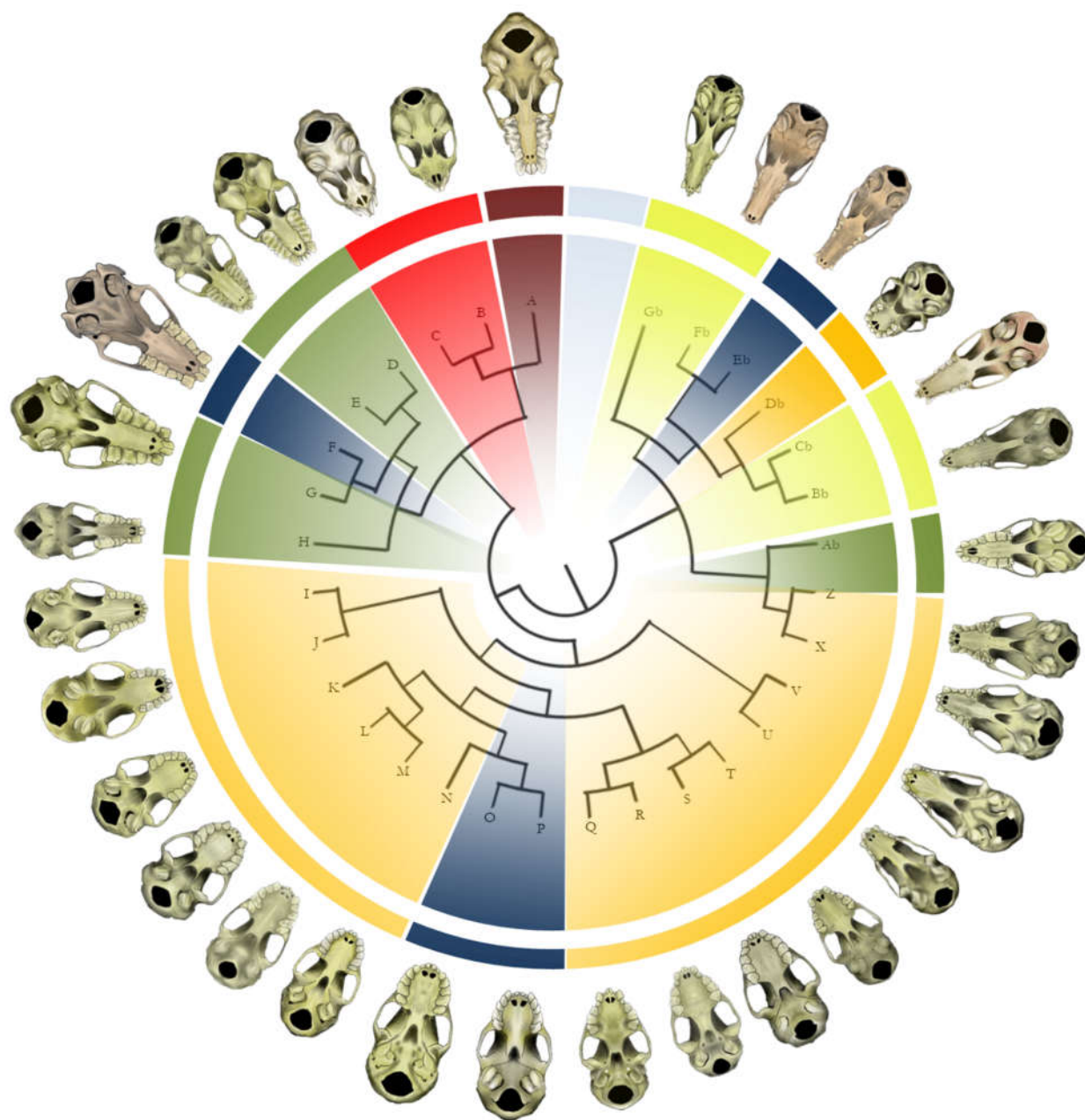


TIAGO FERRAZ DA SILVA

DIVERSIFICAÇÃO CRANIOFACIAL EM MORCEGOS  
FILOSTOMÍDEOS: UM ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-  
FENÓTIPO ATRAVÉS DO GENE RUNX2



Porto Alegre  
2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Genética  
Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular

**DIVERSIFICAÇÃO CRANIOFACIAL EM MORCEGOS FILOSTOMÍDEOS: UM  
ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO ATRAVÉS DO GENE  
RUNX2**

Tiago Ferraz da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação  
em Genética e Biologia Molecular da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tábita Hünemeier

Co-orientação: Dr<sup>a</sup> Gislene Lopes Gonçalves

Porto Alegre, março de 2016.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Evolução Humana e Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e contou com as seguintes fontes financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Tábita Hünemeier, por ter me proporcionado experiências profissionais incríveis, pela confiança e, acima de tudo, por fazer parte de uma transformação tanto pessoal quanto profissional.

À Dr<sup>a</sup> Gislene Gonçalves, pela co-orientação, pela dedicação para com o trabalho e por todos os momentos de discussão científica que tivemos ao longo desse processo, regados a um “bom” café.

Aos órgãos de financiamento, CNPq e CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro.

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cátira Bortolini, por ter me acolhido em seu laboratório durante o período do meu mestrado. Aos colegas e amigos do Laboratório de Evolução Humana e Molecular (LEHM), pela ótima recepção e convivência durante esses dois anos.

Ao curador da coleção científica de mamíferos da Fundação Universidade Regional de Blumenau, Dr. Sérgio Luiz Althoff, por colaborar com amostras tão ricas em termos de diversidade, e pelo preciosismo demonstrado nos dados e nos próprios espécimes cedidos para execução deste projeto.

Agradeço também ao grupo de pesquisa do Laboratório de Evolução de Mamíferos (LEM) da USP, pela ótima recepção no curto espaço de tempo em que estive com vocês.

Ao grupo de pesquisa do Centro Nacional Patagónico – CENPAT, pela ótima recepção. Em especial ao Dr. Rolando Gonzalez José por todas as sugestões e discussões de ideias ao projeto.

Aos amigos e familiares, agradeço pelo apoio incondicional e por me aturarem durante o processo. À minha família: meus pais, minha avó, minha madrinha Marlene e aos meus pais “adotivos” Marco e Regina, entre tantos outros amigos e familiares que estiveram presentes durante esse caminho.

Aos amigos de longa data: Mariane M. (Mari), Núbia, Priscila Z. (Pri), Lilian (Lilão), Cassio, Luciane (Lu), Ricardo (Ricas), Cíntia (Pimpas), Thiago Borges (TJBorges), Manuel,

Fernando, Isadora (Isa), Fabricio, Flávia (Flavinha), Máisa, Letícia (Lê) e tantos outros que conheci e que fazem parte dessa jornada, sintam-se contemplados nesse grande obrigado.

Em especial a duas pessoas muito especiais que o mestrado me proporcionou conhecer, Giovanna e Nicole. Duas pessoas tão diferentes e especiais que não existem barreiras, tão pouco assuntos polêmicos demais que não possam ser discutidos. A vocês meu sincero muito obrigado, pela confiança, pelo sofá sempre disponível, cafês divertidos e filosóficos e principalmente por toda “treta”.

Ao pesquisador ou amigo esquecido, obrigado.

## SUMÁRIO

Resumo .....	11
Abstract.....	13
.....	13
I. Introdução.....	14
<b>I.I. Evolução morfológica e molecular</b> .....	14
<b>I.II. Os morcegos filostomídeos como estudo de caso</b> .....	16
<b>I.III. O gene <i>RUNX2</i> e a variação craniofacial adaptativa</b> .....	21
II. Objetivos .....	25
<b>II.I. Objetivo geral</b> .....	25
<b>II.II. Objetivos específicos</b> .....	25
III. Material e Métodos .....	26
<b>III.I. Amostras</b> .....	26
<b>III.II. Análises laboratoriais</b> .....	26
<b>III.III. Morfometria craniofacial</b> .....	27
<b>III.III. Correlação fenótipo-genótipo-dieta</b> .....	31
IV. Resultados .....	36
<b>IV.I. Repetição <i>in tandem</i> do <i>RUNX2</i>: taxa Q/A</b> .....	36
<b>IV.II. Teste de Correlação de Pearson</b> .....	41
<b>IV.III. Correlação taxa Q/A e medidas morfológicas</b> .....	44
V. Discussão .....	50
<b>V.I Variação na taxa Q/A e diferenciação intraespecífica</b> .....	50
V. Considerações Finais .....	56
Referências Bibliográficas.....	57

## Resumo

---

Os morcegos da família Phyllostomidae, endêmicos da região Neotropical, apresentam notáveis padrões de diversificação nas formas craniofaciais que são associadas às especializações alimentares. Entretanto, as bases genéticas e do desenvolvimento responsáveis pela geração e manutenção de tais especializações adaptativas são amplamente desconhecidas; não apenas nesta linhagem evolutiva, mas para vertebrados de forma geral. Dentre os diversos genes já investigados e associados à morfologia craniofacial, o *RUNX2* apresenta amplo potencial de envolvimento causal na diversificação de formas observadas em morcegos filostomídeos. Repetições *in tandem* na taxa de aminoácidos Glutamina por Alanina (taxa Q/A), relacionadas à morfologia craniana, foram verificadas em carnívoros, porém, o padrão não se manteve quando analisadas outras linhagens de mamíferos como um todo. Neste contexto, o presente estudo analisa, de forma pioneira, o papel da taxa Q/A na diversificação morfológica craniofacial em uma linhagem específica de mamíferos (morcegos filostomídeos) com particular adaptação (distintas dietas, *e.g.* carnivoria, frugivoria, insetivoria, nectarivoria, onivoria, sanguinivoria). Utilizou-se a abordagem de associação genótipo-fenótipo através de diferentes métodos estatísticos (*e.g.* correlação de Pearson e inferência Bayesiana), incluindo ainda a relação entre os hábitos alimentares e os traços genotípicos e fenotípicos como variável latente. As análises foram controladas para a não-independência filogenética dos dados, empregando métodos filogenéticos comparativos. Foram verificadas correlações significativas entre a taxa Q/A e diferentes medidas craniométricas que descrevem as mudanças na morfologia integrativa do crânio, em especial a largura e comprimento da maxila superior. Uma correlação positiva entre o aumento da taxa Q/A e os hábitos de frugivoria e onivoria foi verificada, sugerindo também a existência

de interação entre o hábito alimentar e as medidas de comprimento e largura da maxila superior, especialmente para animais frugívoros e onívoros.



## Abstract

---

Phyllostomidae bats, a family endemic to the Neotropics, show remarkable diversification in craniofacial forms that are associated with feed specializations. However, the genetic and developmental bases responsible for the generation and maintenance of such morphological adaptation are largely unknown, not only on this evolutionary lineage, but for vertebrates in general. Among the several genes associated with craniofacial morphology so far, RUNX2 is a putative candidate to underlie diversification of forms found in phyllostomids. Tandem repeats in the rate of Glutamine by Alanine amino acids (Q/A ratio), related to cranial morphology, have been demonstrated in carnivores. However, such pattern was not clear when other mammalian lineages were analyzed as a whole. In this context, the present study examines, for the first time, the role of rate Q/A on craniofacial variation in a specific lineage of mammals (phyllostomids) with marked feed specializations (e.g. carnivorous, frugivorous, insectivorous, nectarivorous, omnivorous, hematophagous). The correlation between genotypes and phenotypic traits were made with different statistical methods (e.g. Pearson correlation and Bayesian inference), including the latent variable of diet as well. Such analysis were controlled for the non-independence phylogenetic effect using phylogenetic comparative methods. Significant correlations were observed between different Q/A rates and cranial measurements, which describes changes in the integrative morphology of the skull, especially the length and width of the upper jaw. In addition, a positive correlation between the increase in Q/A rate and frugivorous/omnivorous diet habits was observed, also suggesting the interaction between feed specializations, length and width of the upper jaw, especially for fruit-eating and omnivores animals.

## I. Introdução

---

### I.I. Evolução morfológica e molecular

Ao longo de milhões de anos, diferentes processos evolutivos modificaram e adaptaram os organismos a determinados ambientes. Entretanto, dentre as mudanças recorrentes (*e.g.* comportamentais, bioquímicas e fisiológicas), aquelas que envolvem alterações na morfologia são as mais amplamente discutidas (Popadic *et al.* 1998).

A história natural da maioria dos grupos animais proporciona diversos exemplos de evolução morfológica ocorrendo desde tempos remotos (Gould 1989). Porém, apesar da ampla documentação dessas diferenças ao longo de séculos, ainda não existe uma compreensão sólida sobre a origem e os mecanismos responsáveis por tal variação, o que leva a questionamentos, como por exemplo: como surgem novas morfologias? E quais são as bases genéticas e do desenvolvimento correspondentes? Na última década, com o avanço das áreas da genética molecular e do desenvolvimento, houve um amplo progresso sobre tais questões biológicas fundamentais, embora os processos responsáveis pelas mudanças ainda permaneçam pouco conhecidos (Hoekstra 2006).

A conexão entre o *design* morfológico e uma dada função é um questionamento central na biologia evolutiva, sendo responsável por padrões naturais na distribuição de espécies animais, diversificação filogenética e especializações morfológicas (Swartz *et al.* 2003). Assim, a abordagem integrativa desta inter-relação no contexto da genética evolutiva, tal como a identificação de fenótipos morfológicos conspícuos e funcionais associados a determinados genótipos, é um tema fundamental na fronteira do conhecimento da evolução biológica darwiniana.

Até muito recentemente considerou-se que as amplas diferenças fenotípicas eram resultado de inúmeras substituições gênicas, cada uma com efeitos relativamente pequenos (Futuyma 1986). Tal proposição foi estabelecida com base em extrapolações a partir de estudos com genes *housekeeping* e na alta capacidade da genética de populações em prever os resultados de mudanças nas frequências alélicas em populações naturais (Popadic *et al.* 1998). No entanto, a partir da possibilidade de sequenciamento de DNA em ampla escala, estudos atuais com genes que regulam o processo de desenvolvimento e genes que codificam receptores e sinalizadores de complexas redes metabólicas sugerem que poucas mutações podem ter grande efeito, afetando diretamente a morfologia (Abzhanov *et al.* 2006; Hoekstra 2006; Manceau *et al.* 2010). Alguns exemplos de mutações pontuais associadas a grandes mudanças fenotípicas incluem: (i) variação adaptativa na coloração da pelagem no camundongo-da-praia (*Peromyscus maniculatus*) associada a uma única mudança não sinônima no gene *ASIP* (Hoekstra *et al.* 2006); (ii) variação morfológica craniofacial nas aves tentilhões de Darwin da Ilha de Galápagos associada ao gene *Bmp4* (Abzhanov *et al.* 2004) e a rota metabólica da calmodulina (Abzhanov *et al.* 2006); e (iii) alterações craniofaciais relacionadas a mutações no gene *FGFR1* e *FGFR2* em populações humanas (Martínez-Abadías *et al.* 2011; Gomes-Valdez *et al.* 2013; Hünemeier *et al.* 2014;).

Entretanto, embora atualmente exista um grande volume de evidências empíricas de que pequenas mudanças em regiões gênicas podem ter um grande efeito e contribuir significativamente para alterações morfológicas, ainda é muito discutido se as alterações encontradas entre e dentro das espécies são produto de alterações em regiões controladoras

transcritas, mas não traduzidas (Abzhanov *et al.* 2006; Shapiro *et al.* 2004) ou resultado de alterações diretas em genes estruturais ou reguladores (Hoekstra 2006).

De maneira geral, genes que codificam fatores de transcrição envolvidos nos estágios iniciais do desenvolvimento são altamente conservados (Vogel *et al.* 2006; Nei 2007). Porém, mutações que levam a alterações na expressão ou ainda na estrutura de uma proteína regulatória podem afetar de maneira indireta, porém determinante, uma rede de outros genes sujeitos a regulação pela proteína alterada e que não apresentam nenhuma modificação em sua estrutura molecular original (Carroll 2003). Sendo assim, compreender de que forma mudanças na regulação gênica podem alterar o fenótipo é consideravelmente mais complexo do que a investigação de mudanças gênicas estruturais (Wray *et al.* 2006).

Nesse contexto, a abordagem de mudanças estruturais em genes candidatos é uma alternativa direta para iniciar investigações de associação genótipo-fenótipo em populações naturais com organismos não-modelo, requerendo uma metodologia clara para a identificação dos genes alvo, bem como o completo entendimento das redes e rotas responsáveis pelo desenvolvimento de características complexas (Honeycutt 2008).

## **I.II. Os morcegos filostomídeos como estudo de caso**

Dentro do contexto de mudanças evolutivas que envolvem uma série de alterações morfológicas específicas, um exemplo claramente conspícuo é a variação craniofacial observada em morcegos filostomídeos.

A família Phyllostomidae é considerada um grupo taxonômico recente, cuja origem data entre 35 a 40 milhões de anos (Datzmann *et al.* 2010), quando comparada a outras

subordens dentro dos Microquirópteros (50 a 60 milhões de anos). Os filostomídeos ocupam predominantemente a região Neotropical, na América do Sul e Central (Wilson & Reeder 2005), representando uma radiação adaptativa única em termos de diversidade ecológica e morfológica entre os mamíferos (Freeman 2000). São reconhecidos 53 gêneros e aproximadamente 160 espécies neste grupo. Phyllostomidae apresenta especializações alimentares e craniofaciais bem estabelecidas, como: nectarivoria, frugivoria, insetivoria, carnivoria, granivoria, onivoria e hematofilia (Wetterer *et al.* 2000; Nogueira & Peracchi 2003; Rex *et al.* 2010). Cada uma destas guildas tróficas é representada por formas cranianas marcadamente distintas, o que evidencia um padrão de associação entre a forma e sua função (Figura 1). As bases genéticas e do desenvolvimento responsáveis pela geração e manutenção de tais especializações são ainda desconhecidas, não apenas nesta linhagem evolutiva em particular, mas para vertebrados de forma geral. Um dos raros estudos que permeiam esse tema foi o de Phillips *et al.* (2013), que trata da dinâmica evolutiva do fator de transcrição Pax9 e a diversificação craniofacial em morcegos.

Neste âmbito, o presente estudo busca contribuir com um passo inédito na elucidação das trajetórias genéticas que determinam características únicas na morfologia craniofacial, com forte evidência de adaptações para diferentes estratégias alimentares. Sugere-se que tal diversidade ecológica e especializações originaram-se a partir de uma intrincada partição de recursos (Aguirre *et al.* 2002; Aguirre *et al.* 2003), sendo provavelmente responsável pela alta riqueza local de espécies observada nos filostomídeos (Simmons & Voss 1998; Voss & Emmons 1996). Assim, é sugerido que a evolução de dietas especializadas gerou requisitos funcionais que determinam as mudanças observadas na forma do crânio (Freeman 2000; Swartz *et al.* 2003; Monteiro & Nogueira 2011). A magnitude desta variação entre linhagens

de morcegos filostomídeos é ampla e já foi documentada através de estudos correlacionais tanto qualitativamente quanto quantitativamente, utilizando medidas de relevância funcional (Freeman 2000; Swartz *et al.* 2003; Freeman *et al.* 1998; Dumont 1999, 2003; Van Cakenberghe *et al.* 2002). Um aspecto singular da variação fenotípica nesta família é o alongamento do focinho associado à nectarivoria (Monteiro & Nogueira 2011).

Nogueira *et al.* (2009) demonstraram que outras mudanças na forma da mandíbula e crânio, tal como o tamanho relativo de processos mandibulares, a posição e robustez do arco zigomático, e o tamanho e posição relativa da fileira de dentes, independentes da variável tamanho, são associadas com a força da mordida. Outros estudos demonstram que a estrutura dos dentes e composições de sustentação do crânio são altamente consistentes entre morcegos insetívoros, porém muito distintas em grupos que possuem dietas mais especializadas (Swartz *et al.* 2003).

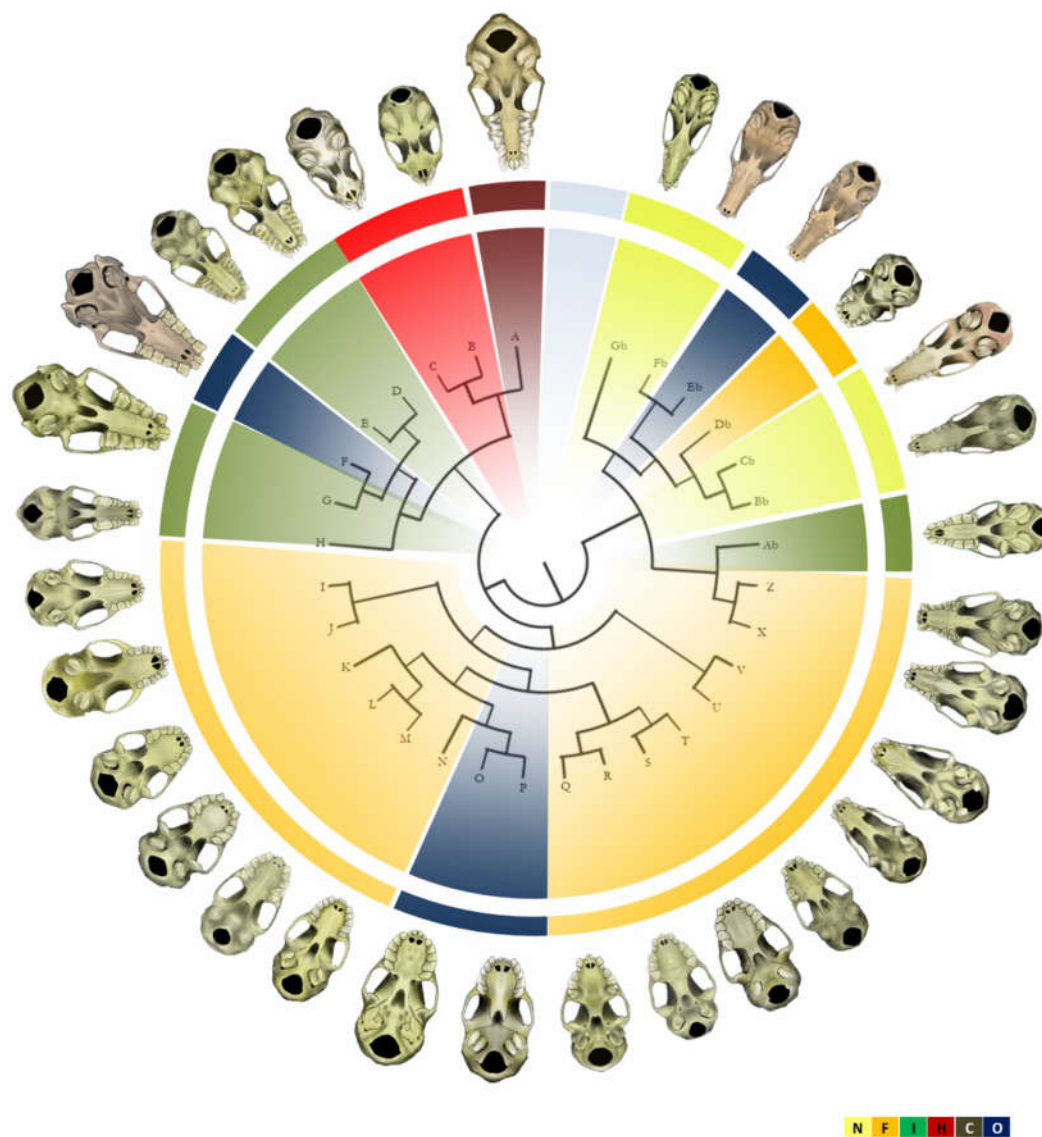


Figura 1: Relações evolutivas entre as espécies utilizadas neste estudo, evidenciando a variação morfológica observada na maxila superior e os hábitos alimentares (legenda interna: N, nectarívoro; F, frugívoro; I, insetívoro; H, hematófago; C, carnívoro; O, onívoro). Espécies: A. *Chrotopterus auritus*, B. *Diphilla ecaudata*, C. *Desmodus rotundus*, D. *Mimon crenulatum*, E. *M. bennettii*, F. *Phyllostomus hastatus*, G. *P. elongatus*, H. *Lophostoma silviculum*, I. *Sturnira tildae*, J. *S. lilium*, K. *Artibeus obscurus*, L. *A. jamaicensis*, M. *A. lituratus*, N. *A. watsoni*, O. *A. glaucus*, P. *A. gnomus*, Q. *Chiroderma villosum*, R. *C. doriae*, S. *Vampyrodes caraccioli*, T. *Vampyressa pusilla*, U. *Rhinophylla pumilio*, V. *R. fischeriae*, X. *Carollia subrupha*, Z. *C. perspicillata*, Ab. *Glyphonycteris sylvestris*, Bb. *Glossophaga soricina*, Bc. *G. commissarisi*, Bd. *Pygoderma bialbiatum*, Be. *Anoura caudifer*, Bf. *A. geoffroyi*, Bg. *Lochophylla thomasi*

Em relação à dentição, os morcegos carnívoros também apresentam características particulares, com uma ponte metaestilar alongada sobre os molares superiores e um alargamento recíproco dos protoconídeos entrelaçados. Tais características são relacionadas à capacidade de cortar itens alimentares ao invés de esmagá-los, sendo verificada também em outros grupos de mamíferos. Além disso, estes morcegos possuem molares inferiores com pequenas áreas talonídeas em relação às áreas trigonídeas e uma área total relativamente aumentada da fileira de dentes molares superiores. Assim, sugere-se que ambas as características estejam relacionadas à maior eficiência no corte do alimento em relação a pouca eficácia de esmagamento (Freeman 1998, 2000). Além destas características, morcegos carnívoros também possuem mandíbulas relativamente finas, cérebro e órgão *pinnae* grandes, eixo basicranial negativamente inclinado e massa corporal elevada em comparação com as espécies unicamente insetívoras (Freeman 1984).

Os padrões morfológicos observados nas espécies carnívoras são reconhecidos em menor grau entre os morcegos insetívoros, que se alimentam principalmente de insetos de tegumento mole (*e.g.*, larvas de mariposas), em contraste com aqueles que se especializaram em presas relativamente duras e resistentes (*e.g.*, besouros) (Freeman 1979, 1981). Os morcegos que se alimentam de presas rígidas em geral possuem crânios robustos e dentes fortes, caninos alongados e rosto curto e largo (Swartz *et al.* 2003), características que apresentam convergência com grupos filogeneticamente muito distantes, como felinos e hienas (Freeman 1984, 2000). Estas linhagens independentes compartilham rosto curto e largo com caninos mais próximos do fulcro da mandíbula, permitindo um aumento em volume do músculo masseter e, em alguns casos, também do músculo temporal, que são determinantes da magnitude da força de mordida.



Os exemplos citados acima apresentam particularidades na morfologia especializada em nectarivoria, carnivoría e insetivoria, representando parte da ampla variedade de alterações na morfologia craniofacial já documentada em morcegos. Essas alterações marcantes na evidenciam um sistema altamente promissor em termos evolutivos para o estudo das bases genéticas e do desenvolvimento responsáveis pelo surgimento de estruturas adaptativas complexas.

### **I.III. O gene *RUNX2* e a variação craniofacial adaptativa**

O gene *RUNX2* (*Runt-related transcription factor 2*) é considerado um dos mais importantes fatores de transcrição da família *RUNX*, sendo responsável por desempenhar um papel crucial na diferenciação de células ósseas (Komori *et al.* 1997), e promover a modificação e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos maduros, produtores de matriz óssea durante a osteogênese (Levanon & Groner 2004). A família dos genes *RUNX* é composta por três genes: *RUNX1*, *RUNX2* e *RUNX3*, que compartilham o mesmo motivo de ligação ao DNA (*Runt Domain*). O gene *RUNX2* apresenta aproximadamente 220 kb, oito éxons e duas regiões promotoras, além de uma região de repetição em tandem de aminoácidos (Ziros *et al.* 2008). Essa região rica em glutamatos (Q), seguida de uma região rica em alaninas (A), proporciona à proteína um mecanismo de ajuste de repressão e ativação de diversas rotas gênicas complexas para que a transição celular ocorra (Schroeder, Jensen & Westendorf, 2005).

Os estudos envolvendo o gene *RUNX2* envolvem ensaios executados *in silico*, *in vitro* e alguns modelos experimentais em animais transgênicos, como *zebrafish* (Flores *et al.* 2004) e camundongos (Komori *et al.* 1997; Inada *et al.* 1999). Além disso, estudos com

populações humanas, sob a perspectiva da genética médica, demonstraram que a haploinsuficiência do gene *RUNX2* está associada à displasia cleidocraniana (CCD), uma doença autossômica dominante que é caracterizada por anomalias esqueléticas sistêmicas, provocando o encurtamento da face, anomalias na dentição permanente e alterações na estatura dos indivíduos afetados (Mundlos *et al.* 1997; Otto *et al.* 2002; Napierala 2005; Hansen *et al.* 2011). Entre animais modelos, camundongos *knock-out* para o gene *CBFa1/RUNX2* apresentam uma série de malformações esqueléticas (Komori *et al.* 1997).

Transpondo esses conhecimentos para o estudo associativo de evolução molecular e morfológica, Fondon *et al.* (2004) avaliaram a correlação entre diferentes motivos de repetição em sequência presentes em um painel de 32 genes do desenvolvimento e seus efeitos sobre o fenótipo craniofacial em diferentes raças de cães domésticos (*Canis lupus familiaris*). Os autores descreveram uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a região de repetição Q/A do gene *RUNX2* e o grau de inclinação da face, resultado da razão entre o comprimento dorsal da face sobre o comprimento ventral (*clinorhynch* ou *dorsoventral nose bend*), e tamanho da face (*middle face*) dos caniformes. Além disso, os autores também evidenciaram a interação entre as regiões poliQ e poliA como um mecanismo de ajuste fino de ativação e repressão de afinidade da proteína *RUNX2* aos seus sítios de ligação no DNA.

Sears *et al.* (2007) demonstraram que a expressão diferencial do gene *RUNX2* está correlacionada positivamente com o tamanho da face em carnívoros caniformes. Os autores realizaram um ensaio funcional que demonstrou o aumento da expressão gênica decorrente do número de glutamatos (Q) sobre o número de alaninas (A) presentes na região de repetição (taxa Q/A). No entanto, essa correlação positiva não é suportada quando se

compara a taxa Q/A e o tamanho da face em determinadas linhagens de mamíferos representantes do grande grupo Eutéria (Pointer *et al.* 2012), que possuem ampla diversidade craniofacial e diferenças extremas em hábitos alimentares.

A ausência de um padrão consenso nos resultados dos estudos acima citados leva aos seguintes questionamentos: a) O quanto a taxa Q/A influencia na projeção da face em uma família de mamíferos que apresenta ampla variação craniofacial relacionada à especialização alimentar, como os morcegos filostomídeos? E, b) Qual a contribuição do hábito alimentar para os desfechos fenotípicos observados?

Estudos morfológicos prévios com a família Phyllostomidae sugerem uma forte relação entre a morfologia craniofacial e as diferentes especializações alimentares (*e.g.* Freeman 1988, 1981; Dumont 2004; Nogueira *et al.* 2005; Santana *et al.* 2012). Os aspectos filogenéticos entre as espécies que compõem essa família apresentam um padrão hierárquico intrincado, e com incongruências dentre os diferentes métodos de estimativa de história evolutiva compartilhada testados, sejam eles inferidos através de dados moleculares ou de traços morfológicos (Davalos *et al.* 2012).

Phyllostomidae é uma das famílias de quirópteros neotropicais melhor estudada por abranger uma série de modificações cranianas em resposta a adaptações funcionais bem estabelecidas e frente à variedade de hábitos alimentares (Dumont 2007). Porém, como em diversas outras linhagens de mamíferos, pouco se sabe sobre as bases genéticas que controlam o ajuste fino dessas variações. A contribuição genética e molecular subjacente à variação morfológica, assim como as correspondentes implicações na especiação e diversidade fenotípica encontrada em populações naturais, são desconhecidas, o que demonstra um campo de atuação promissor para estudos multidisciplinares.

Desta forma, o presente trabalho é um estudo exploratório que visa testar a correlação entre diferentes traços fenotípicos faciais e a região de repetição do gene *RUNX2* em morcegos da família Phyllostomidae, controlando para a não independência filogenética, e hipotetizando o papel da taxa Q/A no ajuste fino de estruturas. Também é investigado se, e como, os diferentes hábitos alimentares influenciam a variabilidade desse fenótipo e sua relação com a variabilidade das repetições *in tandem*.

## II. Objetivos

---

### II.I. Objetivo geral

O objetivo deste estudo é identificar mudanças estruturais na região relativa às repetições glutamato-alanina (taxa Q/A) do gene *RUNX2* e testar a correspondente correlação com a variação no comprimento da face de morcegos Phyllostomidae com diferentes hábitos alimentares, controlando para a não-independência filogenética.

### II.II. Objetivos específicos

(a) Testar a possível correlação da variação na taxa Q/A com a variação morfológica da maxila superior de representantes da família Phyllostomidae;

(b) Analisar a influência dos hábitos alimentares sobre os traços morfológicos utilizados neste estudo.

### III. Material e Métodos

---

#### III.I. Amostras

Foram utilizadas nesse estudo 31 amostras pareadas de crânios e tecidos de morcegos filostomídeos representativos das distintas guildas alimentares (insetívoros, carnívoros, frugívoros, hematófagos, nectarívoros, onívoros) de forma a abranger a ampla diversidade craniofacial observada nessa linhagem (Tabela 2, Figura1). Os espécimes foram obtidos a partir de colaboração e empréstimo da coleção científica de Mastozoologia da Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB).

#### III.II. Análises laboratoriais

A caracterização genotípica foi feita através da análise da taxa Q/A do gene *RUNX2* de 31 espécies de morcegos da família Phyllostomidae. As amostras de tecido (músculo) foram submetidas à extração de DNA utilizando o protocolo de extração do kit comercial Tissue Easy Blood Kit (Qiagen), seguido de um passo de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) da região de repetição do gene *RUNX2* via *nested* PCR, com base em *primers* e condições propostas por Pointer *et al.* (2012). As condições de PCR foram padronizadas para as diferentes espécies do presente estudo. Os produtos de PCR foram submetidos à purificação pelo método enzimático (utilizando as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* e *Exonuclease I*) e sequenciados pelo método Sanger em um equipamento ABI3730xl (Applied Biosystems Inc.), utilizando os mesmos *primers* empregados na reação de amplificação (*forward* e reverso). Os dados inéditos gerados serão depositados no banco de dados GenBank.

As sequências obtidas foram analisadas no software *Condon Code Aligner* (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA), alinhadas utilizando o algoritmo *ClustalW* (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) e submetidas a um critério de seleção prévio, que considerou apenas as sequências que apresentavam as regiões conservadas que flanqueiam a repetição de aminoácidos estudada (Tabela 1). Essas regiões foram utilizadas como marcadores de referência para início e término da região de interesse. A taxa Q/A para cada indivíduo foi obtida através da razão entre o número de aminoácidos glutamato repetidos em sequência e o número de alanina subsequentes (Tabela 2).

### **III.III. Morfometria craniofacial**

Os crânios foram fotografados pelo mesmo operador (TFS) utilizando uma câmera digital Nikon Pro D90, com distância focal de 50 mm. Cada crânio foi nivelado sobre uma base maleável de cerâmica plástica, e então fotografado (Figura 2A). Para a extração das medidas de cada traço morfológico estabelecido (Tabela 3, Figura 2B) foi utilizado o software AxioVision v4.9.1.0 (Carl Zeiss Microscopy, Jena), bem como um paquímetro digital (Mitutoyo Digital, 0-150mm, 0.01). A escala métrica de cada foto (em mm) foi calibrada por uma referência real sobre a base fotografada. Para testar o viés de escalonamento das distâncias entre os pontos nos comparamos às distâncias mensuradas através de fotografias e medidas tomadas com o paquímetro digital (dados não apresentados). Cada uma das medidas foi tomada em duplicata, e as respectivas médias foram utilizadas para as análises de associação genótipo-fenótipo.

A variação no tamanho da maxila superior e da largura entre os arcos zigomáticos foi representada por cinco medidas euclidianas que descrevem a variação de comprimento e

largura entre pontos anatômicos importantes para a manutenção e composição da forma craniana de mamíferos (Velazco & Paterson, 2014).

A medida de comprimento da maxila superior (MTRL-Pal), largura entre os arcos zigomáticos (ZB), largura da maxila superior (M2) e a largura do processo mastoide foram corrigidas pelo comprimento total do crânio (TLS). Essa correção aplicada às medidas de largura e comprimento foi feita a partir de uma razão entre os traços anatômicos de interesse (MTRL-Pal, ZB, M2 e MB), e uma medida de dimensionalidade do crânio (TLS). Removendo a variação de tamanho inserida pela diferença no tamanho total dos crânios entre as espécies.



Tabela 3. Descrição das medidas de distância utilizadas neste estudo.

Sigla	Medida	Descrição
MB	Largura total do crânio	Amplitude do processo mastoide.
ZB	Largura do Zigomático	Amplitude dos arcos do zigomático.
MTRL	Comprimento da maxila superior	Distância entre intersecção dos incisivos à superfície mais posterior da coroa do último dente (M2 ou M3).
M2	Largura da maxila superior	Largura do palato; distância entre as margens labiais dos alvéolos de M1.
TLS	Comprimento total do crânio	Comprimento total do crânio; distância entre o ponto mais posterior na região occipital e o ponto mais anterior da pré-maxila (entre os incisivos).

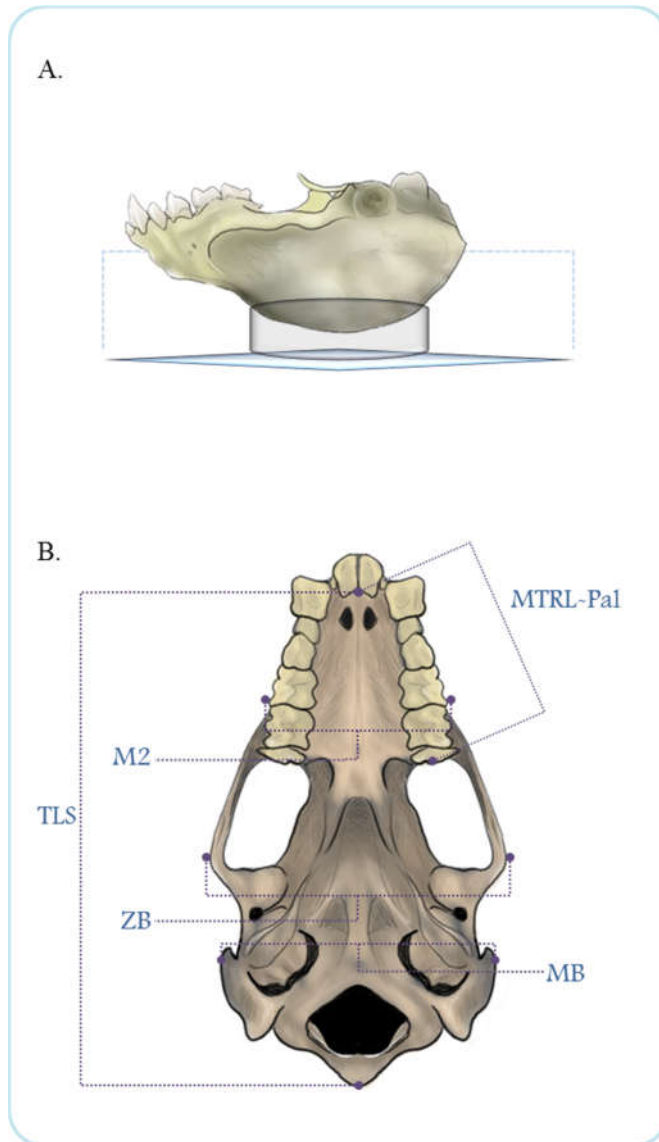


Figura 2: A) Nivelamento e padronização da inclinação craniana para a obtenção das fotografias. B) Medidas cranianas utilizadas neste estudo, representadas esquematicamente por um crânio de *Phyllostomus hastatus* em visão ventral. MTRL-Pal = distância entre a interseção dos incisivos e o ultimo dente (M2 ou M3); M2 = distância entre as margens labiais dos M1s, largura da maxila superior (M1-M1); ZB= largura máxima entre os arcos zigomáticos; MB= Largura máxima entre os processos Mastoides; TLS = distância entre a porção mais posterior do occipital e a porção mais anterior entre os incisivos.

### III.III. Correlação fenótipo-genótipo-dieta

Para acessar as correlações entre os traços morfológicos, a taxa de repetição Q/A e a classificação de dieta foram utilizados três métodos estatísticos:

- a. Teste de correlação de Pearson;
- b. Modelo Bayesiano de correlação entre taxas de substituição e traços quantitativos (Coevol; Lartillot & Poujol 2014);
- c. Modelo Bayesiano de análise filogenética multivariada de susceptibilidade latente (Cybis *et al.* 2015).

O teste de correlação de Pearson foi aplicado como uma ferramenta exploratória sobre as relações entre os dados. A análise feita aqui sobre os dados brutos (taxas morfométricas e de repetição Q/A) estimou os coeficientes de correlação entre os traços fenotípicos e genotípicos, de forma a recuperar um padrão de correlação mais basal, sem acrescentar correções adicionais. Em seguida, realizou-se uma análise mais robusta para entender como essas correlações ou padrões de covariância se relacionam entre si e assim possibilitar uma compreensão sobre como um dado genótipo pode influenciar o fenótipo nas espécies estudadas.

O método probabilístico de correlação de traços fenotípicos (quantitativos) e moleculares (Lartillot & Poujol, 2011) baseia-se na inferência de evolução fenotípica através de uma análise multivariada, controlando para uma história filogenética compartilhada. Esse método assume que os processos evolutivos sobre as taxas de substituição e sobre os caracteres morfológicos estão de acordo com o processo de difusão Browniano. A transição dos traços fenotípicos é mapeada sobre uma topologia consenso de árvore e atribuída ao

conjunto de dados analisados, sem levar em conta a incerteza filogenética. Esse método está implementado sobre uma plataforma bayesiana *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) e permite testar hipóteses sobre as correlações entre o genótipo-fenótipo através da mensuração da probabilidade posterior entre os caracteres de uma matriz de covariação. A correlação entre traços pode ser acessada por meio da probabilidade posterior de covariações negativas ou positivas entre os traços.

Similarmente, o Modelo Filogenético Multivariado de Susceptibilidade Latente (MFMSL) avalia a associação de traços genotípicos e fenotípicos, controlando também para a não-independência filogenética, *i.e.* a ancestralidade comum compartilhada. Entretanto, essa inferência filogenética é recuperada através de marcadores genéticos neutros e sem assumir uma topologia de árvore *a priori*, portanto, levando em conta a incerteza filogenética. Adicionalmente, esse método permite acessar os coeficientes de correlação entre conjuntos distintos de dados, como contínuos, discretos, categóricos e binários.

Os dois métodos citados acima se assemelham à metodologia proposta por Felsenstein (2005) para acessar correlações fenotípicas através de dados contínuos corrigidos por uma inferência filogenética. Entretanto, o MFMSL permite estabelecer inferências de correlação entre traços contínuos e discretos no mesmo modelo preditivo.

Para recuperar a história evolutiva compartilhada entre as espécies foram utilizados quatro marcadores moleculares neutros: dois mitocondriais (COI *Cytochrome C oxidase 1* e CytB *Cytochrome B*) e dois nucleares (RAG2 *Recombination activating gene 2* e PLCB4 *phospholipase C beta 4*), totalizando 2780 pares de base (pb). As sequências foram obtidas do banco de dados GenBank (Benson *et al.* 2004) e alinhadas no software Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA).

Para os dados discretos foi utilizado um modelo de transição de estados sem ordenação, bem como um modelo estocástico de evolução dos caracteres sobre a árvore filogenética, seguindo o modelo de difusão browniano (Cybis *et al* 2015). Os hábitos alimentares foram recuperados através de buscas em bancos de dados de diversidade como o IUCN (<http://www.iucnredlist.org>) e o ADW (<http://animaldiversity.org>) e classificados em seis categorias alimentares: 1) Hematófago, 2) Carnívoro, 3) Onívoro (Frugívoro, Insetívoro), 4) Insetívoro, 5) Frugívoro e 6) Nectarívoro. O hábito alimentar insetívoro possui um status ancestral dentro dos filostomídeos. Dessa forma, assumiu-se tal dieta como representante neutra para o modelo comparativo empregado, a despeito de ainda não ter sido testado modelos de seleção para as variáveis de dieta que corroborem a escolha.

A construção do *script* (formato xml) de entrada para o modelo MFMSL utilizando os dados de sequências concatenadas (formato nexus) para a reconstrução filogenética, taxa Q/A e traços morfológicos (formato txt), foi feita no pacote BEAUti 1.7.3. Para os dados filogenéticos utilizou-se o modelo de substituição *Generalised Time Reversible* - GTR (Tavaré, 1986), estabelecido previamente com base nos valores de *likelihood* para todos os modelos avaliados, utilizando o software MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Para estimar as relações evolutivas foi utilizando o modelo de especiação de Yule (Drummond *et al.*, 2007) e um modelo de relógio relaxado não correlacionado lognormal. Posteriormente foi adicionado ao arquivo xml, de forma manual, a variável latente (dieta). O arquivo final foi executado no software BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.* 2012), utilizando três análises independentes, com 80 milhões de gerações de Cadeias de Markov e Monte Carlo, amostradas a cada 8.000 ciclos. A convergência foi confirmada quando os tamanhos efetivos de amostragem (ESS) atingiram pelo menos 200 para todos os parâmetros, monitorados no

programa Tracer 1.6 (Rambaut *et al.* 2014). Os valores da probabilidade posterior estatisticamente significativos para a matriz de correlação foram plotados na forma de um *heatmap*, no pacote de análises R (Warnes, Bolker *et al.* 2012). As matrizes de correlação e os intervalos de credibilidade Bayesiana (BCI) foram considerados significativos quando > 95%.

Um fluxograma das análises b e c que ilustra esquematicamente os passos conduzidos pode ser verificado na Figura 3.

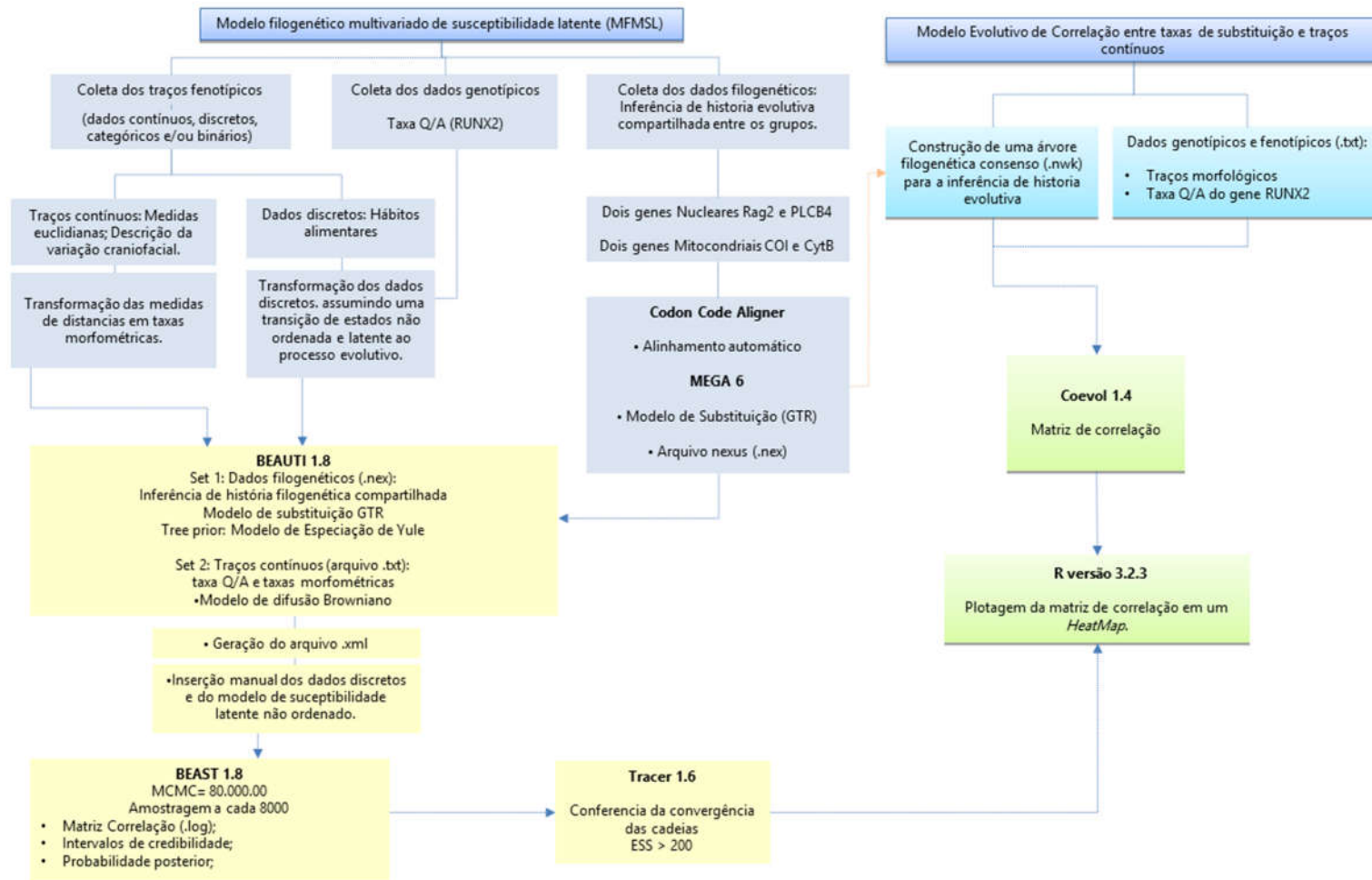


Figura 3: O fluxograma apresenta os passos de edição e processamento de dados para os modelos bayesianos filogenéticos usados para acessar as correlações entre os traços fenotípicos e genotípicos.

## IV. Resultados

---

### IV.I. Repetição *in tandem* do *RUNX2*: taxa Q/A

A amplitude de variação da taxa de repetição de aminoácidos do gene *RUNX2* foi calculada para as 31 espécies de filostomídeos. A menor taxa encontrada foi 1.13 para *Mimon crenulatum*, enquanto *Artibeus watsoni* apresentou a maior taxa: 2.33 (Tabela 2).

A variação do número de repetições de aminoácidos em sequência foi entre 17-26 para a região poliQ e entre 9-15 para a região poliA. Nesta análise foram utilizadas as regiões conservadas que flanqueiam as repetições como um critério de validação para a inclusão dos indivíduos na análise e para suporte de ortologia do gene entre as espécies de Phyllostomidae (Tabela 2).

Para avaliar a existência de uma variação intraespecífica entre as espécies utilizadas neste estudo, mais de um indivíduo de cada espécie foi sequenciado. O resultado desta análise mostrou que a taxa Q/A se mantém inalterada entre indivíduos de uma mesma espécie.



Tabela 1. Identificação dos espécimes utilizados neste estudo (ID, espécie e sexo) e sequência e extensão da porção QAdo gene *RUNX2*, e de suas regiões conservadas flanqueadoras.

ID FURB	Espécie	Sexo	Região Conservada		Repetição QA	Região Conservada 2
			1			
SLA2054	<i>Anoura caudifer</i>	F	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA3178	<i>Anoura geoffroyi</i>	F	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA4047	<i>Artibeus glaucus</i>	F	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAV	PRLRPP
SLA4062	<i>Artibeus gnomus</i>	M	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAV	PRVLPP
SLA3172	<i>Artibeus jamaicensis</i>	I.	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAA	PRLRPPPHN
SLA2236	<i>Artibeus lituratus</i>	M	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA4068	<i>Artibeus obscurus</i>	F	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAA	PRLRPPHDN
SLA4150	<i>Artibeus watsoni</i>	M	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAV	PRLRPP
SLA3808	<i>Carollia perspicillata</i>	F	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAA	PPRLPPP
SLA4039	<i>Carollia subrupha</i>	F	VVAA		HQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPP---
SLA3795	<i>Chiroderma doriae</i>	M	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAA	PPRRPPPHN
SLA3120	<i>Chiroderma villosum</i>	F	VVAA		QQ?QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPP---
SLA3356	<i>Chrotopterus auritus</i>	M	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAAAV	PRLPPPHHP
SLA2718	<i>Desmodus rotundus</i>	M	VVAA		QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAA	PRLRPP
SLA3321	<i>Diphylla ecaudata</i>	F	VVAA		QHQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEEAAAAAAAAAAAAA	PPRRPPPT

Continuação da Tabela 1.

SLA3181	<i>Glossophaga commissarisi</i>	M	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PRLRPPHDT
SLA2688	<i>Glossophaga soricina</i>	I.	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA3534	<i>Glyphonictis sylvestris</i>	F	VVAA	RQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PPRVPPH
SLA3465	<i>Lonchophylla thomasi</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PPRRPPPHN
SLA2884	<i>Lophostoma silviculum</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA2823	<i>Mimon benettii</i>	M	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEVAAAAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA4147	<i>Mimon crenulatum</i>	M	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PPRRPPPHN
SLA4049	<i>Phyllostomus elongatus</i>	M	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PRLRPPHDN
SLA3130	<i>Phyllostomus hastatus</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPPHDN
SLA3527	<i>Pygoderma bilabiatum</i>	M	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PPRRPPPHN
SLA3457	<i>Rhinophylla fisherae</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PRLRPP
SLA3039	<i>Rhinophylla pumilio</i>	M	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PRLRPPHDN
SLA2538	<i>Sturnira lilium</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAVAVAAV	PRLRPPHDN
SLA3514	<i>Sturnira tildae</i>	M	VVAA	QHQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAA	PRLRPPPHN
SLA3481	<i>Vampyrodes caraccioli</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPP---
SLA2900	<i>Vampyressa pusilla</i>	F	VVAA	QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEAAAAAAAAAAAAAAAAAAV	PRLRPP

Sexo: F (Fêmea), M (Macho) e I (indeterminado no banco de dados disponível).

Tabela 2. Espécimens examinados neste estudo, taxa Q/A, taxas morfológicas utilizadas e número de depósito Genbank.

ID FURB	Espécie	Sexo	Q	A	Q/A	MTRL/TLS	ZB/MB	MTRL/MB	M2/MB	GenBank
SLA2054	<i>Anoura caudifer</i>	F	21	14	1,50	0,38	1,07	0,97	0,56	*
SLA3178	<i>Anoura geoffroyi</i>	F	19	14	1,36	0,40	1,05	0,97	0,55	*
SLA4047	<i>Artibeus glaucus</i>	F	20	10	2,00	0,34	1,09	0,63	0,74	*
SLA4062	<i>Artibeus gnomus</i>	M	21	10	2,10	0,31	1,11	0,60	0,78	*
SLA3172	<i>Artibeus jamaicensis</i>	I	23	13	1,77	0,38	1,19	0,75	0,81	*
SLA2236	<i>Artibeus lituratus</i>	M	23	10	2,30	0,36	1,21	0,73	0,88	*
SLA4068	<i>Artibeus obscurus</i>	F	23	13	1,77	0,37	1,20	0,72	0,82	*
SLA4150	<i>Artibeus watsoni</i>	M	21	9	2,33	0,29	1,16	0,69	0,81	*
SLA3808	<i>Carollia perspicillata</i>	F	19	15	1,27	0,35	1,10	0,75	0,65	*
SLA4039	<i>Carollia subrupha</i>	F	18	14	1,29	0,35	1,05	0,74	0,63	*
SLA3795	<i>Chiroderma doriae</i>	M	26	13	2,00	0,40	1,28	0,82	0,90	*
SLA3120	<i>Chiroderma villosum</i>	F	23	12	1,92	0,41	1,30	0,86	0,94	*
SLA3356	<i>Chrotopterus auritus</i>	M	23	17	1,35	0,35	1,09	0,70	0,61	*
SLA2718	<i>Desmodus rotundus</i>	M	18	12	1,50	0,17	1,02	0,36	0,49	*
SLA3321	<i>Diphylla ecaudata</i>	F	19	13	1,46	0,23	1,07	0,44	0,54	*
SLA3181	<i>Glossophaga commissarisi</i>	M	21	15	1,40	0,37	1,02	0,87	0,55	*
SLA2688	<i>Glossophaga soricina</i>	I	20	14	1,43	0,38	1,01	0,88	0,55	*
SLA3534	<i>Glyphonictoris sylvestris</i>	F	20	15	1,33	0,41	1,07	0,84	0,66	*
SLA3465	<i>Lonchophylla thomasi</i>	F	18	15	1,20	0,35	1,04	0,87	0,56	*
SLA2884	<i>Lophostoma silviculum</i>	F	19	15	1,27	0,36	1,06	0,78	0,61	*

Continuação da Tabela 2.

SLA2823	<i>Mimon benettii</i>	M	17	13	1,31	0,37	1,14	0,80	0,70	*
SLA4147	<i>Mimon crenulatum</i>	M	17	15	1,13	0,37	0,98	0,70	0,67	*
SLA4049	<i>Phylostomus elongatus</i>	M	19	15	1,27	0,40	1,18	0,81	0,76	*
SLA3130	<i>Phylostomus hastatus</i>	F	19	14	1,36	0,36	1,11	0,75	0,65	*
SLA3527	<i>Pygoderma bilabiatum</i>	M	22	11	2,00	0,29	1,11	0,48	0,60	*
SLA3457	<i>Rhinophylla fisherae</i>	F	20	14	1,43	0,33	1,12	0,71	0,68	*
SLA3039	<i>Rhinophylla pumilio</i>	M	17	15	1,13	0,33	1,06	0,67	0,66	*
SLA2538	<i>Sturnira lilium</i>	F	20	12	1,67	0,33	1,13	0,61	0,65	*
SLA3514	<i>Sturnira tildae</i>	M	17	14	1,21	0,37	1,18	0,64	0,67	*
SLA3481	<i>Vampyrodes caraccioli</i>	F	21	13	1,62	0,39	1,36	0,84	0,98	*
SLA2900	<i>Vampyressa pusilla</i>	F	23	13	1,77	0,36	1,18	0,71	0,84	*

Sexo: F (Fêmea), M (Macho) e I (indeterminado no banco de dados disponível).

#### **IV.II. Teste de Correlação de Pearson**

Os coeficientes de correlação obtidos pelo teste de Pearson rejeitam a hipótese nula de que não há correlação entre as variáveis morfométricas e a taxa Q/A (Figura 4).

Foram observadas correlações positivas entre as taxas Q/A e a largura da maxila superior ( $\rho=0.595$ ,  $p < 0.0001$ ) e entre as taxas Q/A e a largura entre os arcos zigomáticos ( $\rho = 0.497$ ,  $p < 0.004$ ) (Tabela 4). Entretanto, não foi encontrada correlação entre a taxa Q/A e o comprimento da maxila superior.

O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para cada uma dessas correlações positivas foi de 0.354 e 0.247, respectivamente, o que demonstra que 35% da variação na amplitude de largura da maxila superior é explicada pela variação na taxa de repetição Q/A, bem como 25% da variação encontrada dos arcos do zigomático pode ser explicada pela variação na taxa Q/A. A estatística descritiva para os dados utilizando o método de correlações de Pearson está apresentadas na tabela 5, e os valores para todos os coeficientes de determinação, na tabela 6.

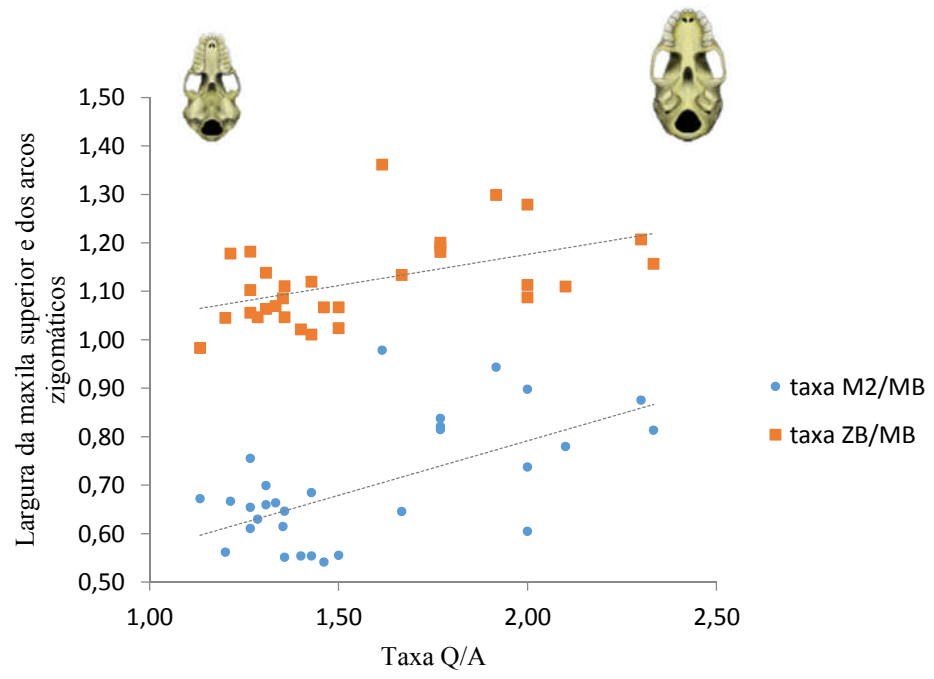


Figura 4: Correlação entre a largura da maxila superior, largura entre os arcos zigomáticos e a taxa Q/A.

Tabela 4. Matriz de correlação genótipo-fenótipo utilizando o método de Pearson. Valores abaixo da diagonal indicam associação, e acima, o valor de *P*.

Variáveis	Q/A	MTRL/TLS	ZB/MB	MTRL/MB	M2/MB
Q/A	0	0,419	0,004	0,241	0,000
MTRL/TLS	-0,151	0	0,079	< 0,0001	0,032
ZB/MB	<b>0,497</b>	0,320	0	0,472	< 0,0001
MTRL/MB	-0,217	<b>0,862</b>	0,134	0	0,378
M2/MB	<b>0,595</b>	<b>0,387</b>	<b>0,884</b>	0,164	0

*Os valores em negrito são diferentes de 0 com um nível de significância alfa=0,05.*

Tabela 5. Estatísticas descritivas com base no teste de correlação de Pearson.

Variável	Observações	Obs. com		Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
		dados	Obs. sem				
		faltantes	faltantes				
Q/A	31	0	31	1,133	2,333	1,568	0,338
MTRL/TSL	31	0	31	0,172	0,410	0,350	0,051
ZB/MB	31	0	31	0,983	1,362	1,121	0,088
MTRL/MB	31	0	31	0,363	0,972	0,732	0,139
M2/MB	31	0	31	0,492	0,979	0,694	0,128

Tabela 6. Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) com base no teste de correlação de Pearson.

Variáveis	Q/A	MTRL/TLS	ZB/MB	MTRL/MB	M2/MB
Q/A	<b>1</b>	0,023	0,247	0,047	0,354
MTRL/TLS	0,023	<b>1</b>	0,103	0,743	0,149
ZB/MB	0,247	0,103	<b>1</b>	0,018	0,781
MTRL/MB	0,047	0,743	0,018	<b>1</b>	0,027
M2/MB	0,354	0,149	0,781	0,027	<b>1</b>

### IV.III. Correlação taxa Q/A e medidas morfológicas

Através do modelo Bayesiano - CoEvol foram encontradas correlações negativas entre a taxa Q/A e as taxas MTRL/TLS (-0.557,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.3102$ ) e ZB/MB (-0.443,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.1962$ ) (Figura 5, Tabela 7 e 9).

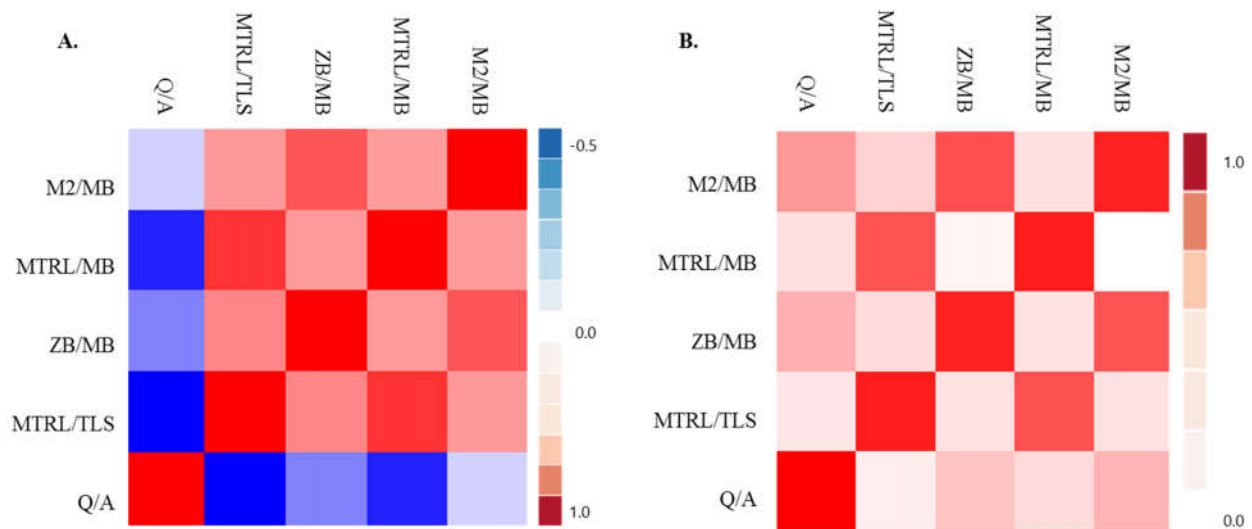


Figura 5. *Heatmap* para os coeficientes de correlação e coeficientes de determinação  $R^2$ -CoEvol: A) coeficientes de correlação estimados através do método de correlações CoEvol e B) Coeficientes de determinação ( $R^2$ ) calculados através dos dados obtidos no modelo Coevol. As cores mais escuras indicam correlações mais fortes entre os traços, azul para correlações negativas e vermelho para correlações positivas.



Tabela 7. Matriz do coeficiente de correlação estimado (CoEvol).

	Q/A	MTRL/TSL	ZB/MB	MTRL/MB	M2/MB
Q/A	1	-0,557	-0,159	-0,443	0,0867
MTRL(PAL)/TSL	-0,557	1	0,588	0,838	0,527
ZB/MB	-0,159	0,588	1	0,522	0,734
MTRL/MB	-0,443	0,838	0,522	1	0,518
M2/MB	0,0867	0,527	0,734	0,518	1

Tabela 8. Coeficientes de determinação (CoEvol ), R<sup>2</sup>.

	Q/A	MTRL/TSL	ZB/MB	MTRL/MB	M2/MB
Q/A	1	0,3102	0,0252	0,1962	0,0075
MTRL(PAL)/TSL	0,3102	1	0,3457	0,7022	0,2777
ZB/MB	0,0252	0,3457	1	0,2724	0,5387
MTRL/MB	0,1962	0,7022	0,2724	1	0,2683
M2/MB	0,0075	0,2777	0,5387	0,2683	1

Os resultados obtidos com o modelo Bayesiano-MFMSL são apresentados na forma de dois *heatmaps* (Figuras 6A e 6B), nos quais a existência de correlação entre os traços morfológicos, a taxa Q/A e os hábitos alimentares é determinada pela média da probabilidade posterior de cada relação entre traços da matriz de covariação, e esta relação pode ser positiva ou negativa. As médias dos coeficientes de correlação a *posteriori* estão apresentadas na Tabela 9; para todas as correlações estimadas, e para as correlações estatisticamente significativas ver Tabela 10.

Foi verificada uma correlação positiva e significativa entre as taxas Q/A e M2/MB, (coeficiente de correlação de 0.303; BCI=0.023, 0.545), assim como uma correlação negativa entre as taxas Q/A e MTRL/TLS (coeficiente de correlação de -0.294; BCI=-0.541, -0.011). Sob a perspectiva da influência dos hábitos alimentares sobre a evolução molecular, os resultados indicam uma correlação positiva entre traços fenotípicos e alguns hábitos alimentares, como, por exemplo, o coeficiente de correlação estimado para o grupo frugívoro e a taxa Q/A é de 0.537 (BCI= 0.079, 0.883), assim como o conjunto de espécies onívoro e a taxa Q/A é de 0.674 (BIC=0.216, 0.921). Também são encontradas correlações negativas entre o grupo hematófago e as taxas MTRL/TLS (coeficiente de correlação de -0.417; BCI= -0.75, -0.059), assim como entre os hematófagos e a taxa MTRL/MB (coeficiente de correlação de -0.506; BCI= -0.834, -0.178) (Figura 6A).

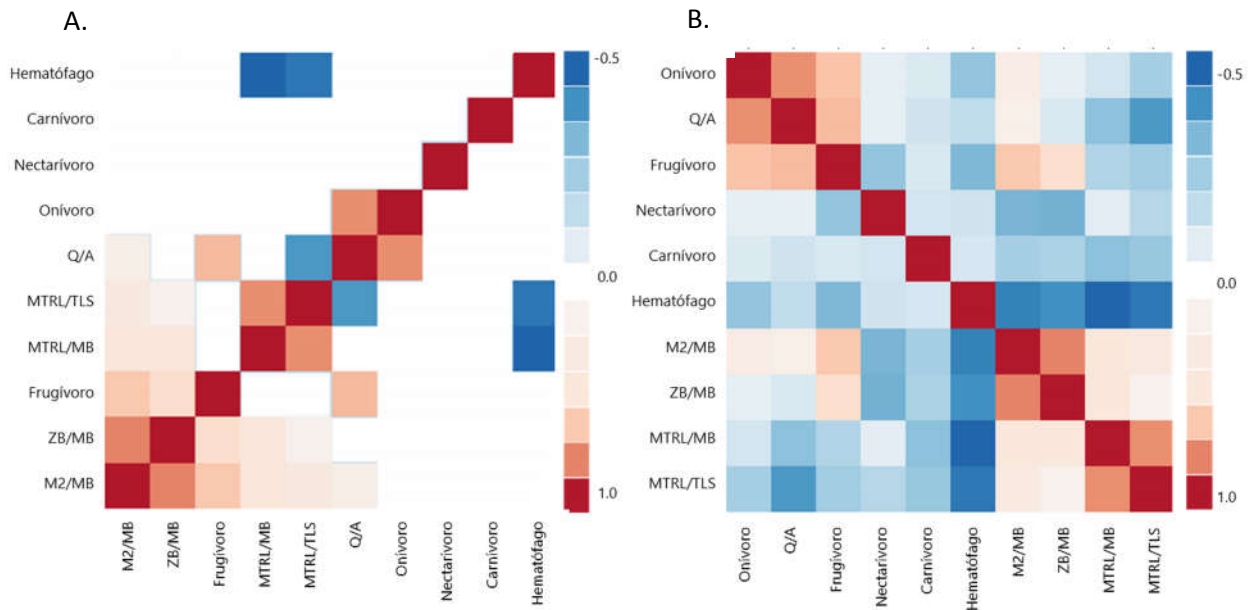


Figura 6. *Heatmap* da média posterior para correlações entre os traços morfológicos craniofaciais, a taxa Q/A e os hábitos alimentares para o MFMLL. As cores mais escuras indicam correlações mais fortes entre os traços; azul, correlações negativas e vermelho, correlações positivas. A) Todos os coeficientes de correlação estimados e (B) Somente os coeficientes de correlação significativos.

Tabela 9. Média de probabilidade posterior e índices (inferior e superior) de credibilidade bayesiana 95% (BCI) para todas as estimativas de correlações entre os traços sob o MFMSL.

	Taxa Q/A		MTRL/TLS		ZB/MB		MTRL/MB		M2/MB	
	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI
Q/A	1,000	(1, 1)	-0,294	(-0.541, -0.011)	0,110	(-0.181, 0.383)	-0,136	(-0.41, 0.156)	0,303	(0.023, 0.545)
MTRL/TLS	-0,294	(-0.541, -0.011)	1,000	(1, 1)	0,290	(0.007, 0.537)	0,674	(0.491, 0.809)	0,331	(0.051, 0.568)
ZB/MB	0,110	(-0.181, 0.383)	0,290	(0.007, 0.537)	1,000	(1, 1)	0,344	(0.069, 0.579)	0,709	(0.539, 0.831)
MTRL/MB	-0,136	(-0.41, 0.156)	0,674	(0.491, 0.809)	0,344	(0.069, 0.579)	1,000	(1, 1)	0,337	(0.057, 0.574)
M2/MB	0,303	(0.023, 0.545)	0,331	(0.051, 0.568)	0,709	(0.539, 0.831)	0,337	(0.057, 0.574)	1,000	(1, 1)
Nectarívoro	0,161	(-0.687, 0.815)	-0,015	(-0.507, 0.529)	-0,197	(-0.684, 0.372)	0,146	(-0.38, 0.697)	-0,183	(-0.735, 0.44)
Frugívoro	0,537	(0.079, 0.883)	-0,071	(-0.486, 0.333)	0,411	(0.035, 0.724)	-0,028	(-0.478, 0.391)	0,499	(0.142, 0.781)
Carnívoro	0,054	(-0.816, 0.86)	-0,112	(-0.599, 0.432)	-0,041	(-0.594, 0.538)	-0,142	(-0.659, 0.428)	-0,068	(-0.681, 0.574)
Hematófago	0,015	(-0.749, 0.798)	-0,417	(-0.75, -0.059)	-0,323	(-0.725, 0.21)	-0,506	(-0.834, -0.178)	-0,371	(-0.797, 0.233)
Onívoro	0,674	(0.216, 0.921)	-0,059	(-0.461, 0.382)	0,168	(-0.274, 0.581)	0,067	(-0.384, 0.517)	0,311	(-0.157, 0.686)

	Nectarívoro		Frugívoro		Carnívoro		Hematofago		Onívoro	
	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI
Q/A	0,161	(-0.687, 0.815)	0,537	(0.079, 0.883)	0,054	(-0.816, 0.86)	0,015	(-0.749, 0.798)	0,674	(0.216, 0.921)
MTRL/TLS	-0,015	(-0.507, 0.529)	-0,071	(-0.486, 0.333)	-0,112	(-0.599, 0.432)	-0,417	(-0.75, -0.059)	-0,059	(-0.461, 0.382)
ZB/MB	-0,197	(-0.684, 0.372)	0,411	(0.035, 0.724)	-0,041	(-0.594, 0.538)	-0,323	(-0.725, 0.21)	0,168	(-0.274, 0.581)
MTRL/MB	0,146	(-0.38, 0.697)	-0,028	(-0.478, 0.391)	-0,142	(-0.659, 0.428)	-0,506	(-0.834, -0.178)	0,067	(-0.384, 0.517)
M2/MB	-0,183	(-0.735, 0.44)	0,499	(0.142, 0.781)	-0,068	(-0.681, 0.574)	-0,371	(-0.797, 0.233)	0,311	(-0.157, 0.686)
Nectarívoro	1,000	(1, 1)	-0,121	(-0.829, 0.711)	0,075	(-0.701, 0.755)	0,054	(-0.769, 0.789)	0,162	(-0.704, 0.809)
Frugívoro	-0,121	(-0.829, 0.711)	1,000	(1, 1)	0,097	(-0.756, 0.832)	-0,163	(-0.843, 0.744)	0,507	(-0.282, 0.887)
Carnívoro	0,075	(-0.701, 0.755)	0,097	(-0.756, 0.832)	1,000	(1, 1)	0,086	(-0.73, 0.816)	0,112	(-0.758, 0.828)
Hematofago	0,054	(-0.769, 0.789)	-0,163	(-0.843, 0.744)	0,086	(-0.73, 0.816)	1,000	(1, 1)	-0,120	(-0.838, 0.729)
Onívoro	0,162	(-0.704, 0.809)	0,507	(-0.282, 0.887)	0,112	(-0.758, 0.828)	-0,120	(-0.838, 0.729)	1,000	(1, 1)

Tabela 10. Média de probabilidade posterior e Índices (inferior e superior) de credibilidade bayesiana 95% (BCI) para as estimativas de correlações entre os traços estatisticamente significativas sob o modelo de suscetibilidade latente.

	Nectarivoro		Frugivoro		Carnivoro		Hematofago		Onivoro	
	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI	Corr.	95% BCI
Q/A	0,000	(-0.687, 0.815)	<b>0,537</b>	(0.079, 0.883)	0,000	(-0.816, 0.86)	0,000	(-0.749, 0.798)	<b>0,674</b>	(0.216, 0.921)
MTRL/TLS	0,000	(-0.507, 0.529)	0,000	(-0.486, 0.333)	0,000	(-0.599, 0.432)	<b>-0,417</b>	(-0.75, -0.059)	0,000	(-0.461, 0.382)
ZB/MB	0,000	(-0.684, 0.372)	<b>0,411</b>	(0.035, 0.724)	0,000	(-0.594, 0.538)	0,000	(-0.725, 0.21)	0,000	(-0.274, 0.581)
MTRL/MB	0,000	(-0.38, 0.697)	0,000	(-0.478, 0.391)	0,000	(-0.659, 0.428)	<b>-0,506</b>	(-0.834, -0.178)	0,000	(-0.384, 0.517)
M2/MB	0,000	(-0.735, 0.44)	<b>0,499</b>	(0.142, 0.781)	0,000	(-0.681, 0.574)	0,000	(-0.797, 0.233)	0,000	(-0.157, 0.686)
Nectarivoro	1,000	(1, 1)	0,000	(-0.829, 0.711)	0,000	(-0.701, 0.755)	0,000	(-0.769, 0.789)	0,000	(-0.704, 0.809)
Frugivoro			1,000	(1, 1)	0,000	(-0.756, 0.832)	0,000	(-0.843, 0.744)	0,000	(-0.282, 0.887)
Carnivoro					1,000	(1, 1)	0,000	(-0.73, 0.816)	0,000	(-0.758, 0.828)
Hematofago							1,000	(1, 1)	0,000	(-0.838, 0.729)
Onivoro									1,000	(1, 1)

### V.I Variação na taxa Q/A e diferenciação intraespecífica

A taxa Q/A caracterizada nos filostomídeos apresentou uma baixa amplitude de variação quando comparada com o observado para outras linhagens de mamíferos. Pointer *et al.* (2012) descreveram a diversidade de taxas em diferentes espécies, representativa de cada ordem, sendo a mais alta encontrada no cavalo (*Perissodactyla*). Não é observado um padrão filogenético claro nessa variação entre mamíferos. Entretanto, dentro dos morcegos filostomídeos a taxa Q/A varia entre os grupos, em particular associada aos hábitos alimentares. Por exemplo, os morcegos frugívoros (Subfamília *Stenodermatinae*) apresentaram a maior taxa Q/A. Esse resultado permite especular sobre o significado biológico de tal variação. A origem desse grupo filogenético é associada a um aumento significativo na taxa de diversificação de espécies e também ao crânio com maior força de mordida (Dumont *et al.* 2011; 2014; Shy *et al.* 2015). A evolução da frugivoria é descrita como promotora da diversificação nos filostomídeos, proporcionando uma nova zona adaptativa. Além disso esse grupo diversificou mais recentemente, e compreende o maior número de espécies quando comparado com outras linhagens de filostomídeos. A maior variação morfológica observada nos stenodermatíneos pode ser consequência da maior taxa de repetição observada um gene de desenvolvimento (*Runx2*) levando a maior plasticidade nas rotas de formação da morfologia caniofacial, promovendo a diversificação observada.

Por outro lado, em relação a variação intraespecífica em filostomídeos os resultados indicaram que a taxa Q/A se mantém inalterada entre indivíduos de uma mesma espécie (dados não apresentados). Apesar de Fondon & Garner (2004) demonstrarem que há variação intraespecífica dentro de algumas raças de cachorros domésticos (e algumas

espécies de mamíferos placentários), e sugerir que tal variação no gene *RUNX2* poderia contribuir para o ajuste fino de ativação e repressão da transcrição do gene, tal diferença não parece influenciar distinções morfológicas sutis no caso dos filostomídeos.

A correlação positiva entre o alongamento da face e a taxa Q/A não foi observada nos testes estatísticos preliminares utilizando o método de correlação de Pearson, diferentemente do que o evidenciado por Fondon & Garner (2004) e Sears *et al.* (2007). Porém, observaram-se coeficientes de correlação significativos para a relação entre a taxa Q/A e as taxas morfométricas que representam medidas de largura da maxila superior (M2/MB) e para a largura entre os arcos zigomáticos (ZB/MB). Dessa forma, a interação dessa região regulatória do gene e sua contribuição para a manutenção e variação de largura e comprimento da maxila superior é promissora para ser explorada em estudos futuros, utilizando mais linhagens de filostomídeos, bem como outros grupos particularmente variáveis de mamíferos, de maneira a corroborar o padrão observado.

Os coeficientes de correlação entre traços fenotípicos e genotípicos obtidos através da inferência de relações entre variáveis, sem considerar uma relação intrínseca entre as mesmas, indicam uma tendência a recuperar padrões mais generalistas de interação entre as diferentes matrizes de covariação. Partindo deste princípio, os métodos de correlação discutidos a seguir permitem a correção das estimativas de correlação por uma história filogenética compartilhada, recuperando de forma mais robusta as correlações entre as variáveis analisadas.

Diversos métodos comparativos têm sido propostos para acessar as correlações fenotípicas entre diferentes conjuntos de caracteres, corrigindo a relação de independência

dos traços por uma história evolutiva compartilhada entre os *taxa* e sua influência sobre essas correlações (Felsenstein 1985; Pagel 1994; Grafen 1989; Ives & Garland 2010).

Os coeficientes de correlação obtidos foram negativos e estatisticamente significativos utilizando o método Bayesiano-CoEvol para estimar esses parâmetros. Essas correlações negativas diferem das encontradas entre o método estatístico de Pearson entre as taxas. Os resultados apresentaram suporte estatístico para correlações negativas entre a taxa Q/A e a taxa MTRL/TLS (comprimento da maxila superior) e ZB/MB (que corresponde a largura entre os arcos zigomáticos). A correlação positiva obtida pelo método estatístico de Pearson entre as taxas Q/A e M2/MB não foram significativas para o modelo Bayesiano-CoEvol, o que indica certo nível de incongruência entre as estimativas utilizadas para prever o efeito da taxa Q/A sobre a variação da maxila superior de Phyllostomidae.

No entanto, os resultados obtidos pelos dois métodos bayesianos que utilizam inferências filogenéticas apontam para a mesma direção. Através do Coevol foi recuperada uma relação negativa entre a taxa Q/A e comprimento da maxila superior e largura do zigomático, indicando que quanto maior a taxa Q/A menor a maxila superior, enquanto o MFMSL aponta para a mesma redução da maxila superior com o aumento da taxa Q/A. O MFMSL, além disso, correlaciona positivamente a taxa Q/A com os hábitos de frugivoria e onivoria, ou seja, a taxa Q/A é sempre maior em indivíduos com esses hábitos alimentares. De modo geral, os filostomídeos frugívoros e onívoros possuem a maxila superior mais curta e larga, o que corrobora a associação encontrada entre aumento da taxa Q/A e redução e alargamento dessa estrutura.

Sears *et al.* (2007) demonstram uma clara relação entre alargamento da face e taxa Q/A em caniformes, enquanto Pointer *et al.* (2012) ao estudar vários mamíferos



placentários, não encontram nenhuma relação entre Q/A e comprimento facial. A discrepância entre os dois resultados acima se deve provavelmente aos critérios utilizados pelo segundo trabalho nas análises, onde as medidas craniofaciais utilizadas não são corrigidas por tamanho, e os pontos anatômicos utilizados variam entre as espécies utilizadas devido às particularidades morfológicas de alguns *taxa* estudados.

Os resultados obtidos neste estudo e os diferentes modelos propostos indicam uma tendência contrária à encontrada por Sears *et al.* (2007). Enquanto esses autores encontram uma tendência ao aumento no comprimento da face em razão de uma taxa Q/A maior, os resultados obtidos no presente estudo, apontam para redução no comprimento e alargamento da maxila superior, que levaria a faces mais curtas e largas. Os resultados, ainda que aparentemente contraditórios, mantem a ideia principal proposta por Sears *et al.* (2007), reforçando o papel da taxa Q/A como um mecanismo genético flexível que permitiria mudar rapidamente o tempo de ossificação do crânio ao longo da evolução. Nesse sentido, achados do presente estudo levam essa premissa para um cenário mais complexo, onde a permissividade desse sistema de ajuste genético criado pela variabilidade na taxa Q/A do gene RUNX2 seja não-direcional, ou seja, não leva a um fenótipo específico. Entretanto, ao longo da história evolutiva de linhagem (espécie ou família), tenha atuado, em conjunto com outros genes, fatores externos e restrições evolutivas, como um facilitador para as mudanças morfológicas adaptativas hoje encontradas. No caso dos filostomídeos, essas mudanças parecem ter sido selecionadas pelas restrições alimentares, corroborando a associação já conhecida por estudos morfológicos entre fenótipo e hábito alimentar (Freeman 1998, Dumont *et al.* 2011, 2014, Santanna *et al.* 2012).

Estudos de integração morfológica do crânio de caniformes e filostomídeos revelam intensidades de integração muito distintas, sendo que os filostomídeos apresentam as menores intensidades de integração dos módulos do crânio entre mamíferos (Marroig G, comunicação pessoal), enquanto os caniformes apresentam uma alta intensidade de integração dos módulos craniofaciais (Marroig *et al.* 2009). Grandes magnitudes de integração do crânio são associadas com fortes restrições evolutivas o que reduziria a flexibilidade adaptativa, enquanto o contrário, ou seja, baixa magnitude de integração está associado à fraca restrição evolutiva e maior flexibilidade evolutiva (Marroig *et al.* 2009). A Uma vez que os morcegos filostomídeos apresentam evidências de modularização, isso permitiria maior independência na resposta a seleção sob diferentes estruturas craniofaciais. Por exemplo, se a força de seleção atuar para modificar uma determinada região (e.g. oral), essa tem flexibilidade para mudar sem que seja necessário alterar outra (e.g. abóbada craniana) conjuntamente. Considerando que a evolução craniofacial em mamíferos ocorra por um ajuste entre caracteres (i.e., ossos) envolvidos com comprimento e largura, essa poderiam ser reguladas por genes que não se sobrepõe (cascatas de genes que não se sobrepõem). Nesse cenário, comprimento e largura poderiam evoluir com pouca interferência entre os caracteres. Porém, para testar essa hipótese é necessário determinar padrões de covariação genética entre os caracteres. Correlações baixas entre caracteres corroboram a independência entre eles. Uma perspectiva é testar esse padrão entre as diferentes espécies de filostomídeos e avaliar se a independência evolutiva de dois ou mais caracteres seria assegurada por trajetórias de desenvolvimento igualmente independentes.

Por fim, os resultados do presente estudo parecem concordar com a visão de Alberch (1991) na conceptualização das relações do mapa genótipo-fenótipo, na qual estabelece que,

genes não especificam diretamente o desenvolvimento, e muito menos a forma do organismo, mas em vez disso são um dos vários fatores causais conjuntamente determinam o fenótipo, com eventos do desenvolvimento podendo, ambigualmente, afetar ou ser afetados pela expressão gênica.

## V. Considerações Finais

---

Os coeficientes de correlação encontrados entre as taxas Q/A e as taxas craniofaciais demonstram que o padrão de associação entre essas variáveis não segue um modelo de regressão linear simples, e também que as incongruências na representação das relações filogenéticas entre as espécies e os caracteres morfológicos analisados influenciam na forma como essas relações são recuperadas. Contudo, foi possível estabelecer em todas análises controladas filogeneticamente um padrão de associação entre o aumento da taxa Q/A e a redução e alargamento da maxila superior. Em adição, os resultados sugerem a existência de uma interação entre as pressões ambientais caracterizadas na forma de uma variável discreta (dieta) e as medidas de comprimento e largura da maxila superior. Os dados obtidos nesse trabalho estabelecem uma perspectiva para estudos futuros mais amplos sobre a contribuição do gene *RUNX2* no desenvolvimento da forma craniofacial em mamíferos, e podem ser o primeiro passo para a compreensão da importância evolutiva desse gene nos processos adaptativos atravessados por algumas espécies ao longo da sua história evolutiva.

## Referências Bibliográficas

---

- Abzhanov A, Kuo WP, Hartmann C, Grant R, Grant PR, Tabin CJ (2006) The Calmodulin pathway and the evolution of elongated beak morphology in Darwin's Finches. *Nature* 442: 563-567.
- Abzhanov A, Protas MB, Grant R, Grant PR, Tabin CJ (2004) Bmp4 and Morphological Variation of Beaks in Darwin's Finches. *Science* 305: 1462-1465
- Aguirre LF, Herrel A, van Damme R, Matthysen E (2002) Ecomorphological analysis of trophic niche partitioning in a tropical savannah bat community. *Proc Roy Soc Lond B* 269: 1271-1278.
- Aguirre LF, Herrel A, van Damme R, Matthysen E (2003) The implications of food hardness for diet in bats. *Funct Ecol* 17:201-212.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, & Wheeler DL. (2004). GenBank: update. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D23.
- Carroll SB (2003). Genetics and the making of Homo sapiens. *Nature*; 849-857.
- Cybis GB, Sinsheimer JS, Bedford T, Mather AE, Lemey P, & Suchard MA (2015). Assessing phenotypic correlation through the multivariate phylogenetic latent liability model. *The Annals of Applied Statistics*, 9(2), 969-991.
- Dávalos LM, Cirranello AL, Geisler JH, & Simmons NB (2012). Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. *Biological Reviews*, 87(4), 991-1024.

- Datzmann T, von Helversen O, Mayer F (2010) Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evol Biol* 4;10:165.
- Drummond AJ, & Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, & Rambaut A (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Dumont ER (1999) The effect of food hardness on feeding behaviour in frugivorous bats (Phyllostomidae): an experimental study. *J Zool* 248: 219-229.
- Dumont ER (2007). Feeding mechanisms in bats: variation within the constraints of flight. *Integrative and Comparative Biology*, 47(1), 137-146.
- Dumont ER., & O'neal R (2004). Food hardness and feeding behavior in Old World fruit bats (Pteropodidae). *Journal of Mammalogy*, 85(1), 8-14.
- Dumont ER., Samadevam K, Grosse I, Warsi OM, Baird B, & Davalos LM. (2014). Selection for mechanical advantage underlies multiple cranial optima in new world leaf-nosed bats. *Evolution*, 68(5), 1436-1449.
- Felsenstein J (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 1-15.1985
- Felsenstein J (2005). Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1459), 1427-1434.

- Flores MV, Tsang VWK, Hu W, Kalev-Zylinska M, Postlethwait J, Crosier P, ... & Fisher S (2004). Duplicate zebrafish *runx2* orthologues are expressed in developing skeletal elements. *Gene expression patterns*, 4(5), 573-581.
- Fondon JW, & Garner HR (2004). Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(52), 18058-18063.
- Freeman PW (1979) Specialized insectivory: Beetle-eating and moth-eating molossid bats. *J Mamm* 60:467-479.
- Freeman PW (1981) Correspondence of food habits and morphology in insectivorous bats. *J Mamm* 62: 166-173.
- Freeman PW (1984) Functional cranial analysis of large animalivorous bats (Microchiroptera). *Biol J Linn Soc* 21 :387-408.
- Freeman PW (1988). Frugivorous and animalivorous bats (Microchiroptera): dental and cranial adaptations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 33(3), 249-272.
- Freeman PW (1998) Form, function, and evolution in skulls and teeth of bats. Pp. 140-156 in: *Bat Biology and Conservation* (T. H. Kunz and P. A. Racey, eds). Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Freeman PW (2000) Macroevolution in Microchiroptera: Recoupling morphology and ecology with phylogeny. *Evol Ecol Res* 2 :317-335.
- Futuyma DJ (1986) *Evolutionary Biology*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gómez-Valdés J, Hünemeier T, Quinto-Sánchez M, Paschetta C, De Azevedo S, González MF, et al. (2013) Lack of Support for the Association between Facial Shape and

- Aggression: A Reappraisal Based on a Worldwide Population Genetics Perspective. PLoS ONE 8(1): e52317. doi:10.1371/journal.pone.0052317
- Gould S (1989) Wonderful life: The Burgess Shale and the nature of history. W.W. Norton.
- Grafen A (1989). The phylogenetic regression. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 326(1233), 119-157.
- Hansen L, Riis AK, Silahtaroglu A, Hove H, Lauridsen E, Eiberg H, & Kreiborg S (2011). RUNX2 analysis of Danish cleidocranial dysplasia families. Clinical genetics, 79(3), 254-263.
- Hoekstra HE (2006) Genetics, development and evolution of adaptive pigmentation in vertebrates. Heredity 97:222-234
- Honeycutt RL (2008) Small changes, big results: evolution of morphological discontinuity in mammals. J Biology 7-9 Junqueira LC e Carneiro J. Histologia Básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.
- Hünemeier T, Gómez-Valdés J, De Azevedo S, Quinto-Sánchez M, Passaglia L, Salzano F M, et al. 2013. FGFR1 signaling is associated with the magnitude of morphological integration in human head shape. American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council doi:10.1002/ajhb.22496.
- Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, ... & Ochi T (1999). Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. Developmental Dynamics, 214(4), 279-290.
- Ives AR, & Garland T (2010). Phylogenetic logistic regression for binary dependent variables. Systematic Biology, 59(1), 9-26.



- Komori, TH. Yagi, S Nomura, A Yamaguchi, K Sasaki, K Deguchi, Y Shimizu, RT Bronson, YH Gao, M Inada, et al. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 89:755–764.
- Lartillot N, & Poujol R (2011). A phylogenetic model for investigating correlated evolution of substitution rates and continuous phenotypic characters. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 729-744.
- Levanon D. & Groner Y. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene* 23, 4211–4219 (2004).
- Manceau M, Domingues VS, Linnen CR, Rosenblum EB, Hoekstra HE (2010) Convergence in pigmentation at multiple levels: mutations, genes and function. *Phil Trans Royal Soc* 365: 2439-2450
- Marie PJ (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 98-105.
- Martínez-Abadías N, Heuzé Y, Wang Y, Jabs EW, Aldridge K, Richtsmeier JT (2011) FGF/FGFR Signaling Coordinates Skull Development by Modulating Magnitude of Morphological Integration: Evidence from Apert Syndrome Mouse Models. *PLoS ONE* 6(10): e26425. doi:10.1371/journal.pone.0026425
- Monteiro LR e Nogueira MR (2011) Evolutionary patterns and processes in the radiation of phyllostomid bats. *BMC Evol Biol* 11:137

- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, ... & Owen MJ (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89(5), 773-779.
- Napierala D, Garcia-Rojas X, Sam K, Wakui K, Chen C, Mendoza-Londono R, ... & Lee B (2005). Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Molecular genetics and metabolism*, 86(1), 257-268.
- Nei M (2007) The new mutation theory of phenotypic evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 12235-12242.
- Nogueira MR, Peracchi AL (2003) Fig-seed predation by two species of Chiroderma: discovery of a new feeding strategy in bats. *J Mammal* 84:225-233.
- Nogueira MR, Peracchi AL, Monteiro LR (2009) Morphological correlates of bite force and diet in the skull and mandible of phyllostomid bats. *Funct Ecol* 23:715-723.
- Nogueira MR., Monteiro LR, Peracchi AL, & de Araújo AF (2005). Ecomorphological analysis of the masticatory apparatus in the seed-eating bats, genus *Chiroderma* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Zoology*, 266(04), 355-364.
- Nowak RM (1999) *Walker's Mammals of the World*. 6<sup>th</sup> ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1936p.
- Otto F, Kanegane H, & Mundlos S (2002). Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Human mutation*, 19(3), 209-216.
- Pagel M (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 255(1342), 37-45.

- Phillips CD, Butler B, Fondon JW III, Mantilla-Meluk H, Baker RJ (2013) Contrasting Evolutionary Dynamics of the Developmental Regulator PAX9, among Bats, with Evidence for a Novel Post-Transcriptional Regulatory Mechanism. *PLoS ONE* 8(2): e57649. doi:10.1371/journal.pone.0057649
- Pointer MA, Kamilar JM, Warmuth V, Chester SG, Delsuc F, Mundy NI, ... & Bradley BJ (2012). RUNX2 tandem repeats and the evolution of facial length in placental mammals. *BMC evolutionary biology*,12(1), 1.
- Popadic A, Abzhanov A, Rusch D, Kaufman TC (1998) Understanding the genetic basis of morphological evolution: The role of homeotic genes in the diversification of the arthropod bauplan. *Int J Dev Biol* 42:453-61.
- Rex K, Czaczkas BI, Michener R, Kunz TH, Voigt C (2010) Specialization and omnivory in diverse mammalian assemblages. *Ecoscience* 17:37-46.
- Santana SE, Grosse IR, & Dumont ER (2012). Dietary hardness, loading behavior, and the evolution of skull form in bats. *Evolution*, 66(8), 2587-2598.
- Santana SE, Grosse IR, & Dumont ER. (2012). Dietary hardness, loading behavior, and the evolution of skull form in bats. *Evolution*, 66(8), 2587-2598.
- Schroeder TM, ED Jensen, and JJ Westendorf (2005). Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews* 75.3 : 213.
- Sears KE., Goswami A, Flynn JJ & NiswanderLA (2007).. The correlated evolution of Runx2 tandem repeats, transcriptional activity, and facial length in carnivora. *Evol. Dev.* 9, 555–65

- Shapiro MD, Marks ME, Peichel CL, Blackman BK, Nereng KS, Jónsson B, Schluter D, Kingsley DM (2004) Genetic developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* 428: 717-720.
- Simmons NB, Voss RS (1998) The Mammals of Paracou, French Guiana a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1 Bats. *B Am Mus Nat Hist* 237:1-219.
- Swartz SM, Freeman PW, Stockwell EF (2003) Ecomorphology of bats: comparative and experimental approaches relating structural design to ecology. In *Bat Ecology*. Edited by: Kunz TH, Fenton MB. Chicago: University of Chicago Press; 580-621.
- Tavaré S (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on mathematics in the life sciences*, 17, 57-86.
- Thompson JD, Higgins DG, & Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Van Cakenberghe V, Herrel A, Aguirre LF (2002) Evolutionary relationships between cranial shape and diet in bats (Mammalia: Chiroptera). In *Topics in Functional and Ecological Vertebrate Morphology*. Edited by: Aerts P, D'aout K, Herrel A, Van Damme R. Maastricht: Shaker Publishing; 205-236.
- Velazco P, & Patterson B (2014). Two new species of yellow-shouldered bats, genus *Sturnira* Gray, 1842 (Chiroptera, Phyllostomidae) from Costa Rica, Panama and western Ecuador. *ZooKeys*, 402, 43.

- Vogel C, Chothia C (2006) Protein family expansions and biological complexity. *PLoS Comput Biol* 2:e48.
- Voss RS, Emmons LH (1996) Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. *B Am Mus Nat Hist* 230:1-115.
- Warnes GR (2012). Includes R source code and/or documentation contributed by: Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Laiw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, Schwartz M, Venables B *gplots*: Various R programming tools for plotting data. R package version,2(11), 0.
- Wetterer AL, Rockman MV, Simmons NB (2000) Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia, Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *B Am Mus Nat Hist* 248:1-200.
- Wilson DE & Reeder MD (2005) *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press, 2,142 pp.
- Wray GA (2006) Evolution: spot on (and off). *Nature* 440: 1001-2.
- Ziros PG, Basdra EK, Papavassiliou AG. 2008. Runx2: Of bone and stretch. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1659–1663.

