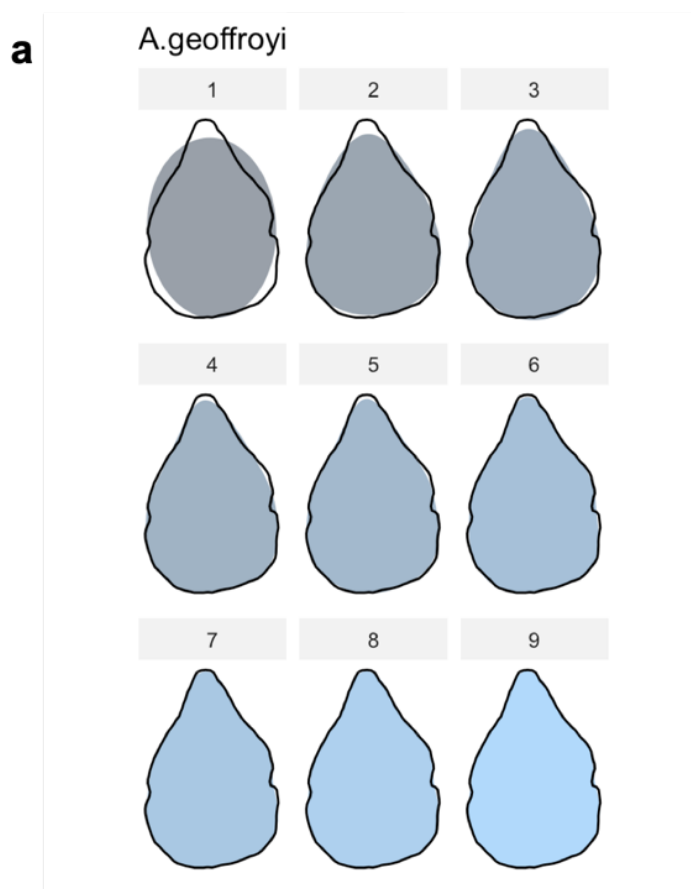
Para testar se a forma da folha nasal está relacionada com o tamanho dos indivíduos foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) filogenética da PCA da forma das folhas *versus* as medidas corporais log transformadas. Afim de testar se variação na forma da folha nasal está relacionada com os fatores ecológicos dieta e habitat, realizamos uma Análise de Variância (ANOVA) filogenética, comparando os dados morfológicos da folha com as categorizações de habitat e dieta de cada espécie.

Para descobrir se a forma da folha nasal está correlacionada à forma do crânio, fizemos uma análise de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para comparar os dados morfométricos entre a forma do crânio e a forma da folha nasal. A Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi proposta por H. Wold e é um método estatístico que faz uma regressão linear entre duas variáveis, a variável resposta e a independente, projetando-as em um novo espaço (Wold et al. 1987). Os dados utilizados para essa comparação são os dados das PCA's dos crânios e PCA's das folhas, que representam as medidas médias para cada espécie. Os dados de folha nasal foram reduzidos de acordo

com a quantidade de espécies totais presentes nos dados de morfometria dos crânios, totalizando 28 espécies para crânios e folhas nasais.

## Resultados

A análise de Elipses de Fourier resultou em nove elipses necessárias para gerar a forma das folhas nasais, gerando um painel de formas no qual a variação da forma pode ser percebida (Figura 5).



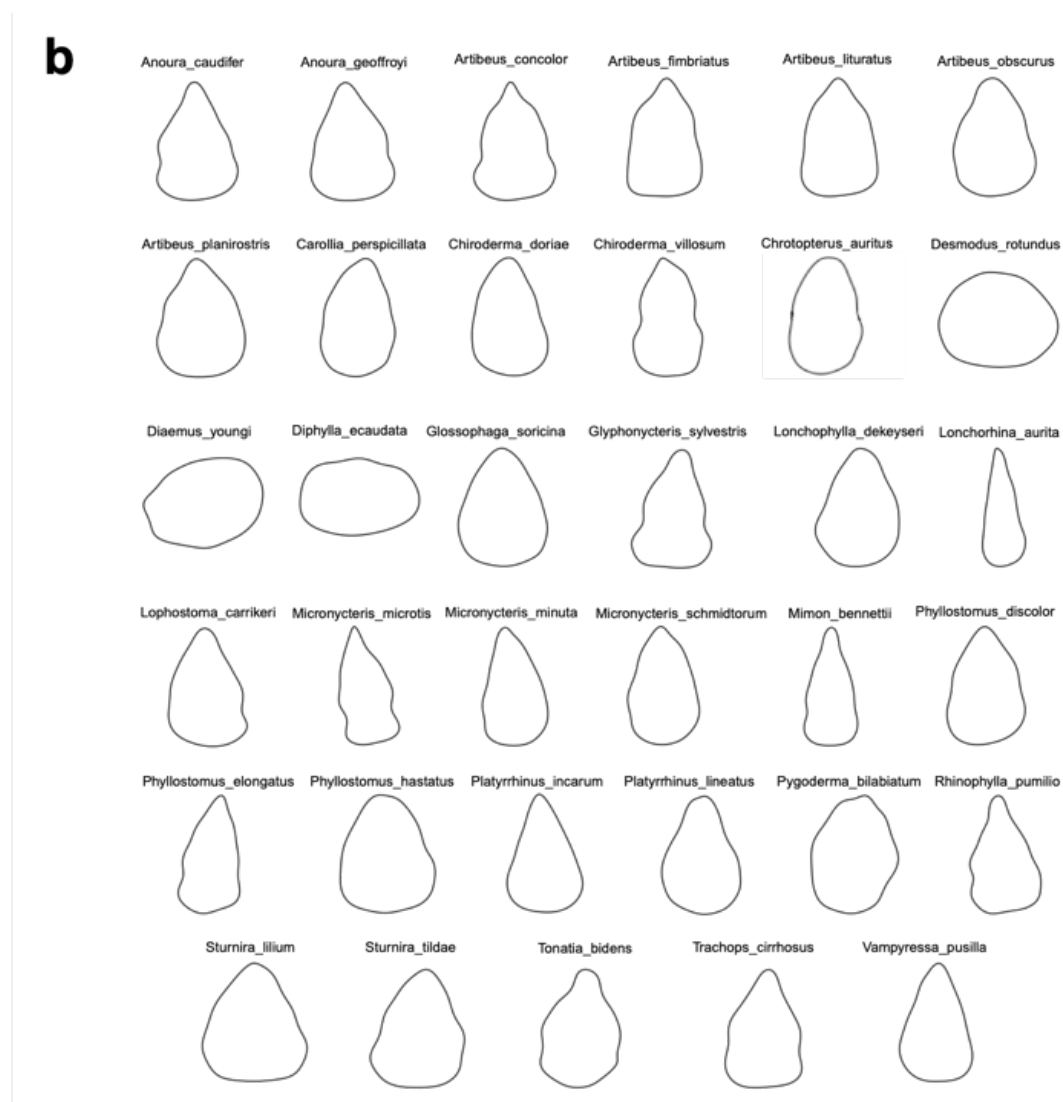


Figura 5. Elipses necessárias para gerar a forma da folha nasal em *Anoura geoffroyi* (a) e Média das formas das folhas nasais por espécie (b)

A análise do componente principal (PCA) da forma da folha (Figura 6) mostrou que os três primeiros componentes correspondem a 86,53% da variância dos dados, sendo 53,69% para o PC1 e 32,84% para o PC2. Plotando o PC1 *versus* PC2 foram reconhecidos três grupos distintos. Espécies que possuem a folha nasal sem a lança, apenas com a base em forma de ferradura, como *Diphylla ecaadata* (D\_eca), *Desmodus rotundus* (D\_rot) and *Diaemus youngi* (D\_you), formaram um grupo separado no espaço da forma com PCA2 entre -90 e -200 e PCA1 entre -50 e 150. Um segundo grupo foi gerado por

espécies do gênero *Artibeus* (A\_lit, A\_fim, A\_obs and A\_con) e pelo gênero *Anoura* (A\_cau and A\_geo) divididos pelo PCA2, com valores de -300 a -150 e PCA1 com valores entre -200 e 100, ocupando o quadrante positivo e negativo desse componente. As folhas de *Artibeus* e *Anouras* são folhas mais arredondadas, possuindo uma lança vertical larga e uma base em forma de ferradura bem determinada. O terceiro grupo foi formado pelas outras espécies, com uma grande sobreposição das formas. Entretanto, podemos observar que os dois componentes principais também separam espécies que possuem a folha nasal com uma lança mais fina e pontuda, como *Phyllostomus elongatus* (P\_elo), *Phyllostomus discolor* (P\_dis) e *Glyphonycteris sylvestris* (G\_syl) de espécies com a lança mais arredondada como *Chiroderma doriae* (C\_dor), *Platyrrhinus lineatus* (P\_lin) e *Artibeus planirostris* (A\_pla).

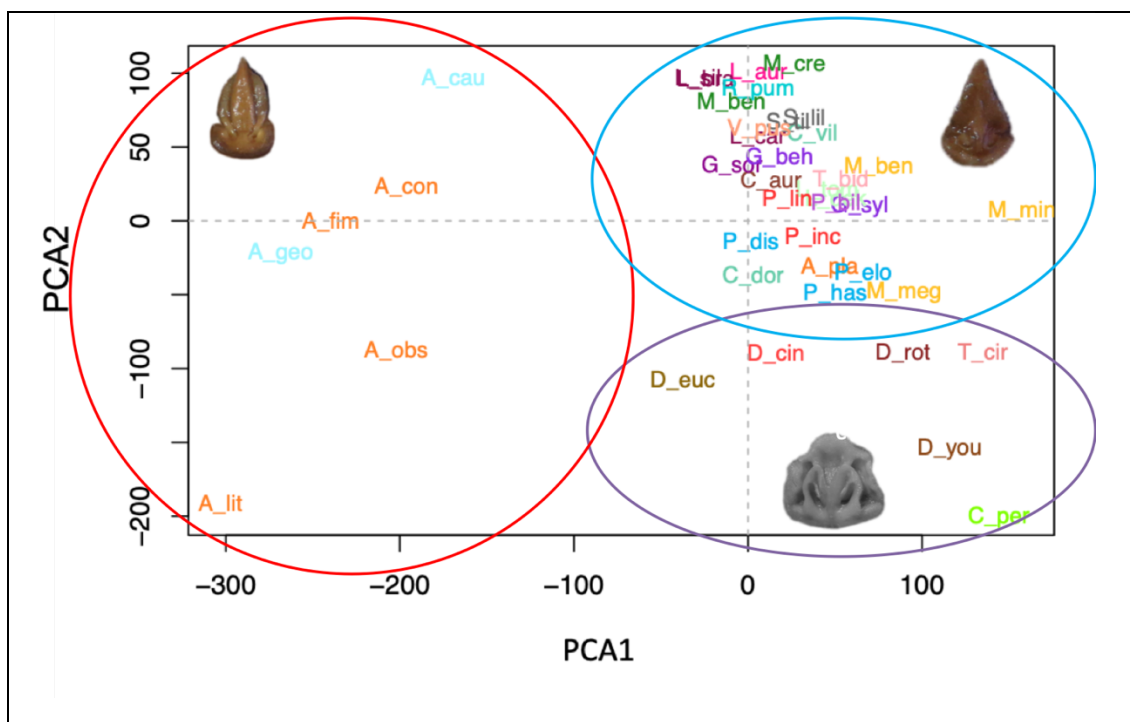


Figura 6. Análise de Componente Principal (entre PCA2 e PCA1) da média da forma das folhas nasais, na qual as cores representam os gêneros de cada espécie.

Os componentes principais 1 e 2 (PCA1 e PCA2) corresponde, á 70,40% da variância dos dados, sendo PC1 correspondente á 55,33% e PC2 15,07% (Figura 7a). Plotando PC1 x PC2 uma divisão de quatro grupos de acordo com as formas das folhas. As espécies (Figura 7b) nectarívoras (em azul) formam um agrupamento no quadrante inferior esquerdo do espaço da forma, outro agrupamento formado por espécies de diferentes dietas (frugívoros, nectarívoros, insetívoros e onívoros) com leve sobreposição, um terceiro grupo é formado pelas espécies frugívoras (em preto) e na outra extremidade do espaço (inferior direito) da forma estão agrupadas as espécies hematófagas (em verde). A separação em PC1 pode ser observada. As espécies nectarívoras possuem crânios com o rostró extremamente alongado, enquanto espécies frugívoras, insetívoras e carnívoras possuem o rostró curto a médio, variando de acordo com o tipo de alimento e dureza. Espécies hematófagas possuem o rostró extremamente encurtado, sendo adaptado para a projeção frontal dos incisivos, devido á sua alimentação. (Freeman, 2000; Wetterer, 2000; Santana et al. 2012)

A análise de sinal filogenético mostrou-se significativa com os valores de  $K=0.53$  ( $p=0.01$ ) e  $\lambda =0.82$  ( $p=0.002$ ). O sinal é interpretado como a tendência de espécies filogeneticamente próximas serem mais similares entre si, quando comparadas com espécies filogeneticamente mais distantes (Blomberg & Garland 2002). Ou seja, quanto mais aparentadas e próximas na árvore filogenética, mais semelhanças fenotípicas são encontradas (Blomberg et al. 2003).



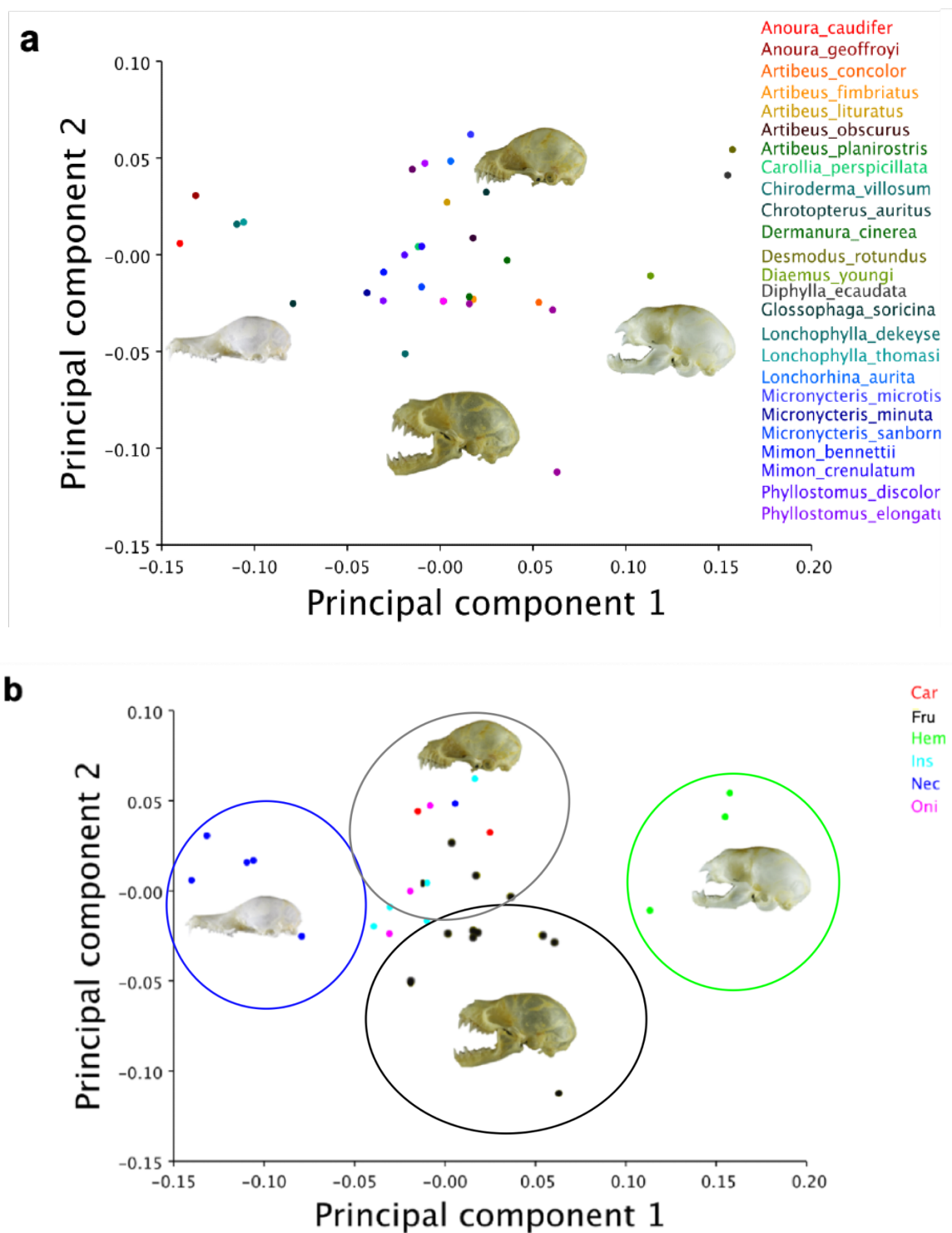


Figura 7. Análise de Componente Principal da média da forma dos crânios com pontos pintados por espécie (a) e Análise de Componente Principal da media da forma dos crânios com pontos pintados de acordo coma dieta das espécies (b).

Dessa forma, os resultados sugerem que há relação entre a filogenia dos Phyllostomidae e a forma da folha nasal (Figura 8). Quanto mais próximas filogeneticamente, mais parecidas são as formas entre essas espécies.

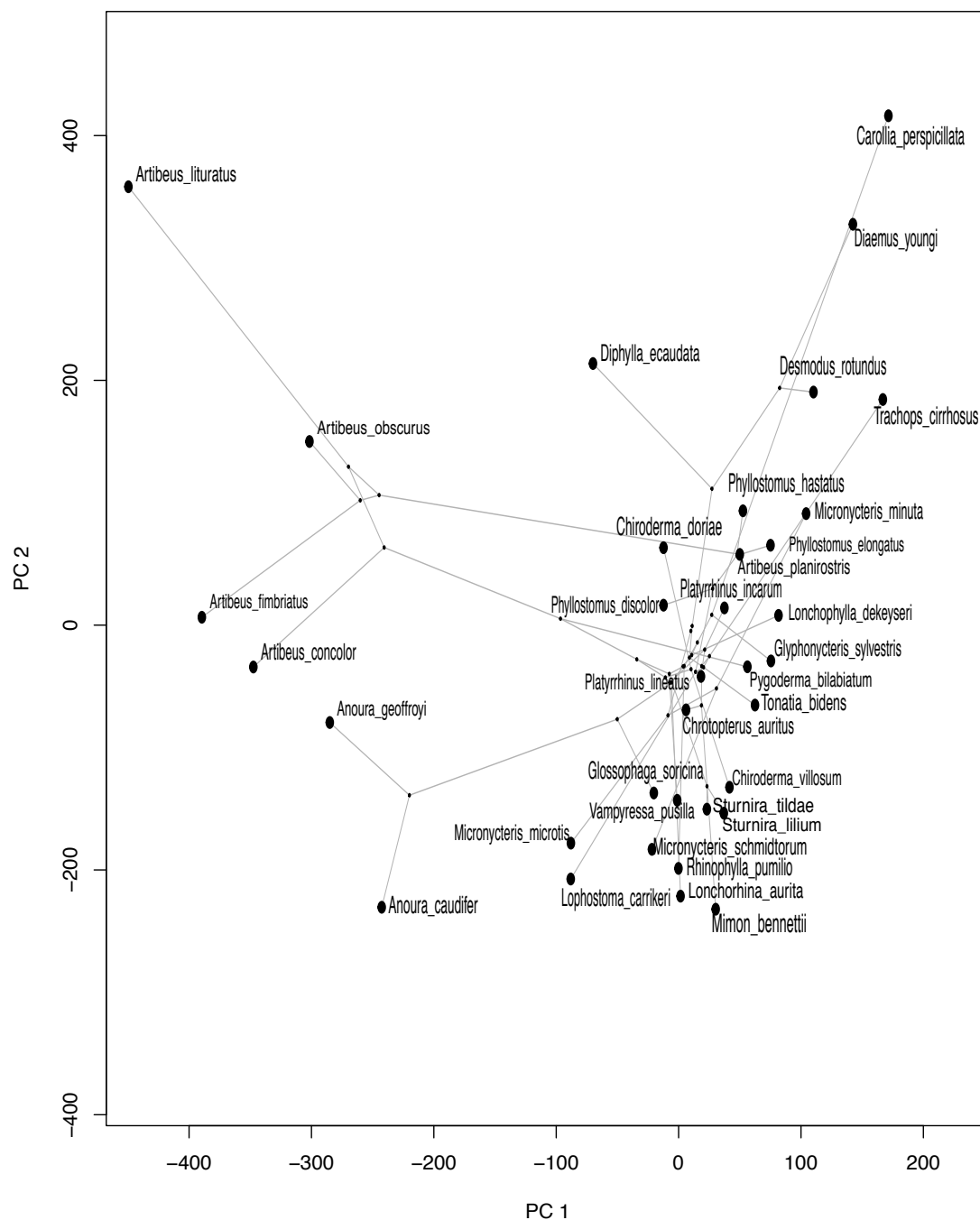


Figura 8. Filogenia plotada no espaço da forma, com os dados da PCA da folha nasal por média de cada espécie.

O sinal filogenético da forma do crânio teve um valor de  $P < .0001$  com 1000 permutações. Dessa forma, os resultados sugerem que há relação entre a filogenia dos Phyllostomidae e a forma dos crânios (Figura 9).

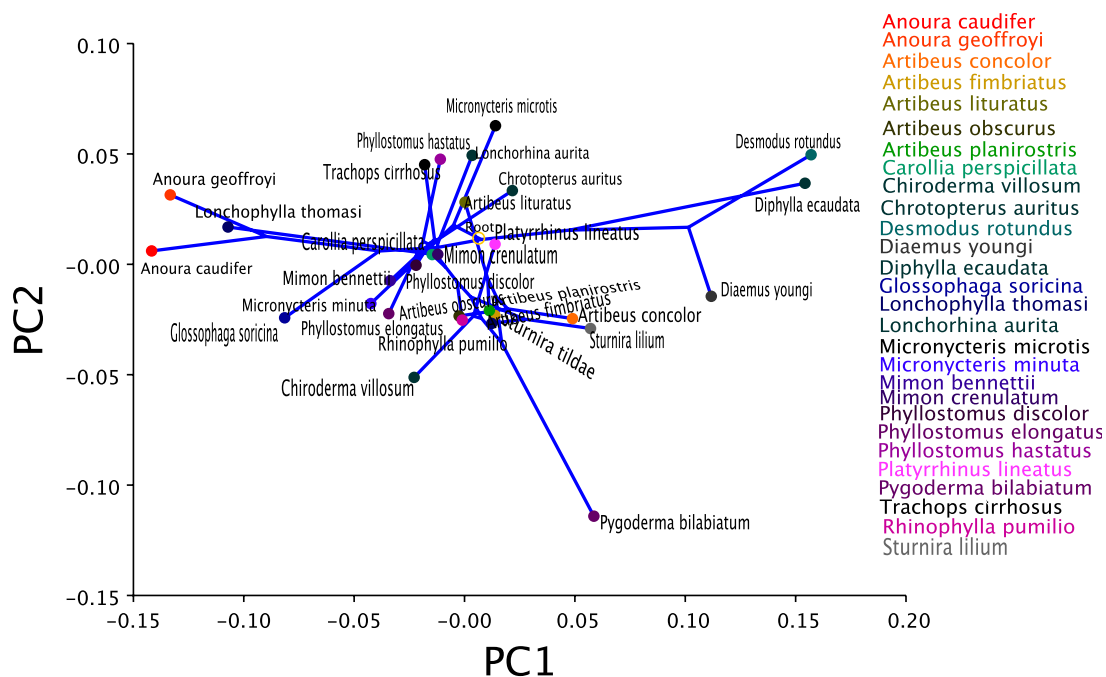
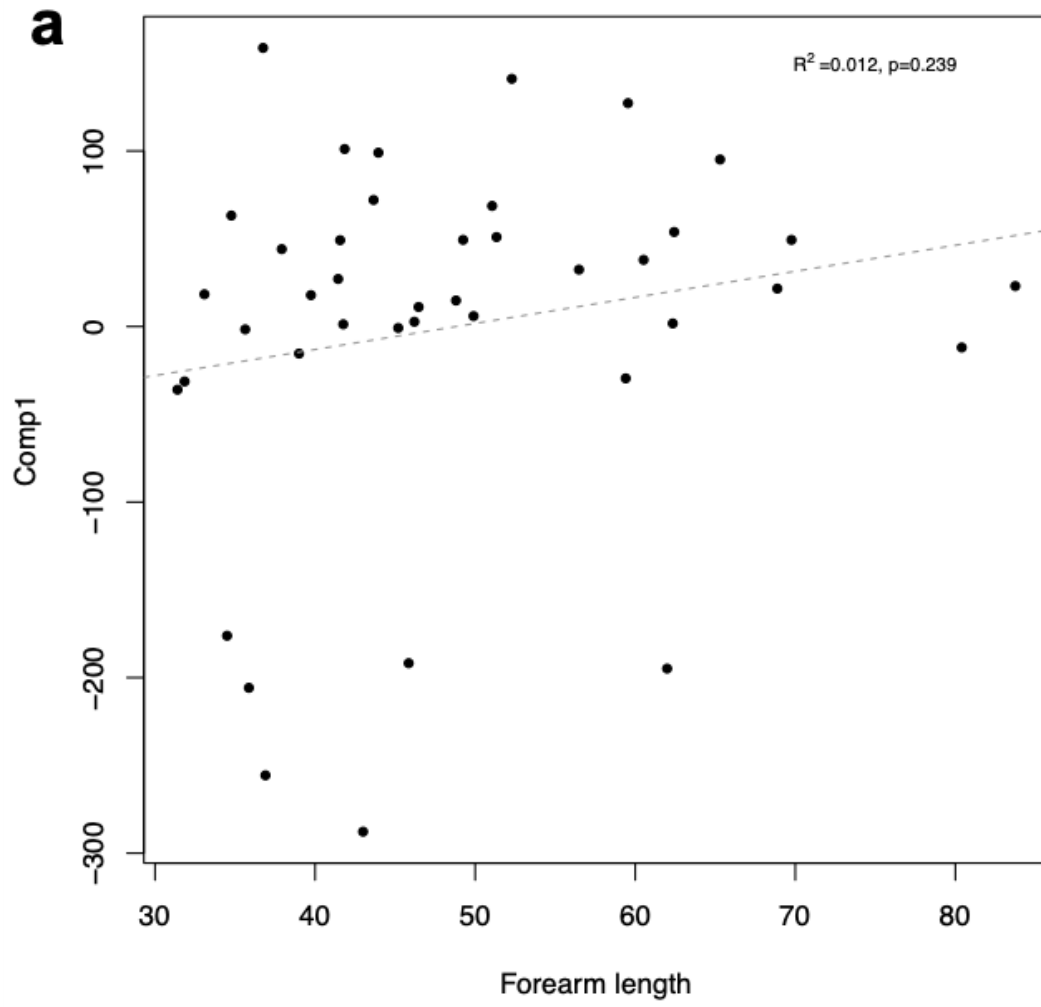


Figura 9. Filogenia plotada no espaço da forma pintada por espécie para visualização da disposição das espécies na filogenia, com os dados da PCA da forma dos crânios por média de cada espécie.

As análises comparativas entre forma da folha nasal (utilizando o valor de PCA1 e PCA2) e medidas corporais (tamanho de antebraço e cabeça-corpo) se mostraram não significativas, com valores de  $p = 0,124$  e  $p = 0,596$  respectivamente (Figura 10). A correlação entre dieta e variação da forma da folha nasal se mostrou significativa,  $p = 0,010$  enquanto a correlação entre forma da folha *versus* habitat não foi significativa ( $p = 0,400$ ) (Tabela 4).



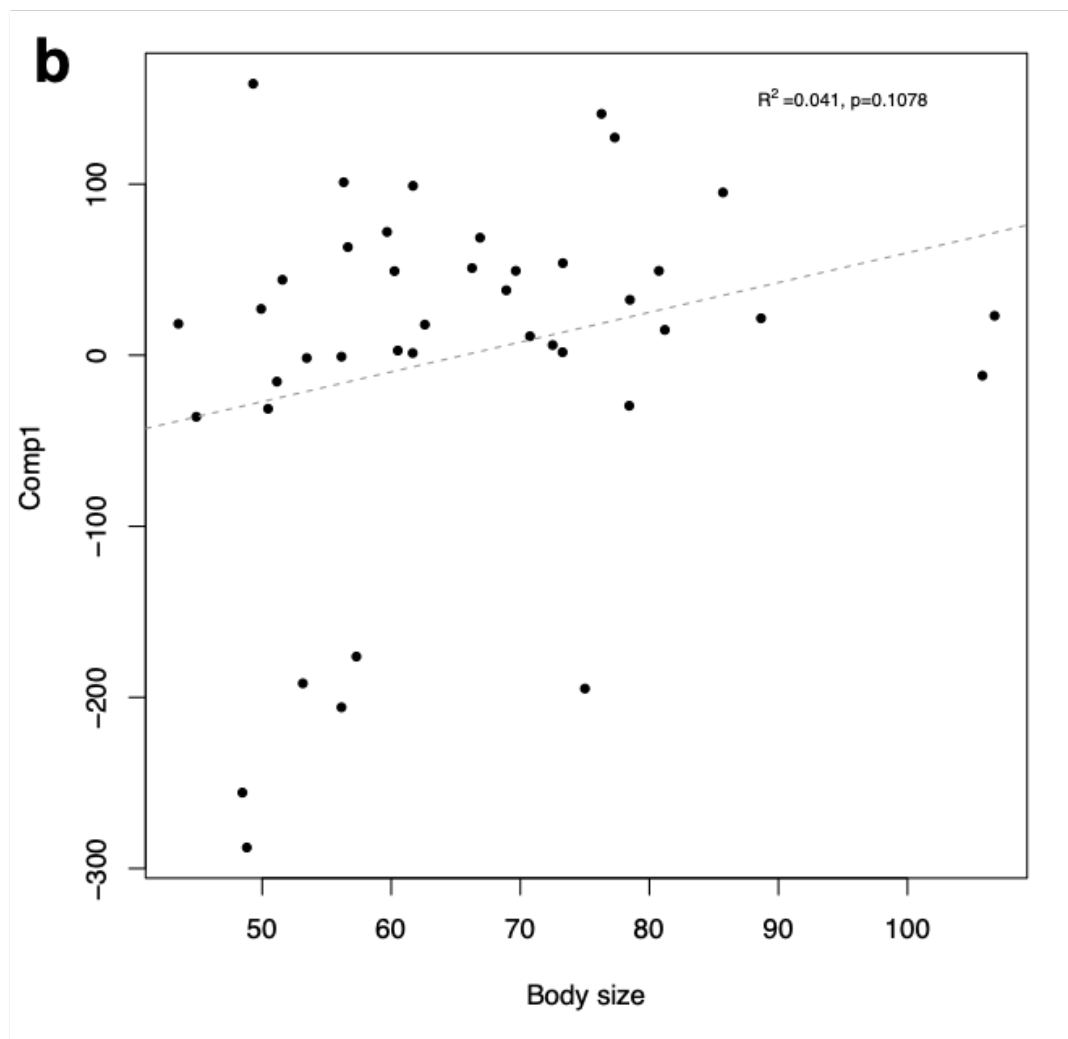


Figura 10. Anovas de Forma da folha nasal *versus* tamanho do antebraço (a) e Forma da folha nasal *versus* tamanho cabeça-corpo (b)

Tabela 4. Dados das ANOVA's de Dieta, Habitat.

Variável	SS	MS	Rsq	F	ZPr(>F)
Habitat	5	6803.4	0.12391	0.99	0.4286
Dieta	5	78047	15609.4	0.28429	0.01099

A análise de matrizes, entre os dados da forma dos crânios e a forma das folhas mostrou um resultado de  $p=0,050$ , sendo significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Dados da Analise PLS da Forma do crânio versus Forma da Folha nasal.

PLS	r-PLS	P-value	Permutation
Forma do crânio vs forma da folha	0.552	0.053	1000

### Discussão

A nossa hipótese de que a variação da forma da folha nasal estaria correlacionada com a filogenia da família foi aceita. Esse é um dos primeiros trabalhos que explicitam esses dados de correlação. O agrupamento formado pelos gêneros *Artibeus* e *Anoura* na PCA mostra uma distinção morfológica dos demais morcegos analisados. Semelhanças morfológicas e sua relação com a filogenia de vários grupos são amplamente discutidas na literatura. As semelhanças morfológicas estão frequentemente relacionadas à ecologia das espécies, como as adaptações fenotípicas de espécies de morcegos nectarívoros, que por sua vez, estão intimamente relacionadas à filogenia dessas espécies (Carstens et al. 2002). Outras adaptações estão associadas ao tipo de dieta de morcegos Phyllostomidae, como inserções de músculos, forma do crânio, fórmula dentária, adaptações na forma dos dentes de acordo com o tipo de dieta de cada espécie (Santana & Dumont 2009; Santana et al. 2012; Santana & Miller 2016; Hedrick & Dumont 2018).

Como os Phyllostomidae possuem grande variação de guildas tróficas e nichos ecológicos, a filogenia, a origem da diversificação das estratégias de alimentação da família e sua história evolutiva também são temas de discussão dentro da literatura (Gillete 1975; Wetterer et al. 2000; Teeling et al. 2005; Baker

et al. 2012; Tavares et al. 2018). A ampla variação da guilda trófica permitiu especializações alimentares que são notáveis no contexto morfológico e fisiológico (Griffiths 1982; Fleming et al. 2005; Santana 2012; Santana & Miller 2016; Hedrick & Dumont 2018) e a maioria dos táxons que compartilham especializações alimentares formam clados (Wetterer et al. 2000).

Conforme proposto por Arita (1990), as medidas morfométricas da folha nasal podem sim estar associadas ao tipo de alimentação da espécie. A relação entre a forma da folha nasal e a filogenia também podem estar associadas ao tipo de forrageamento usado (Belwood & Morris 1987; Arita 1990; Leiser-miller e Santana, 2020), que pode variar por espécie de acordo com o tipo de presa e habitat de forrageio mesmo em morcegos que têm primariamente o mesmo tipo de dieta. A variação da forma em função da dieta e sua associação com a filogenia do grupo sugere que a seleção natural atuou sobre os representantes desse grupo promovendo, por um lado, a especialização alimentar e, por outro, a diferenciação da folha nasal.

Dentre as espécies analisadas, encontram-se representantes com folhas extremamente modificadas, apenas com base em ferradura, como é o caso dos hematófagos, representantes que possuem a ponta da lança da folha nasal mais arredondada, como é o caso de espécies do gênero *Artibeus* e representantes com folhas extremamente pontiagudas e longas, como o *Mimon crenulatum*. A variedade de folhas nasais e suas formas parecem seguir a variação da guilda trófica do grupo, (vide resultados de  $p= 0,01$  deste trabalho) que foi, evolutivamente, um evento de diversificação relativamente rápido, em comparação com os outros grupos de mamíferos, que passaram pela seleção natural (Teeling 2005; Tavares et al. 2018). As três espécies de hematófagos (*D.*

*rotundus*, *D. ecaudata* e *D. youngi*) se diferenciaram das outras espécies no espaço gerado pela PCA, assim como *Carollia perspicillata*, que possui grande preferência e especialização na predação de plantas do gênero *Piper*. O isolamento de espécies que possuem alimentação mais restrita pode refletir mudanças no formato da folha nasal congruentes com especialização na variedade alimentar, uma vez que a maior sobreposição observada no PCA é formada espécies mais generalistas.

A relação da forma da folha nasal com fatores dietéticos pode sugerir outros usos da estrutura por espécie, uma vez que Phyllostomidae costumam utilizar outros sentidos, como audição, olfato e visão. Considerando também que a maioria dos morcegos que usam a ecolocalização em sua totalidade e de forma mais complexa, como os insetívoros Molossidae e Vespertilionidae, não fazem parte da família Phyllostomidae e não possuem folha nasal. Em Phyllostomidae, o uso de ecolocalização está mais associado ao forrageamento, mas não totalmente direcionada para encontrar suas presas como os insetívoros aéreos fazem em espaços abertos (Neuweiler 1984; Brokaw & Smotherman 2020).

A Análise de Componente Principal (PCA) dos dados de forma do crânio (Figura 7b) mostram um agrupamento de acordo com o tipo de dieta e forma do crânio. Os morcegos nectarívoros possuem um crânio de rostró alongado, formando um grupo em um extremo enquanto as espécies hematófagas, que possuem um crânio extremamente adaptado á dieta líquida, com o rostró muito reduzido, se agruparam em outro extremo, um rostró extremamente alongado (nectarívoros) enquanto o outro é extremamente curto (hematófagos). As espécies frugívoras formaram um grupo separado, uma vez que seus crânios são robustos e maiores, permitindo mais inserções musculares. As outras



espécies formaram então, um grupo mais sobreposto, formado por crânios mais parecidos entre si, sem adaptações extrema, correspondendo com as dietas de cada espécie.

O resultado marginalmente significativo entre a variação morfológica do crânio e a variação morfológica da folha nasal sugere uma tendência de variação morfológica entre os dois caracteres, mas também pode ser um indicativo de que, as variações cranianas e de folha nasal estão variando sob a mesma pressão evolutiva, a dieta. Sabe-se que os crânios dos Phyllostomidae variam são extremamente adaptados ao tipo de dieta de cada espécie e essa adaptação se estende até mesmo a fórmula dentária e força de mordida (Nogueira et al, 2009; Santana e Dumont, 2009; Monteiro e Nogueira, 2011). A dieta é um fator de forte influencia na história dos Phyllostomidae e a associação significativa dessa variável com mudanças morfológicas indica como ela participa dos processos de especiação da família (Dumont et al, 2012).

Finalmente, é importante notar que, encontramos um sinal filogenético significativo para a variação da forma da folha nasal e filogenia do grupo, mas a árvore filogenética usada não cobre todos os representantes da família Phyllostomidae, uma vez que ainda não há uma filogenia totalmente resolvida para a família. Considerando todos esses aspectos, acreditamos que trabalhos complementares a este devam ser desenvolvidos com uma filogenia mais abrangente, para assim, ser possível verificar como ocorreu a evolução da folha nasal dos Phyllostomidae e como o uso desse caráter pode estar atrelado á outras pressões evolutivas além da função mecânica de recepção e emissão do som.

## Referências

- Adams, D. C., & Otárola-Castillo, E. (2013). geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(4), 393-399.
- Arita HT 1990. Noseleaf morphology and ecological correlates in phyllostomid bats. *J. Mammal* 71:36-47.
- Baker, R. J., Bininda-Emonds, O. R., Mantilla-Meluk, H., Porter, C. A., & Van Den Bussche, R. A. (2012). Molecular timescale of diversification of feeding strategy and morphology in New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae): a phylogenetic perspective. *Evolutionary history of bats: fossils, molecules and morphology*, 385-409.
- Belwood, J. J., & Morris, G. K. (1987). Bat predation and its influence on calling behavior in neotropical katydids. *Science*, 238(4823), 64-67.
- Belwood JJ 1988. Foraging Behavior, Prey Selection, and Echolocation in Phyllostomine Bats (Phyllostomidae). In: Nachtigall P.E., Moore P.W.B. (eds) *Animal Sonar. NATO ASI Science (Series A: Life Sciences)*, vol 156. Springer, Boston, MA
- Birch, J. M. (1997). Comparing wing shape of bats: the merits of principal-components analysis and relative-warp analysis. *Journal of Mammalogy*, 78(4), 1187-1198.
- Bogdanowicz W, Fenton MB, Daleszczyk K. 1999. The relationship between echolocation calls, morphology and diet in insectivorous bats. *Journal of Zoology (London)* 247: 381-393.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Blomberg, S.P., Garland, T., 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods: Phylogenetic inertia. *J. Evol. Biol.* 15, 899–910. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00472.x>
- Blomberg, S.P., Garland, T., Ives, A.R., 2003. Testing for Phylogenetic signal in comparative data: Behavioral traits are more labile. *Evolution* 57, 717–745. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00285.x>

- Brinkløv, S., Jakobsen, L., Ratcliffe, J. M., Kalko, E. K., & Surlykke, A. (2011). Echolocation call intensity and directionality in flying short-tailed fruit bats, *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 129(1), 427-435.
- Brokaw, A. F., & Smotherman, M. (2020). Role of ecology in shaping external nasal morphology in bats and implications for olfactory tracking. *PloS one*, 15(1), e0226689.
- Carstens, Bryan C., Barbara L. Lundrigan, and Philip Myers. "A phylogeny of the neotropical nectar-feeding bats (Chiroptera: Phyllostomidae) based on morphological and molecular data." *Journal of mammalian evolution* 9.1 (2002): 23-53.
- Crampton, JS. 1995. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia*, 28(2), 179-186.
- Díaz, M. M., Solari, S., Aguirre, L. F., Aguiar, L., & Barquez, R. M. (2016). Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica/Chave de identificação dos morcegos da América do Sul. *Publicación Especial Nro, 2*, 160.
- Dumont, Elizabeth R., et al. "Morphological innovation, diversification and invasion of a new adaptive zone." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279.1734 (2012): 1797-1805.
- Freeman PW: Macroevolution in Microchiroptera: recoupling morphology and ecology with phylogeny. *Evol Ecol Res.* 2000, 2: 317-33.
- Fleming, T. H., Geiselman, C., & Kress, W. J. (2009). The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of botany*, 104(6), 1017-1043.
- f
- Gillette, D. D. (1975). Evolution of feeding strategies in bats. *Tebiwa*, 18(1), 39-48.
- Griffin, D. R., & Novick, A. (1955). Acoustic orientation of neotropical bats. *Journal of Experimental Zoology*, 130(2), 251-299.
- Griffiths, T. A. (1982). Systematics of the New World nectar-feeding bats (Mammalia, Phyllostomidae), based on the morphology of the hyoid and lingual regions. *American Museum novitates*; no. 2742.

- Göbbel L 2002. Morphology of the external nose in *Hipposideros diadema* and *Lavia frons* with comments on its diversity and evolution among leaf-nosed Microchiroptera. *Cel.Tissue.Organ.* 170(1): 39-60.
- Hartley DJ, Suthers, RA. 1987. The sound emission pattern and the acoustical role of the noseleaf in the echolocating bat, *Carollia perspicillata*. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 82(6), 1892-1900.
- Hedrick, Brandon P., and Elizabeth R. Dumont. "Putting the leaf-nosed bats in context: a geometric morphometric analysis of three of the largest families of bats." *Journal of Mammalogy* 99.5 (2018): 1042-1054.
- Hedrick, B. P., & Dumont, E. R. (2018). Putting the leaf-nosed bats in context: a geometric morphometric analysis of three of the largest families of bats. *Journal of Mammalogy*, 99(5), 1042-1054.
- Jansky K, Schubert BW, Wallace SC. 2016. Geometric morphometrics of dentaries in *Myotis*: Species identification and its implications for conservation and the fossil record. *Northeastern Naturalist*, 23(1), 184-195.
- Kuc R. 2010. Morphology suggests noseleaf and pinnae cooperate to enhance bat echolocation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 128(5), 3190-3199.
- Leiser-Miller, Leith B., and Sharlene E. Santana. "Morphological diversity in the sensory system of phyllostomid bats: Implications for acoustic and dietary ecology." *Functional Ecology* 34.7 (2020): 1416-1427.
- Maina, JN, King, AS, King DZ. 1982. A morphometric analysis of the lung of a species of bat. *Respiration physiology*, 50(1), 1-11.
- Monteiro, Leandro R., and Marcelo R. Nogueira. "Evolutionary patterns and processes in the radiation of phyllostomid bats." *BMC Evolutionary Biology* 11.1 (2011): 1-23
- Monteiro LR, Nogueira MR: Adaptive radiations, ecological specialization, and the evolutionary integration of complex morphological structures. *Evolution* 2010, 64:724-744.
- Neuweiler G .1984 Foraging ecology and audition in bats. *Naturwissenschaften*,71:446-455.

- Nogueira, Marcelo R., Adriano L. Peracchi, and Leandro R. Monteiro. "Morphological correlates of bite force and diet in the skull and mandible of phyllostomid bats." *Functional Ecology* 23.4 (2009): 715-723.
- Novick, A. (1963). Orientation in neotropical bats. II Phyllostomatidae and Desmodontidae. *Journal of Mammalogy*, 44(1), 44-56.
- Novick A. 1977 Acoustic orientation. In: Wimsatt, WA (ed) *Biology of bats*, Vol. III. Academic Press, New York San Francisco London, pp 74–289
- Paglia AP, Fonseca GA, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, Chiarello AG e Mendes SL 2012. Annotated checklist of Brazilian mammals. *Con. Biol.* 6(1):76.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290.
- Pedersen, S. C. (1998). Morphometric analysis of the chiropteran skull with regard to mode of echolocation. *Journal of Mammalogy*, 79(1), 91-103.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA e Lima IP 2007. *Morcegos do Brasil*. Londrina.
- Revell, L. J. (2012) phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol. Evol.*, 3, 217-223.
- Rojas, D, Warsi, OM, e Dávalos, LM. 2016. Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) challenge a recent origin of extant neotropical diversity. *Syst. Bio.* 65(3), 432-448.
- Rohlf, F. J. (2015). The tps series of software. *Hystrix*, 26(1).
- Rossoni, Daniela M., et al. "A multiple peak adaptive landscape based on feeding strategies and roosting ecology shaped the evolution of cranial covariance structure and morphological differentiation in phyllostomid bats." *Evolution* 73.5 (2019): 961-981.
- Santana, S. E., and E. R. Dumont. "Connecting behaviour and performance: the evolution of biting behaviour and bite performance in bats." *Journal of evolutionary biology* 22.11 (2009): 2131-2145.
- Santana, Sharlene E., Ian R. Grosse, and Elizabeth R. Dumont. "Dietary hardness, loading behavior, and the evolution of skull form in

bats." *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 66.8 (2012): 2587-2598.

Sharlene E. Santana, Kimberly E. Miller, Extreme Postnatal Scaling in Bat Feeding Performance: A View of Ecomorphology from Ontogenetic and Macroevolutionary Perspectives, *Integrative and Comparative Biology*, Volume 56, Issue 3, September 2016, Pages 459468, <https://doi.org/10.1093/icb/icw075>

Shi, JJ. & Rabosky, DL. Speciation dynamics during the global radiation extant bats. *Evolution* 69.6 (2015): 1528-1545.

Schnitzler HU, Grinnell AD 1977. Directional sensitivity of echolocation in the horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *J. comp. physiol.* 116(1): 51-61.

Tavares, V. D. C., Warsi, O. M., Balseiro, F., Mancina, C. A., & Dávalos, L. M. (2018). Out of the Antilles: fossil phylogenies support reverse colonization of bats to South America. *Journal of Biogeography*, 45(4), 859-873.

Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O' Brienand SJ e Murphy WJ 2005. A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Scienc.* 307(5709): 580-584.

Vanderelst D, De Mey F, Peremans H, Geipel I, Kalko EKV e Firzlaff U 2010. What noseleaves do for FM bats depends on their degree of sensorial specialization. *PloS one* 5(8): e11893.

Wetterer AL, Rockman MV e Simmons NB 2000. Phylogeny of Phyllostomid Bats (Mammalia: Chiroptera): Data from Diverse Morphological Systems, Sex Chromosomes, and Restriction Sites. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 248: 1–200.

Wold, S., Geladi, P., Esbensen, K., & Öhman, J. (1987). Multi-way principal components-and PLS-analysis. *Journal of Chemometrics*, 1(1), 41–56. doi:10.1002/cem.1180010107

Zhuang, Q., & Müller, R. (2006). Noseleaf furrows in a horseshoe bat act as resonance cavities shaping the biosonar beam. *Physical review letters*, 97(21), 218701.

## Capítulo 2

### **SERIA A FOLHA NASAL DE MORCEGOS PHYLLOSTOMIDAE UM ÓRGÃO SENSORIAL?**

Luísa S. Aguiar-Machado, Ludmilla M.S Aguiar e Julia Klaczko

#### Abstract

A histologia é uma técnica que possibilita uma descrição microscópica detalhada e identificação da disposição e distribuição diversas células. A folha nasal de Phyllostomidae já foi histologicamente estudada em morcego hematófago, revelando o papel funcional da folha como órgão sensorial. No entanto pouco se conhece sobre descrições histológicas da folha nasal de outras espécies. Por meio de coloração com nitrato de prata e hematoxilina e eosina, descrevemos a estrutura histológica e verificamos a presença de células nervosas que pudessem indicar uma função sensorial em morcegos nectarívoro e frugívoro. Em ambas as espécies foram encontrados pelos contornando toda a borda da folha nasal, e corpos neuronais próximos. Essas estruturas podem indicar que a folha nasal de morcegos frugívoros e nectarívoros tem uma função sensorial. Mais estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão de como a folha nasal atua como órgão sensorial e como está sendo usada por esses morcegos.

**Keywords:** Chiroptera, Phyllostomidae, histologia, corpos neuronais, pelos sensoriais

## Introdução

A histologia é uma técnica utilizada em diversas áreas, desde descrições biológicas de tecidos, órgãos e estruturas até a identificação de patologias clínicas. A técnica possibilita uma descrição detalhada da microscopia do objeto estudado permitindo a identificação de diversas células, a disposição e distribuição destas, auxiliando também no entendimento funcional do material estudado. A histologia conta com diversos protocolos de preparação de materiais de acordo com o objetivo de cada análise. Por exemplo, um dos protocolos para identificação de células nervosas, especialmente neurofibras, axônios e dendritos é feito com nitrato de prata. Os protocolos podem variar de acordo com a fixação do material ou de acordo com as estruturas desejadas na identificação ou descrição (Junqueira e Carneiro, 2010).

A identificação de tecidos e estruturas teciduais permite uma série de inferências e confirmações de funções macro de tal estrutura analisada. A presença de tecidos musculares, por exemplo, suporta a teoria de movimentação, força. A presença de tecidos e células nervosas pode indicar funções sensoriais nervosas ou de recepção, pelos podem indicar função sensorial ou proteção e assim por subsequência de outras estruturas que indicam funções e ações (Junqueira e Carneiro, 2010).

Em Phyllostomidae, a folha nasal é vista como uma grande auxiliadora na emissão e recepção do som, com provável associação ao forrageamento e tipo de dieta das espécies (Hartley e Suthers, 1987; Bogdanowicz et al, 1999; Vanderelst et al. 2010; Leiser-Miller e Santana 2020). Entretanto, poucas descrições histológicas da folha nasal foram feitas e pouco se sabe sobre as estruturas e tecidos, especialmente com outros tipos de metodologias como



histoquímica, e análises de microscopia eletrônica, além de colorações como nitrato de prata, Toluidina Além disso, sabe-se que morcegos do Velho Mundo (Yinpterochiroptera) movimentam as folhas nasais, mostrando uma função de direcionalidade. Todavia, em morcegos Phyllostomidae essa movimentação não foi demonstrada ou descrita na literatura, apenas sugerida (Feng et al., 2012; He et al., 2015; Müller, 2015; Leiser-Miller e Santana 2020).

Dalquest et al. (1952) analisaram a estrutura histológica da face de *Artibeus jamaicensis*, e fizeram uma breve descrição das glândulas encontradas na folha nasal. Posteriormente analisaram em maior escala as características faciais de morcegos norte americanos, incluindo seis espécies de Phyllostomidae (Dalquest and Werner, 1954). Esses estudos descreveram a presença de glândulas sebáceas, pelos, tecidos conectivos e musculares nas folhas nasais. Somente em 2002, a presença de tecido cartilaginoso na folha nasal foi registrada (Göbbel 2002) por meio de um estudo que descreveu estruturas externas e internas no desenvolvimento fetal de folhas nasais de morcegos do Velho Mundo. Estudos analisando a estrutura nasal interna como fossa e ossos nasais dos Phyllostomidae, demonstraram que a estrutura facial e conseqüentemente a craniana estão adaptadas à percepção olfativa. Em Phyllostomidae há uma forte relação de olfato e forrageamento, e essa característica é sustentada filogeneticamente (Eiting et al. 2014a; 2014b; 2015).

Uma vez que a folha nasal se encontra associada as estruturas nasais, tanto ósseas quanto teciduais, é possível imaginar uma função sensorial da folha nasal no papel olfativo dos Phyllostomidae. Essa função foi demonstrada em uma espécie hematófaga, *Desmodus rotundus* por Kürten e Schmidt (1982; 1984). A folha nasal de *D. rotundus* possui células nervosas de recepção

térmica para frio e calor possuindo assim, função sensorial na detecção de presas e dos melhores sítios para inserção dos incisivos. A presença de células sensoriais em *D.rotundus* provavelmente se deve á natureza de sua dieta de presas que possuem sangue quente (Kürten e Schimdt 1982;1984). Entretanto, espécies com outras dietas também possuem folhas nasais, deixando clara a possibilidade de espécies com outras dietas também possuírem células nervosas, e uma folha nasal com função sensorial para a ecolocalização.

Visando analisar as folhas nasais de espécies que não se alimentam de presas quentes, como o *Desmodus rotundus*, as espécies *Artibeus lituratus* e *Anoura geoffroyi*, que se alimentam de dietas frias, são bons representantes para a análise histológica. *Artibeus lituratus* é uma espécie frugívora, de tamanho corporal grande, com o antebraço em torno de 75 cm (Dias et al. 2016). É uma espécie muito comum em ambientes urbanos e nativos, possuindo uma dieta composta de frutos de variados tamanhos e durezas (Santana e Dumont, 2009). Esses morcegos são robustos, com notável força muscular, e uma folha nasal robusta, larga, com os seguimentos morfológicos bem marcados (REF). *Anoura caudiffer* é uma espécie nectarívora, de tamanho corporal médio e antebraço entre 39 e 47 mm (Dias et al. 2016). É um morcego pequeno, que possui o crânio modificado que possibilita que ele se alimente de néctar, e não apresenta grande força muscular (REF). Sua folha nasal é pequena, sem grande marcação das estruturas morfológicas, aparentando ser uma folha mais simples (REF).

Dessa forma, nesse trabalho o objetivo é o de (a) comparar a estrutura histológica da folha nasal de duas espécies com dietas distintas (*Artibeus lituratus* e *Anoura geoffroyi*) a fim de verificar a presença de células sensoriais,

(b) comparar a musculatura das folhas nasais e (c) descrever a variação histológica das folhas nasais.

### Material e Método

#### *Análise histológica da Folha Nasal*

#### *Obtenção material biológico*

Para os estudos histológicos foram selecionadas duas espécies da família Phyllostomida, as espécies *Anoura geoffroyi* e *Artibeus lituratus*. Ambas possuem ampla distribuição ocorrendo em matas e cerrado sensu stricto (Paglia et al. 2012). As espécies foram escolhidas com base na posição dentro da filogenia da família e com representação das guildas alimentares (Nectarívoros, Frugívoros, Hematófagos, Insetívoros, Onívoros e Carnívoros). Todos os indivíduos coletados foram obtidos no Parque Nacional de Brasília (PNB) e os espécimes de coleção foram obtidos na Coleção de Mamíferos da UnB, previamente fixados em formol tamponado 10% e conservados em álcool 70%.

#### *Protocolo*

As folhas nasais foram retiradas logo após a eutanásia dos espécimes e foram fixadas em formol tamponado 10% durante 48h dentro da geladeira. Após a fixação, as amostras foram imersas em álcool 70%, desidratadas em soluções crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), durante 1 hora e 40 minutos cada, clarificados em três banhos de xilol durante 1 hora e 40 minutos cada e incluídos em parafina. O protocolo seguido foi o padrão para emblocamento de histologia com adaptação do tempo de imersão em cada solução. O material foi emblocado e posteriormente cortado em micrótomo com 10 µm de espessura. As lâminas de *Anoura geoffroyi* foram coradas de acordo com o protocolo proposto por Bielschowsky (1904), com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) para identificar

células nervosas como neurofibras, axônios e dendritos, e outras com Hematoxilina/ Eosina para a identificação dos tecidos.

O processo de emblocamento das folhas nasais para montagem das lâminas histológicas precisou ser adaptado ao longo do trabalho, uma vez que o tempo em cada solução precisou ser ajustado de acordo com o tamanho e condição da folha extraída. Folhas fixadas há muito tempo desmancharam no processo de corte em micrótomo, e folhas que passavam pouco tempo nos processos de desidratação e mergulho em parafina caíam de seus blocos ou esfarelavam no processo de corte. Além disso, as folhas nasais precisam ser fixadas de maneira que fiquem planas, pois o rigor *post-mortem* da folha nasal leva a lança vertical a envergar, gerando uma angulação no bloco de parafina, que deixa impossível o corte com a estrutura inteira na lâmina. Inicialmente desenhamos esse capítulo para ter quatro espécies, representando todas as guildas tróficas com exceção de hematófagos. Os indivíduos das espécies *Trachops cirrhosus* e *Micronycteris microtis* tiveram suas lâminas descartadas pois as folhas desmancharam no processo de corte em micrótomo, talvez por serem indivíduos de coleção fixados há muitos anos e assim se tornarem peças mais frágeis de se manusear.

## Resultados

As folhas nasais analisadas têm estruturas externas e internas semelhantes. A morfologia externa é dividida em uma base em forma de ferradura fixada ao rosto e uma estrutura vertical livre denominada lança, que pode ser marcada verticalmente acompanhada de duas abas laterais ou não possuir a porção vertical bem demarcada, sendo uma folha mais homogênea com as abas com pouca definição.

Na análise histológica, a estrutura das folhas também se assemelha. É possível ver um padrão de estruturas básicas, como a presença de tecido cartilaginoso na ferradura, sustentando a lança. Este tecido também está presente em volta da cavidade das narinas. A borda das folhas nasais é preenchida por glândulas sebáceas, pelos e corpos pilosos, corpos neuronais. A medida que nos afastamos da borda, no sentido mesial da folha, o espaço é todo preenchido por tecido muscular, tecido de transição e vasos sanguíneos.

*Artibeus lituratus*

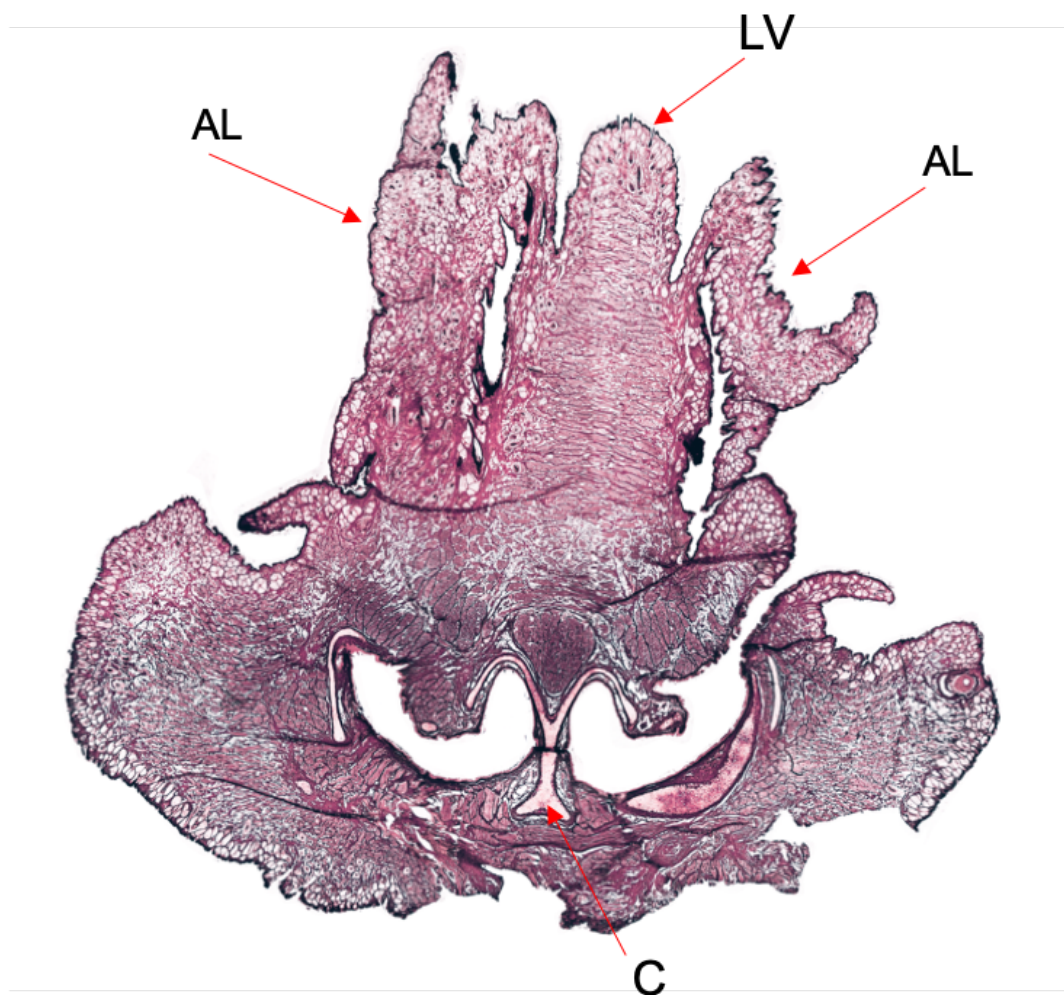


Figura 1. Lâmina com peça inteira da folha nasal de *Artibeus lituratus* em coloração padrão de Hematoxilina e Eosina. Visão ventral em corte longitudinal. AL= aba lateral, LV= lança vertical, C= cartilagem. Escala: 10  $\mu$ m.

Na análise histológica da folha nasal de *Artibeus liturtatus* foi possível observar que a composição da folha é majoritariamente de tecido muscular, tecidos de transição e vasos sanguíneos, demonstrando que a folha nasal é um caráter bastante irrigado de acordo com a quantidade e dispersão dos vasos ao longo da folha. Há uma estrutura de ferradura na base e uma lança vertical bem marcada, com abas laterais bem definidas (Figura 1), diferente do que encontramos em *Anoura geoffroyi* (Figura 2). Na porção mesial da folha, entre a base em forma de ferradura e a lança vertical, existe uma estrutura cartilaginosa, com uma base e projeção vertical, seguida de duas projeções laterais em forma de “u”. Acúmulos cartilagosos também são encontrados nas laterais da estrutura cartilaginosa principal, próximos aos espaços das narinas. As abas laterais que acompanham a lança vertical são compostas de glândulas sebáceas, corpos pilosos e pelos, com alguns feixes de tecido de transição. Essa composição segue contornando a folha desde o topo da lança vertical até a base. Encontramos tecidos de transição de modo distal da camada de pelos e glândulas sebáceas, e de modo proximal, tem-se tecidos musculares. A base da folha nasal possui em cada extremidade lateral a presença de dois grandes vasos sanguíneos acompanhados de um corpo piloso grande (Figura 3a), além de tecidos musculares próximos a estrutura de cartilagem, contornando as narinas. Apresenta um acúmulo denso muscular na porção superior da estrutura cartilaginosa, que dá início a projeção vertical da lança (Figura 4a). A lança é composta por tecido muscular por toda a sua continuidade. A presença de corpos neuronais foi identificada (Figura 4a, c), sendo possível encontra-los em tecidos de transição, localizados perto da porção de pelos e glândulas

sebáceas que contorna a folha nasal, e nos tecidos musculares da base e lança da folha nasal.

*Anoura geoffroyi*

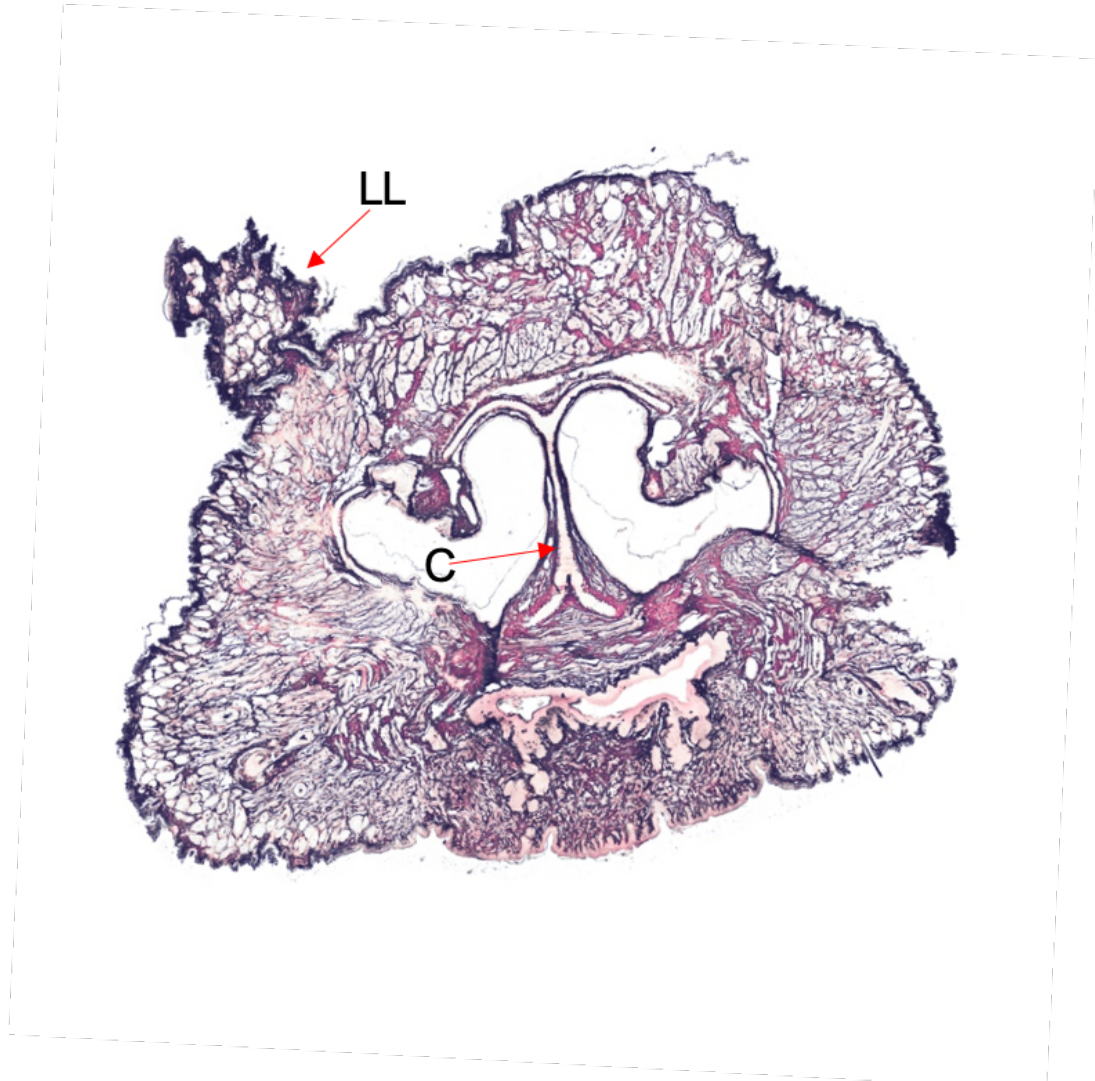


Figura 2. Lâmina com peça inteira da folha nasal de *Anoura geoffroyi* em coloração padrão de Hematoxilina e Eosina. Visão ventral em corte longitudinal. **LL**= lateral da lança vertical, **C**= cartilagem. Escala: 10  $\mu$ m.

Na análise histológica da folha nasal de *Anoura geoffroyi* foi possível observar que apesar da composição da folha nasal também ser majoritariamente de tecido muscular e tecidos de transição, como em *Artibeus lituratus*, a musculatura é bem mais demarcada e aparente. Talvez devido ao

tamanho reduzido da folha e sua característica mais homogênea, sendo uma folha nasal que não possui lança e abas laterais bem demarcadas. A folha possui a mesma estrutura cartilaginosa em posição e forma homologas á estrutura vista em *Artibeus lituratus*, mas possuindo as porções laterais de cartilagem mais definidas (Figura 2). O espaço entre a base e a lança vertical também é menor quando comparado á folha nasal de *Artibeus lituratus*, possuindo um acúmulo muscular na projeção vertical da lança menos denso e de menor tamanho. As abas laterais da folha nasal de *Anoura geoffroyi* não são bem demarcadas, mas o contorno externo da lança ainda é formado por glândulas sebáceas, pelos e corpos pilosos, ainda que a porção muscular da lança não seja robusta como em *Artibeus lituratus* e a presença de tecidos de transição seja maior. A camada composta por glândulas sebáceas e corpos pilosos (Figura 5a) também contorna toda a extensão da folha nasal de *Anoura geoffroyi*, desde a base até a lança. Posteriormente a essa camada, também encontramos tecidos de transição e em seguida tecidos musculares. A base da folha nasal de *Anoura geoffroyi* também apresentou, em cada extremidade lateral, a presença de dois grandes vasos sanguíneos acompanhados de um corpo piloso grande (Figura 4), além de tecidos musculares (Figura 5a) próximos a estrutura de cartilagem em sua base, que não contornam as narinas em grande densidade. A presença de corpos neuronais também foi identificada (Figura 5 ) sendo possível encontra-los em tecidos de transição perto da porção de pelos e glândulas sebáceas que contorna a folha nasal (Figura 4), e nos tecidos musculares da base e lança da folha nasal.



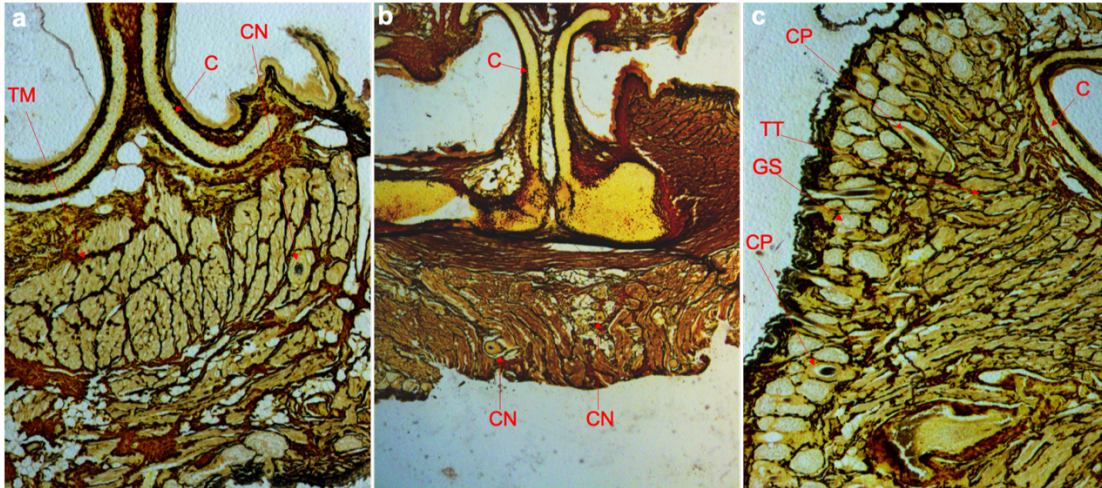


Figura 3. Prancha da base da folha nasal em visão ventral de *Anoura geoffroyi* com coloração em Nitrato de prata. **GS**= glândula sebácea; **TT**= tecido de transição; **CP**= corpo piloso; **CN**= corpo neuronal; **TM**= tecido muscular; **C**= cartilagem. Escala:10  $\mu$ m.

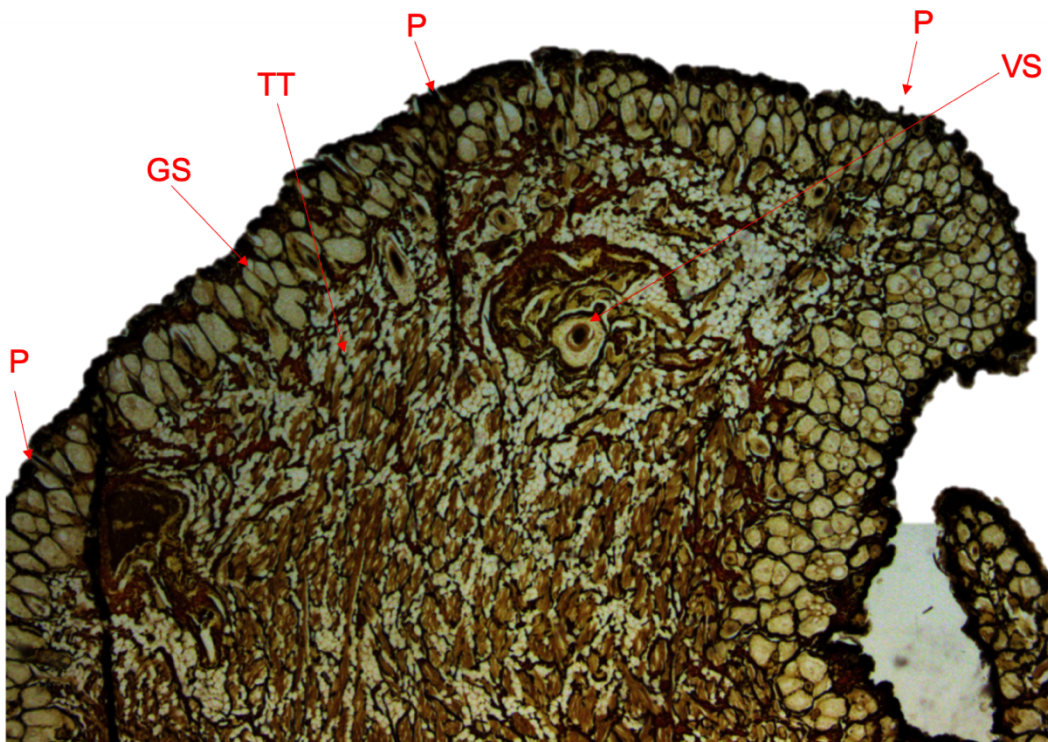


Figura 4. Prancha da base da folha nasal em visão ventral lateral de *Anoura geoffroyi* com coloração em Nitrato de prata. **GS**= glândula sebácea; **TT**= tecido de transição; **P**= pelo ; **VS**= vaso sanguíneo. Escala:10 µm.

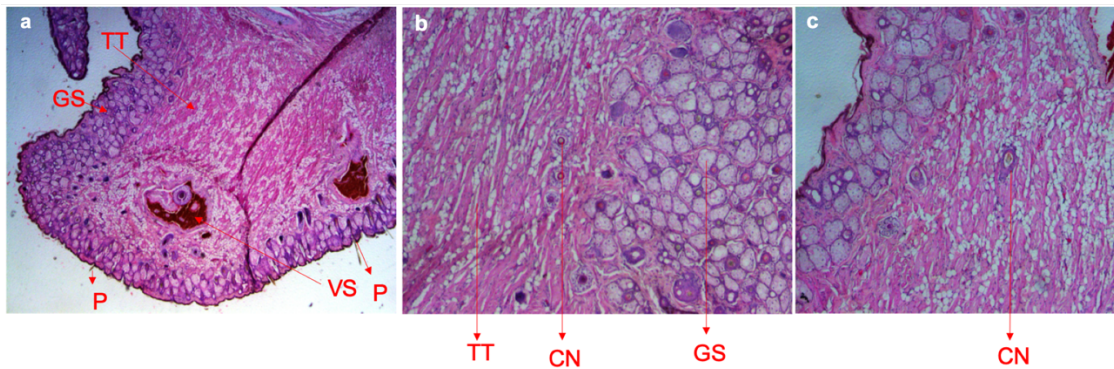


Figura 5. Prancha da base da folha nasal de *Artibeus lituratus* em vista ventral lateral em coloração em Hematoxilina e Eosina. **GS**= glândula sebácea; **TT**= tecido de transição; **VS**= vaso sanguíneo; **P**= pelo; **CN**= corpo neuronal. Escala: 10 µm.



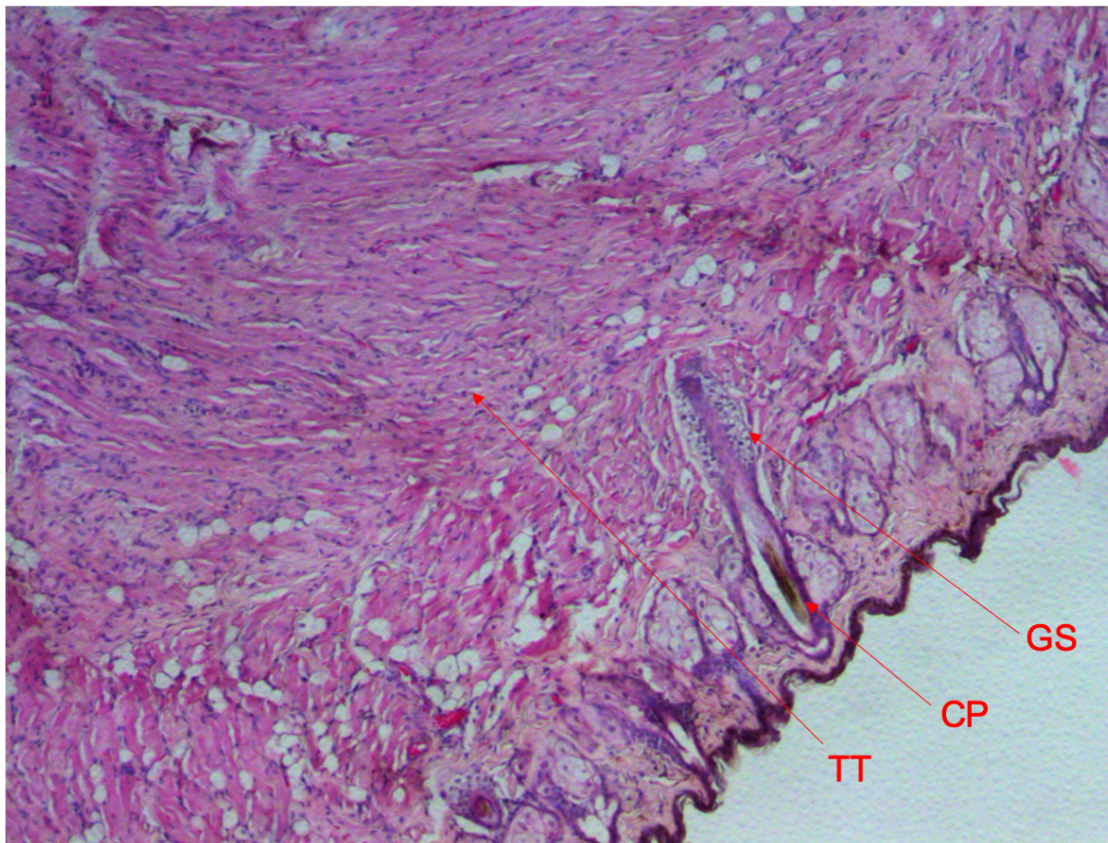


Figura 6. Prancha da base da folha nasal de *Artibeus lituratus* em vista ventral lateral em coloração em Hematoxilina e Eosina. **GS**= glândula sebácea; **TT**= tecido de transição; **CP**= corpo piloso. Escala: 10  $\mu$ m.

### Discussão

Este é o primeiro estudo comparativo da folha nasal em espécies com diferentes dietas e formas de folha, que permitiu a identificação de alguns padrões preservados e outros distintos da folha nasal. A estrutura cartilaginosa por exemplo, é uma estrutura compartilhada em ambas as folhas. Está posicionada de forma homóloga na estrutura, apesar de algumas pequenas diferenças de tamanho e forma da base. A cartilagem parece claramente sustentar a base da lança e a estrutura tecidual superior das narinas (Figura 1

e 2). A posição dos tecidos de transição e tecidos musculares segue um mesmo padrão nas duas folhas, ainda que a quantidade de tecido varie. Em *A. lituratus* há maior quantidade e robustez de tecidos musculares, refletida na aparência externa da folha, que possui estruturas bem demarcadas na base e lança vertical e é espessa (Figura 1). Na folha de *Anoura geoffroyi* mais tecido de transição, provavelmente em decorrência da estrutura da folha, que é menor, menos espessa e não possui uma lança vertical com uma estrutura medial bem marcada acompanhada de duas abas laterais, como *Artibeus lituratus*.

A notória presença muscular na folha nasal pode ser um indicativo de movimentação do aparato, como já observado nos morcegos do Velho Mundo. Ainda que não existam registros de como e quando essa movimentação ocorre em Phyllostomidae, sabe-se por observações em campo e manuseio de espécimes, que a folha se movimenta e a grande presença de tecidos musculares corrobora essa inferência (ver Anexo 1). A movimentação da folha nasal pode ocorrer durante a ecolocalização, auxiliando na direcionalidade do eco e na recepção (Griffin e Novick ;1955; Novick 1977; Hartley e Suthers, 1987), uma vez que os Phyllostomidae são primariamente ecolocalizadores nasais. Entretanto, a movimentação da folha também ocorre, nos Phyllostomidae, em momentos onde o som não está sendo emitindo, sugerindo uma movimentação distinta, mais vibratória, que parece ser de reconhecimento do ambiente, acompanhado muitas vezes pela movimentação da orelha (observação pessoal - ver vídeo), ainda que não descrito detalhadamente na literatura (Leiser-Miller e Santana, 2020).

Glândulas sebáceas já foram observadas atuando como caminhos de secreção sebácea na época reprodutiva de algumas espécies (Nassar et al,

2008). Na folha nasal as glândulas sebáceas aparentam ter a função simples de lubrificação dos pelos. São encontradas em grandes quantidades nas folhas, junto aos folículos (Figuras 3 e 5). A presença de minúsculos pelos na folha nasal, ainda que não vistos a olho nu, pode indicar uma função sensorial, uma vez que esses pelos estão espalhados por todo o contorno da folha nasal, incluindo a lança (Figura 4 e 5 a). A presença de pelos sensoriais é conhecida para mamíferos e outros grupos de vertebrados. Os pelos têm diversas funções sensitivas, como por exemplo na função na escuta do som. Pequenos pelos presentes na cóclea de mamíferos (cílios), incluindo morcegos, executam essa função. A perda desses pelos causa danos irreversíveis a audição (Liu et al., 2021; Rubel et al., 2013). Pelos sensoriais estão presentes também nas asas dos morcegos, e possuem função no controle do vôo (Sterbing-D'Angelo et al., 2011)

A presença de pelos e corpos neuronais na folha nasal sugerem então, uma função sensorial da folha nasal, uma vez que há células nervosas presentes e uma grande quantidade de pelos possivelmente sensoriais (Figura 3). A utilização da folha nasal como órgão sensorial não é uma ideia tão distante para os Phyllostomidae, visto que os *Desmodus rotundus* utilizam suas folhas nasais como um órgão de percepção térmica para predação (Kürten e Schmidt 1982;1984). Dessa forma, a folha nasal de outras espécies de Phyllostomidae com diferentes dietas poderia ter função sensorial para a otimização do forrageamento e captura de presas, utilizando-se das estruturas nervosas encontradas na folha nasal.

Nosso trabalho é o primeiro a mostrar comparativamente, a estrutura histológica da folha nasal de duas espécies de morcegos Phyllostomidae, com

diferentes métodos de coloração e com registro de corpos neuronais e pelos presentes nos tecidos. Diante destes resultados, sugerimos que a folha nasal possa funcionar como um órgão sensorial com outras funções além da recepção mecânica do som. Esses dados mostram que o estudo investigativo a cerca da função da folha nasal ainda possui caminhos a serem explorados, e estudos experimentais e histoquímicos devem ser futuramente mais contundentes, explorando a folha nasal em sua totalidade.

### Referências

- Bielschowsky M. 1904. Die Silberimpregnation der Neurofibrillen. J. Psychol. u. Neurol. 3: 169–188.
- Bogdanowicz W, Fenton MB, Daleszczyk K. 1999. The relationship between echolocation calls, morphology, and diet in insectivorous bats. Journal of Zoology (London) 247: 381-393.
- Dalquest W. W., H. J. Werner, and J. H. Roberts. 1952. The facial glands of a fruit-eating bat, *Artibeus jamaicensis* Leach. Journal of Mammalogy 33(1): 102-103.
- Dalquest W. W., & Werner, H. J. 1954. Histological aspects of the faces of North American bats. Journal of Mammalogy, 35(2), 147-160.
- Díaz M. M., Solari, S., Aguirre, L. F., Aguiar, L.M.S. & Barquez, R. M. 2016. Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica/Chave de identificação dos morcegos da América do Sul. Publicación Especial Nro, 2, 160p.
- Eiting T.P., Smith TD, Dumont ER. 2014. Olfactory Epithelium in the Olfactory Recess: A Case Study in New World Leaf-Nosed Bats. The Anatomical Record, 297(11): 2105-2112.
- Eiting T.P., Smith T. D., Perot J B., Dumont E. R. 2014. The role of the olfactory recess in olfactory airflow. Journal of Experimental Biology 217(10): 1799-1803.

- Eiting T. P., Perot J. B., Dumont E. R. 2015 How much does nasal cavity morphology matter? Patterns and rates of olfactory airflow in phyllostomid bats. *Proc. R. Soc. B* 282: 20142161. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2161>
- Feng L., Gao L., Hongwang L., Muller R. 2012. Noseleaf dynamics during pulse emission in Horseshoe bats. *PloS One*, 7(5): 1–6.
- Griffin D. R., Novick A. 1955. Acoustic orientation of neotropical bats. *Journal of Experimental Zoology*, 130(2): 251-299.
- Göbbel L 2002. Morphology of the external nose in *Hipposideros diadema* and *Lavia frons* with comments on its diversity and evolution among leaf-nosed Microchiroptera. *Cel. Tissue. Organ.* 170(1): 39-60.
- He W., Pedersen S. C., Gupta A. K., Simmons J. A., Müller, R. 2015. Lancer dynamics in greater horseshoe bats, *Rhinolophus ferrumequinum*. *PLoS ONE*, 10(4): 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0121700
- Junqueira L.C., Carneiro J. 2010. *Histologia Básica*. 12<sup>a</sup> Ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Kürten L., Schmidt U. 1982. Thermoperception in the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *J. comp. physiol.* 146. (2): 223-228.
- Kürten L, Schmidt U., Schäfer K. 1984. Warm and cold receptors in the nose of the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Naturwissenschaften* 71.6: 327-328.
- Leiser-Miller, L. B., Santana S. E. 2020. Morphological diversity in the sensory system of phyllostomid bats: Implications for acoustic and dietary ecology. *Functional Ecology* 34(7): 1416-1427.
- Liu Z., Chen P., Yuan-Yuan L., Meng-Wen L. et al. 2021. Cochlear hair cells of echolocating bats are immune to intense noise. *Journal of Genetics and Genomics*. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.06.007>
- Müller R. 2015. Dynamics of biosonar systems in Horseshoe bats. *European Physical Journal: Special Topics*, 224(17–18): 3393–3406. doi: 10.1140/epjst/e2015-50089-7
- Nassar JM, Salazar MV, Quintero A, Stoner KE, Gómez M, Cabrera A, Jaffé K. 2008. Seasonal sebaceous patch in the nectar-feeding bats *Leptonycteris curasoae* and *L. yerbabuenae* (Phyllostomidae: Glossophaginae):

phenological, histological, and preliminary chemical characterization. *Zoology (Jena)*.111(5):363-76.

doi: 10.1016/j.zool.2007.10.006. Epub 2008 Jul 7. PMID: 18602804.

Novick A. 1977 Acoustic orientation. In: Wimsatt, WA (ed) *Biology of bats*, Vol. III. Academic Press, New York San Francisco London, pp 74–289

Rubel E.W, Furrer S.A, Stone J.S. 2013. A brief history of hair cell regeneration research and speculations on the future. *Her.Res.* 297: 42-51

Santana, S. E., Dumont E. R. 2009. Connecting behaviour and performance: the evolution of biting behaviour and bite performance in bats. *Journal of evolutionary biology* 22(11):2131-2145.

Santana S. E., Grosse I. R., Dumont E. R. 2012. Dietary hardness, loading behavior, and the evolution of skull form in bats. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 66(8): 2587-2598.

Sterbing-D'Angelo S., Chadha M., Chiu C., Falk B. et al. 2011. Bat wing sensors support flight control. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(27):11291-11296; <https://doi.org/10.1073/pnas.1018740108>

Vanderelst D., De Mey F., Peremans H., Geipel I., Kalko E.K.V., Firzlaff U. 2010. What noseleaves do for FM bats depends on their degree of sensorial specialization. *PloS one* 5(8): e11893.



## **Conclusão Geral**

Nessa dissertação realizei a compilação de dados referentes à descrição da forma das folhas nasais de Phyllostomidae. Utilizei morfometria geométrica com o método de Análises de Elipses de Fourier (EFA) para mostrar que há uma associação entre a variação da forma da folha nasal com a filogenia e a variação de dieta do grupo. Também demonstrei que há uma tendência de associação entre a morfologia craniana e a forma da folha, o que sugere que as variações ocorrem sob uma mesma pressão evolutiva.

Realizei uma descrição histológica da folha nasal utilizando métodos de coloração com Hematoxilina e Eosina e Nitrato de prata. Identifiquei pelos e corpos neuronais, que sugerem fortemente uma possível função sensorial da folha nasal. Identifiquei também tecidos musculares indicativos de movimentação da folha nasal.

Dessa forma, o estudo investigativo acerca da forma, função e evolução da folha nasal realizado nesse trabalho, trouxe dados inéditos e importantes para o entendimento da função da folha nasal dentro da família dos Phyllostomidae.

## Material Suplementar

Anexo 1.

Vídeo de observação pessoal da movimentação da Folha Nasal de *Artibeus lituratus*, acesso em < <https://youtu.be/juHwdrOkzzA> >

Anexo2.

Tabela 1: Lista de espécies e vouchers utilizadas na análise de morfometria de crânios.

<b>Espécies</b>	<b>Voucher</b>
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	M-78789
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	M-78790
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	M-78792
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0130
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0132
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0789
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0790
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0791
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0159
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0068
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0071
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0164
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0161
<i>Artibeus concolor</i> Peters, 1865	M-267476
<i>Artibeus concolor</i> Peters, 1865	M-267502
<i>Artibeus concolor</i> Peters, 1865	M-266269
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	M-263471
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	M-264689

<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	M-264686
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	M-264685
<i>Artibeus fimbriatus</i> Gray, 1838	M-217553
<i>Artibeus fimbriatus</i> Gray, 1838	M-217550
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 0578
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 0138
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 0577
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 0375
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 0424
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 0091
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 0078
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 0077
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0858
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0351
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0013
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0010
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0016
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0002
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0200
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0204
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0202
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0201
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0133

<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0512
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0514
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0128
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 0278
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 0227
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 0230
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 0223
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 0275
<i>Lonchorhina aurita</i> Tomes, 1863	CCUNB 0778
<i>Lonchorhina aurita</i> Tomes, 1863	CCUNB 0845
<i>Lonchorhina aurita</i> Tomes, 1863	CCUNB 0348
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0860
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0852
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0341
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0342
<i>Mimon crenulatum</i> (É. Geoffroy, 1803)	CCUNB 0345
<i>Mimon crenulatum</i> (É. Geoffroy, 1803)	CCUNB 0347
<i>Phyllostomus discolor</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0374
<i>Phyllostomus</i> <i>discolor</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0632
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0846
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0856

<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0213
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0710
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0704
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 1175
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-248314
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-248312
<i>Sturnira lilium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0623
<i>Sturnira lilium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0440
<i>Sturnira lilium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0624
<i>Sturnira lilium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0720
<i>Trachops</i> <i>cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0857
<i>Trachops</i> <i>cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0207
<i>Chiroderma villosum</i> Peters, 1860	M-209524
<i>Chiroderma villosum</i> Peters, 1860	M-209525
<i>Chiroderma villosum</i> Peters, 1860	M-209526
<i>Chiroderma villosum</i> Peters, 1860	M-209523
<i>Diaemus youngi</i> (Jentink, 1893)	M-209742
<i>Diaemus youngi</i> (Jentink, 1893)	M-209744
<i>Diaemus youngi</i> (Jentink, 1893)	M-209745
<i>Diaemus youngi</i> (Jentink, 1893)	M-209746
<i>Lonchophylla thomasi</i> J.A. Allen, 1904	M-230284
<i>Lonchophylla thomasi</i> J.A. Allen, 1904	M-230281
<i>Lonchophylla thomasi</i> J.A. Allen, 1904	M-230282

<i>Micronycteris</i> <i>minuta</i> (Gervais, 1856)	M-71616
<i>Micronycteris minuta</i> (Gervais, 1856)	M-71615
<i>Micronycteris minuta</i> (Gervais, 1856)	M-71614
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-96010
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-96012
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-96013
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-96014
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-248314
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-248312
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	M-248311
<i>Pygoderma</i> <i>bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	M-234298
<i>Pygoderma</i> <i>bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	M-234297
<i>Pygoderma</i> <i>bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	M-234296
<i>Rhinophylla pumilio</i> Peters, 1865	M-262468
<i>Rhinophylla pumilio</i> Peters, 1865	M-262469
<i>Rhinophylla pumilio</i> Peters, 1865	M-262470
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	M-230627
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	M-230628
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	M-213371
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	M-213370

---

## Anexo 3.

Tabela com espécies e vouchers usados na análise de morfometria da folha nasal.

<b>Especie</b>	<b>Voucher</b>
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	CCUNB 0767
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	CCUNB 0979
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	CCUNB 0783
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	CCUNB 0875
<i>Anoura caudifer</i> (É. Geoffroy, 1818)	CCUNB 0768
<i>Artibeus concolor</i> Peters, 1865	CCUNB 0356
<i>Artibeus concolor</i> Peters, 1865	CCUNB 0490
<i>Artibeus fimbriatus</i> Gray, 1838	CCUNB 0362
<i>Artibeus fimbriatus</i> Gray, 1838	CCUNB 0361
<i>Artibeus fimbriatus</i> Gray, 1838	CCUNB 0707
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0130
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0132
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0021
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0265
<i>Anoura geoffroyi</i> Gray, 1838	CCUNB 0503
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0161
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0724
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0726
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 0727
<i>Artibeus lituratus</i> (Olfers, 1818)	CCUNB 1318
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	CCUNB 0363
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	CCUNB 0367
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	CCUNB 0495
<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	CCUNB 0496

<i>Artibeus obscurus</i> (Schinz, 1821)	CCUNB 0751
<i>Artibeus planirostris</i> (Spix, 1823)	CCUNB 1034
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 1035
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 1038
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 1039
<i>Artibeus planirostris</i> ( Spix, 1823)	CCUNB 1047
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0208
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0209
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0210
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0211
<i>Chrotopterus auritus</i> (Peters, 1856)	CCUNB 0212
<i>Chiroderma doriae</i> Thomas, 1891	CCUNB 0570
<i>Chiroderma doriae</i> Thomas, 1891	CCUNB 0571
<i>Chiroderma doriae</i> Thomas, 1891	CCUNB 0761
<i>Chiroderma doriae</i> Thomas, 1891	CCUNB 0762
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 1028
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 1031
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 1032
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 1033
<i>Carollia</i> <i>perspicillata</i> (Linnaeus,1758)	CCUNB 1253
<i>Chiroderma villosum</i> (Peters, 1870)	CCUNB 0922
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0104
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0105
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0107
<i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	CCUNB 0108



<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 001
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0021
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 003
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 004
<i>Desmodus rotundus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 005
<i>Diaemus youngi</i> (Jentink, 1893)	CCUNB 0199
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0026
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0027
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0028
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0032
<i>Glossophaga soricina</i> (Pallas, 1766)	CCUNB 0049
<i>Glyphonycteris sylvestris</i> Thomas, 1896	CCUNB 1120
<i>Lonchorhina aurita</i> Tomes, 1863	CCUNB 0778
<i>Lonchorhina aurita</i> Tomes, 1863	CCUNB 0845
<i>Lophostoma carrikeri</i> (Allen, 1910)	CCUNB 0736
<i>Lophostoma carrikeri</i> (Allen, 1910)	CCUNB 0855
<i>Lophostoma carrikeri</i> (Allen, 1910)	CCUNB 0861
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 1329
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 1330
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 1135
<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 1136

<i>Lonchophylla dekeyseri</i> Taddei, Vizotto & Sazima, 1983	CCUNB 0712
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0341
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0342
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0600
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0860
<i>Mimon bennettii</i> (Gray, 1838)	CCUNB 0852
<i>Micronycteris microtis</i> Miller, 1898	CCUNB 0330
<i>Micronycteris microtis</i> Miller, 1898	CCUNB 0690
<i>Micronycteris microtis</i> Miller, 1898	CCUNB 0692
<i>Micronycteris microtis</i> Miller, 1898	CCUNB 0329
<i>Micronycteris minuta</i> (Gervais, 1856)	CCUNB 0336
<i>Micronycteris minuta</i> (Gervais, 1856)	CCUNB 0338
<i>Micronycteris</i> <i>minuta</i> (Gervais, 1856)	CCUNB 0339
<i>Micronycteris minuta</i> ( Gervais, 1856)	CCUNB 0734
<i>Micronycteris schmidtorum</i> Sanborn, 1935	CCUNB 0691
<i>Micronycteris schmidtorum</i> Sanborn, 1935	CCUNB 0735
<i>Micronycteris schmidtorum</i> Sanborn, 1935	CCUNB 1118
<i>Micronycteris schmidtorum</i> Sanborn, 1935	CCUNB 1119
<i>Micronycteris schmidtorum</i> Sanborn, 1935	CCUNB 1179
<i>Pygoderma</i> <i>bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0186
<i>Pygoderma</i> <i>bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0420
<i>Pygoderma</i> <i>bilabiatum</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0764
<i>Phyllostomus</i> <i>discolor</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0214
<i>Phyllostomus</i> <i>discolor</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0374
<i>Phyllostomus discolor</i> ( Wagner, 1843)	CCUNB 0377

<i>Phyllostomus discolor</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0632
<i>Phyllostomus elongatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0373
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0846
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0868
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0869
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 1040
<i>Phyllostomus</i> <i>hastatus</i> (Pallas,1767)	CCUNB 0856
<i>Platyrrhinus</i> <i>incarum</i> (Thomas, 1912)	CCUNB 0807
<i>Platyrrhinus</i> <i>incarum</i> (Thomas, 1912)	CCUNB 0808
<i>Platyrrhinus</i> <i>incarum</i> (Thomas, 1912)	CCUNB 0809
<i>Platyrrhinus</i> <i>incarum</i> (Thomas, 1912)	CCUNB 0810
<i>Platyrrhinus</i> <i>incarum</i> (Thomas, 1912)	
<i>Platyrrhinus</i> <i>incarum</i> (Thomas, 1912)	CCUNB 0417
	CCUNB 0302
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0112
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0113
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0116
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 0120
<i>Rhinophylla pumilio</i> (Peters, 1865)	CCUNB 1190
<i>Sturnira liliium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 1385
<i>Sturnira liliium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 1386
<i>Sturnira liliium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 1387
<i>Sturnira liliium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 1384

<i>Sturnira lilium</i> (É. Geoffroy, 1810)	CCUNB 1388
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	CCUNB 0489
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	CCUNB 0625
<i>Sturnira tildae</i> de la Torre, 1959	CCUNB 1168
<i>Tonatia bidens</i> (Spix, 1823)	CCUNB 0851
<i>Trachops cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0679
<i>Trachops cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0680
<i>Trachops cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0027
<i>Trachops cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0205
<i>Trachops cirrhosus</i> (Spix,1823)	CCUNB 0206
<i>Vampyressa pusilla</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0313
<i>Vampyressa pusilla</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0314
<i>Vampyressa pusilla</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0315
<i>Vampyressa pusilla</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 316
<i>Vampyressa pusilla</i> (Wagner, 1843)	CCUNB 0317

---