INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DIETA DO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* (MAMMALIA: CHIROPTERA) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

PAULO ESTEFANO DINELI BOBROWIEC

Manaus, Amazonas

Novembro, 2007

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA DIETA DO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* (MAMMALIA: CHIROPTERA) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

PAULO ESTEFANO DINELI BOBROWIEC

Orientador: Dr. Rogério Gribel

Co-orientadora: Dra. Maristerra Rodrigues Lemes

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética.

Manaus, Amazonas

Novembro, 2007

B663 Bobrowiec, Paulo Estefano Dineli
Caracterização molecular da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Mammalia: Chiroptera) na Amazônia brasileira / Paulo Estefano Dineli Bobrowiec.--- Manaus : [s.n.], 2008.
xv, 106 f. : il. (algumas color.)

Tese (doutorado) --- INPA/UFAM, Manaus, 2008
Orientador : Rogério Gribel
Co-orientador : Maristerra Rodrigues Lemes
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Morcego hematófago – Genética. 2. *Desmodus rotundus*. 3. Estratégia de forrageio. 5. PCR-RFLP. I. Título.

CDD 19. ed. 599.40415

Sinopse:

Foi desenvolvido um método molecular, com base na técnica de PCR-RFLP, para identificar as cinco espécies de presas mais atacadas pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* na Amazônia brasileira (galinha, boi, porco, humano e cachorro), a partir de análises do DNA extraído das fezes do morcego. Com o desenvolvimento desta técnica estudou-se a dieta dos morcegos hematófagos em condições naturais de campo, com capturas realizadas em comunidades rurais ribeirinhas localizadas na Amazônia brasileira. Os resultados indicaram que *D. rotundus* consome principalmente galinhas e porcos nos locais amostrados.

Palavras chave:

Morcego hematófago, PCR-RFLP, gene citocromo b, enzimas de restrição, estratégia de forrageio, lago Ayapuá, rio Madeira, comunidades rurais, Amazônia

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Antonio Bobrowiec e Maria Aparecida Mecedo Dineli Bobrowiec, pelo apoio e carinho dados durante todo o período da realização desta tese.

Ao Dr. Rogério Gribel e Dra. Maristerra Lemes pela orientação, apoio e convivência durante todos esses anos que vivi em Manaus.

Sou grato a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudo concedidas. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-graduações em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV) pela infraestrutura e apoio logístico que tornaram possível a concretização desta tese. Ao Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen) do INPA pelo apoio dado as análises genéticas.

Este estudo recebeu apoio financeiro e logístico do Instituto Piagaçu e da Wildlife Conservation Society para as coletas de campo na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçu-Purus. O apoio às coletas de campo nos rios Madeira e Aripuanã foi consedido pelo Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (PROBIO), Global Environment Facility (GEF), Banco Mundial (BIRD), CNPq, Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento - Projeto BRA/00/21 e Ministério do Meio Ambiente (MMA). Sou grato a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) do município de Novo Aripuanã pelo auxilio nas excursões de campo do PROBIO.

Agradeço à Fundação de Hematologia e Hematoterapia do Amazonas (HEMOAM) pela doação do sangue humano usado na alimentação dos morcegos em cativeiro, em particular a Dra. Kátia Torres e Kleber Brasil que sempre estiveram a disposição quando precisei. À Marco Antonio de Freitas Mendonça, gerente da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, por permitir a captura dos morcegos utilizados nos experimentos de cativeiro e à Anselmo D'Affonseca por disponibilizar o viveiro dos morcegos. Agradeço aos amigos do Instituto Piagaçu em particular a Dra. Claudia Pereira de Deus, Renato da Silveira e Paulo Piagaçu pela confiaça e parceria no estudo com os morcegos na RDS Piagaçu-Purus.

A todos aqueles que passaram pela casa do Tiradentes: Luciana, Karl, Ciro, Trupico, Milton, Óleo, Wilde, Tatiana, Luciano e Geise. Karl valeu pelos desenhos que ilustram a tese!

Também não posso deixar de agradecer as pessoas que gentilmente me auxiliaram em campo: Fabio “Trupico” Rohë, Ângela Midore, Thaise Emilio, Tatiana Menucucci, Brian Sedio, Wanderval “Poraquê” Melo de Sousa, Paulo Piagaçu, Ana Pavan e a galera das excursões do PROBIO rio Madeira. A cooperação dos moradores e líderes das comunidades dos rios Madeira e Aripuanã e das comunidades do lago Ayapuá da RDS Piagaçu-Purus. À turma do LabGen aquele abraço: Mahatma, Thieme, Grabiela, Izabela, Joicy, Rafael Angrizani, Rafael Arruda, Carolina, Raquel, Alessandra e Vanessa. Agradeço à Viviane Deslandes pelas correções e ao apoio dado no final desta tese e nesta etapa da minha vida.

RESUMO

Métodos tradicionais de identificação de itens da dieta de vertebrados, por meio da análise visual das fezes, não são eficientes em estudos sobre a ecologia alimentar de morcegos hematófagos, devido ao fato da ingestão de sangue produzir fezes constituídas somente por partes moles. Assim, a utilização de métodos moleculares com base no isolamento e amplificação do DNA oriundo de amostras fecais constitui uma importante ferramenta para o conhecimento da dieta de animais predadores como os morcegos hematófagos. No presente estudo foi desenvolvido um método molecular com base na técnica PCR-RFLP, a partir da análise do DNA isolado de fezes do morcego hematófago *Desmodus rotundus*, o qual mostrou-se eficaz na identificação das cinco espécies de presas (galinha, boi, porco, humano e cachorro) mais atacadas por este morcego em comunidades ribeirinhas rurais na Amazônia brasileira. Um experimento foi conduzido com indivíduos de *D. rotundus* mantidos em cativeiro para a coleta de amostras fecais, após alimentação dos mesmos com sangue das cinco espécies de presas analisadas. O DNA genômico total foi extraído com sucesso das amostras fecais coletas, bem como de amostras de sangue das presas, as quais serviram como controle no experimento. Foram utilizados *primers* universais para amplificar, via PCR, uma região do gene citocromo b (380 pb) a partir do DNA isolado das fezes dos morcegos e do sangue das presas. Em seguida os produtos da PCR foram clivados utilizando cinco enzimas de restrição (*Hae* III, *Rsa* I, *Taq* I, *Bmg* BI, *Xho* I) selecionadas de modo a gerar fragmentos distintos ao nível de espécie. Os padrões de restrição observados após a clivagem apresentaram total similaridade entre os tratamentos que utilizaram amostras de sangue e de fezes. A análise PCR-RFLP possibilitou diferenciar de forma inequívoca, as cinco espécies de presas utilizadas por *D. rotundus* na Amazônia brasileira. Este estudo é pioneiro no desenvolvimento de um método para identificação precisa de espécies de presas utilizadas na dieta de morcegos hematófagos. A partir do desenvolvimento deste método molecular foi analisada a frequência de consumo de cada uma destas presas por morcegos hematófagos em condições de campo. Foram amostradas 18 comunidades ribeirinhas dos rios Madeira e Aripuanã e do lago Ayapuá, no rio Purus, onde os morcegos foram capturados e suas amostras fecais coletadas. Um total de 157 indivíduos de *D. rotundus* e seis de *Diaemus youngi* foram capturados, dos quais 88 amostras fecais foram coletadas e analisadas por PCR-RFLP conforme previamente descrito. Os produtos de amplificação não identificados pela técnica PCR-RFLP foram sequenciados e comparados com o banco de dados de vertebrados

do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST, para determinação da espécie. Das 88 amostras coletadas, 58 (66%) amplificaram com sucesso a região do gene citocromo b contendo aproximadamente 380 pb. Foi possível identificar quatro espécies de presas (galinha, porco, boi e cachorro) a partir de 48 amostras fecais (55%) analisadas. Galinhas foi a presa mais consumida por *D. rotundus* (61%), seguida por porco (32%), boi (5%) e cachorro (2%). Nenhuma das análises moleculares das amostras fecais apresentou perfis de restrição diferentes dos observados para as presas estudadas, indicando que os morcegos hematófagos estudados não se alimentaram de mamíferos e/ou aves selvagens nas proximidades das comunidades. A análise PCR-RFLP de amostras fecais de *D. youngi* indicou o consumo de sangue de galinha e porco. Este foi o primeiro registro em condições naturais de um mamífero atacado por *D. youngi*. Apesar do registro de pessoas atacadas por *D. rotundus* em duas comunidades estudadas, as análises moleculares das fezes de *D. rotundus* não evidenciaram a presença de DNA humano. Os resultados descritos aqui mostraram que a técnica de PCR-RFLP é uma ferramenta útil no estudo da dieta de morcegos hematófagos que forrageiam em áreas de comunidades humanas na Amazônia brasileira. Estudos futuros sobre a incidência de ataques de *D. rotundus* a pessoas em comunidades rurais na Amazônia brasileira são também importantes para embasar programas de controle da população de morcegos hematófagos.

ABSTRACT

Traditional methods based on the identification of vertebrate´s diet by direct analysis of feces are efficient for studies of feeding ecology but this approach fails for vampire bats. The use of molecular methods based on the isolation and amplification of DNA by PCR from feces has become an important tool for the knowledge of the diet of vertebrate predators such us vampire bats. In the present study a molecular method based on PCR-RFLP and analysis of DNA isolated from feces of *Desmodus rotundus* was developed for the identification of five prey species (chicken, cattle, pork, human and dog) most commonly attacked by this bat species in Brazilian Amazon communities. An experiment was carried out using individuals of *D. rotundus* kept on captivity in order to collect feces samples of the bats artificially fed with blood of each prey species. Total genomic DNA was successfully extracted from collected feces as well as from the prey species blood. Universal molecular primers were used for PCR amplification of a mitochondrial *cytocrome b* gene region (380 bp) using DNA isolated from bat´s feces and prey´s blood. For the RFLP analysis PCR fragments were digested using five restriction enzymes (*Hae* III, *Rsa* I, *Taq* I, *Bmg* BI, *Xho* I) selected for discrimination among species. The restricted patterns found were similar between the two treatments (feces and blood). The PCR-RFLP analysis allowed the correct differentiation of the five species of prey used by *D. rotundus* in the Brazilian Amazon rural communities. This study is pioneer by proposing and developing a method for the precise identification of the prey species used by the vampire bat *D. rotundus*. Using the method developed here we investigated also the feeding habits of vampire bats in field conditions which allow the precise identification of the prey species of the bats were using for feeding in the Brazilian Amazon rural communities. Eighteen human settlements located in Madeira and Aripuana rivers and in Ayapuá lake, Purus river, were sampled. In these places bats were captured and feces samples were collected. A total of 157 individuals of *D. rotundus* and six of *Diaemus youngi* were captured and 88 samples of feces were collected and analysed using PCR-RFLP as described previously. The amplified products not identified by the PCR-RFLP technique were sequenced and compared to Genebank dataset using BLAST. For 58 out of 88 samples we successfully amplified the *cyt-b* gene region (~380 bp). We were able to unambiguously identify four species of prey (chicken, pork, cattle, and dog) by the analysis of 48 samples (55%) of *D. rotundus* feces collected in field. The analysis showed that chicken was the most commonly prey consumed by *D. rotundus* followed by pork (32%), cattle (5%), and dog

(2%). The PCR-RFLP analyses of fecal DNA haven´t showed any different restriction patterns from the expected for the prey species analysed here indicating that the vampire bats haven´t consumed blood of wild mammals or avian species around the communities. Also PCR-RFLP analysis of feces samples of *D. youngi* indicated the ingestion of chicken and pork blood by this species. That is the first record of a mammal species attacked by *D. youngi* in field. Despite the records of people attacked by *D. rotundus* in the study communities the molecular analyses carried out here haven´t indicated presence of human DNA in the feces of the bats. The results presented showed that the method developed using PCR-RFLP technique is an useful tool for analysis of the vampire bat diet in the Brazilian Amazon countryside. Future studies about frequency of *D. rotundus* attacks to people in countryside communities are also suggested to support programs aiming to control the populations of the vampire bats in the region.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... iv
RESUMO..... vi
ABSTRACT..... viii
LISTA DE FIGURAS..... xii
LISTA DE TABELAS..... xv

INTRODUÇÃO GERAL..... 1
Métodos empregados na investigação das interações presa-predador..... 1
Uso de técnicas baseadas em DNA e métodos não invasivos em estudos das interações presa-predador..... 4
Considerações taxonômicas e distribuição dos morcegos hematófagos..... 13
Comportamento alimentar dos morcegos hematófagos..... 15
Impacto econômico do ataque de morcegos hematófagos..... 16
Seres humanos como fonte de alimento..... 18

OBJETIVOS..... 22

CAPÍTULO 1..... 23
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRESAS ATACADAS PELO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)

Introdução..... 25
Material e Métodos..... 28
Captura e manutenção dos morcegos hematófagos em cativeiro..... 28
Coleta das amostras fecais..... 30
Extração de DNA..... 30
Amplificação do DNA..... 31
Sequenciamento do DNA do sangue das presas e das fezes dos morcegos..... 32
Análise PCR-RFLP – Identificação prévia dos sítios de clivagem e escolha das enzimas de restrição..... 33
Análise PCR-RFLP – Protocolo..... 33
Resultados..... 35
Extração e amplificação do DNA..... 35
Análise dos fragmentos amplificados – Sequenciamento do DNA..... 35
Análise PCR-RFLP a partir do DNA obtido de amostras de sangue..... 35
Análise por PCR-RFLP a partir do DNA obtido de fezes dos morcegos..... 38
Discussão..... 40

CAPÍTULO 2..... 58
CARACTERIZAÇÃO DA DIETA DO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* NA AMAZÔNIA BRASILEIRA USANDO A TÉCNICA MOLECULAR PCR-RFLP

Introdução..... 60
Material e Métodos..... 63
Áreas de estudo..... 63
Captura dos morcegos..... 63
Coleta das amostras fecais e análises genéticas..... 64
Análise dos dados..... 66
Resultados..... 68
Presas disponíveis nas comunidades ribeirinhas..... 68
Análises moleculares da dieta dos morcegos hematófagos..... 69
Movimento dos morcegos entre comunidades ribeirinhas do lago Ayapuá..... 70

Seleção de presas por *Desmodus rotundus*..... 71
Discussão..... 72
Técnicas para determinação de dieta em morcegos hematófagos..... 72
Ecologia da alimentação de *Desmodus rotundus*..... 73
Dieta de *Diaemus youngi*..... 77
Seres humanos como fonte de alimento para *Desmodus rotundus*..... 78

CONCLUSÕES..... 88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 91

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Exemplo de amostra fecal recém coletada do morcego hematófago *Desmodus rotundus* em condições naturais..... 13
Figura 2. Indivíduo de *Desmodus rotundus* macho capturado ao se alimentar de porcos na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, localizada a 30 km de Manaus..... 14
Figura 3. Distribuição das três espécies de morcegos hematófagos pela América Latina. Mapa reproduzido de Patterson *et al.,* 2005..... 15
Figura 4. Número de casos registrados de raiva humana no Brasil entre 1986 e 2006. a) número total de casos transmitidos; b) número total de casos transmitidos pelos três principais animais vetores; c) distribuição dos casos de raiva humana nas cinco regiões brasileiras. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (2007)..... 20

CAPÍTULO 1.
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRESAS ATACADAS PELO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)

Figura 1. Local de captura dos morcegos na Fazenda Experimental da UFAM. a) rede de neblina armada entre as cocheiras dos porcos; b) morcego *Desmodus rotundus* capturado quando se aproximava para atacar os porcos..... 48
Figura 2. Viveiro e gaiolas usadas pelos morcegos em cativeiro. a) vista exterior do viveiro no Bosque da Ciência no campus do INPA; b) gaiolas usadas pelos morcegos dentro do viveiro; c) caixa de madeira usada como dormitório dos morcegos; d) vista do morcego (fêmea adulta) dentro do dormitório..... 48
Figura 3. Cativeiro dos morcegos. a) galinhas colocadas dentro das gaiolas para os morcegos se alimentarem. Os animais eram retirados das gaiolas pela manhã e o local limpo. Cada galinha era usada no máximo por duas noites consecutivas; b) bebedouros contendo sangue oferecido aos morcegos; c) coletor de fezes colocado abaixo do dormitório dos morcegos; d) macho de *D. rotundus* alimentando-se de sangue de boi oferecido em bebedouro..... 49
Figura 4. Gel de quantificação do DNA extraído das amostras de sangue e fezes. a) DNA do sangue das cinco espécies de presas testadas; b) DNA das amostras fecais de *D. rotundus* alimentado com sangue das presas. Colunas 1-3: marcador fago Lambda 25, 50, 10 ng; Coluna 4-6: galinha; Coluna 7-8: boi; Coluna 9-11: porco; Coluna 12-15: humano; Coluna 16-18: cachorro..... 50
Figura 5. Fragmento do gene c*yt-b* (~380 pb) amplificado a partir de DNA obtido de amostras de sangue de cinco espécies de presas e do morcego hematófago *D. rotundus*. Colunas 1-2: galinha; Colunas 3-4: boi; Colunas 5-6: porco; Colunas 7-8: humano; Colunas 9-10: cachorro; Colunas 11-12: *D. rotundus*..... 51
Figura 6. Fluxograma mostrando a sequência de etapas das enzimas de restrição selecionadas durante o desenvolvimento do método molecular para a diferenciação das cinco espécies de presas preferencialmente atacadas pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* na Amazônia brasileira, bem como para a identificação do próprio morcego..... 52
Figura 7. Perfis de restrição obtidos após a clivagem de produtos amplificados do gene *cyt-b* (~380 pb) com a enzima *Hae* III, para cinco espécies de presas de *D. rotundus*. Cada painel mostra o padrão de clivagem do DNA obtido do sangue de seis amostras/presa..... 53

Figura 8. Comparação dos perfis de restrição obtidos após a clivagem de fragmento amplificado do gene *cyt-b* com cinco enzimas de restrição (*Hae* III, *Rsa* I, *Bmg* BI, *Xho* I e *Taq* I) de amostras de sangue visando diferenciar as espécies de presas de *D. rotundus*. Colunas 1-2: galinha; Colunas 3-4: boi; Colunas 5-6: porco; Colunas 7-8: humano; Colunas 9-10: cachorro; Colunas 11-12: *D. rotundus*. M: marcador de 50 pb..... 54

Figura 9. Padrões de clivagem do DNA pelas enzimas *Rsa* I, *Bmg* BI, *Taq* I e *Xho* I para seis amostras obtidas de sangue de cinco espécies de presas de *D. rotundus*. M: marcador de 50 pb..... 55

Figura 10. Fragmento amplificado do gene *cyt-b* (~380 pb) a partir de DNA extraído de amostras de fezes de *D. rotundus*, previamente alimentado com sangue de cinco espécies de presas. Colunas 1-4: galinha; Colunas 5-8: boi; Colunas 9-12: porco; Colunas 13-16: humano; Colunas 17-20: cachorro..... 55

Figura 11. Perfis de restrição obtidos após clivagem de fragmento amplificado de gene *cyt-b* pela enzima *Hae* III, a partir de DNA obtido das fezes de *D. rotundus* (colunas 1-10) e de amostras do sangue das presas (colunas 11-12). M: marcador ladder 50 pb..... 56

Figura 12. Perfis de restrição obtidos após clivagem de fragmento amplificado de gene *cyt-b* pelas enzimas *Rsa* I, *Bmg* BI, *Taq* I e *Xho* I, a partir de DNA obtido das fezes de *D. rotundus* (colunas 1-10) e de amostras do sangue das presas (colunas 11-12). M: marcador ladder 50 pb..... 57

CAPÍTULO 2.
CARACTERIZAÇÃO DA DIETA DO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* NA AMAZÔNIA BRASILEIRA USANDO A TÉCNICA MOLECULAR PCR-RFLP

Figura 1. Mapa das áreas de estudo nos rios Madeira, Aripuanã e lago Ayapuá, no rio Purus localizados na Amazônia Central. Os quadrados em preto representam os locais de captura dos morcegos hematófagos e os números correspondem as comunidades ribeirinhas amostradas. Para detalhes dos nomes das comunidades ver a Tabela 1..... 83

Figura 2. Comunidades ribeirinhas amostradas no Estado do Amazonas entre 2005 e 2007 e redes de neblina posicionadas em frente aos abrigos das presas dos morcegos hematófagos. a) comunidade São Miguel no rio Aripuanã; b) comunidade Bacuri no lago Ayapuá; c) rede de neblina armada em frente a uma pocilga da comunidade Caviana no lago Ayapuá; d) rede de neblina armada em frente a um galinheiro na comunidade Santa Rita no rio Madeira..... 84

Figura 3. Animais de criação e domésticos recém atacados por *D. rotundus*. a-b) cachorros com sinal de sangramento nas costas provocado pelo ataque do morcego *D. rotundus* enquanto estas presas dormiam na comunidade Bacuri, lago Ayapuá; c) porco sangrando no focinho provocado pelo ataque de *D. rotundus*, enquanto dormiam em uma pocilga localizada sob o assoalho de uma casa da comunidade Itapinima, rio Madeira; d) filhote de porco mordido na orelha e pata dianteira direita por *D. rotundus* na comunidade Caviana, lago Ayapuá..... 85

Figura 4. Morcegos *Diaemus youngi* e *Desmodus rotundus* alimentando-se de animais de criação e fezes encontradas sob um abrigo noturno. a) *Diaemus youngi* ao atacar uma galinha empoleirada em uma árvore de jambo na comunidade Pinheiros, lago Ayapuá; b) *Desmodus rotundus* dentro de um galinheiro na comunidade Santa Rita, rio Madeira. Note os poleiros das galinhas manchados de sangue devido aos ferimentos provocados pelas mordidas dos morcegos hematófagos; c) indivíduo de *D. rotundus* dentro de uma pocilga enquanto se alimentava na comunidade Caviana, lago Ayapuá; d) fezes de *D. rotundus* encontradas no assoalho de uma casa usada como abrigo noturno, localizada ao lado de um cercado com bois na comunidade Cachoeirinha, rio Madeira..... 86

Figura 5. Padrões de restrição gerados pela análise PCR-RFLP a partir de amostras de fezes dos morcegos capturados nas comunidades ribeirinhas. Em cada mini-gel, as duas últimas colunas mostram produtos amplificados e clivados a partir do DNA do sangue da presa e as demais colunas correspondem a amostras de fezes..... 87

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRESAS ATACADAS PELO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)

Tabela 1. Sítios de clivagem das enzimas de restrição utilizadas e estimativas dos tamanhos esperados dos fragmentos a partir da clivagem de produto de PCR do gene *cyt-b* (~360 pb) obtidas do GenBank, de diferentes espécies de presas e de *D. rotundus*, com base no programa NEB Cutter v.2.0..... 45
Tabela 2. Espécies de mamíferos silvestres que são presas potenciais de *D. rotundus* na Amazônia brasileira e identificação dos sítios de clivagem das cinco enzimas selecionadas, com base na análise de sequências da região do gene *cyt-b* depositadas no GenBank..... 46
Tabela 3. Espécies de aves silvestres que são presas potenciais de *D. rotundus* na Amazônia brasileira e identificação dos sítios de clivagem das cinco enzimas usadas, com base na análise de sequências da região do gene *cyt-b* depositadas no GenBank..... 47

CAPÍTULO 2.
CARACTERIZAÇÃO DA DIETA DO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* NA AMAZÔNIA BRASILEIRA USANDO A TÉCNICA MOLECULAR PCR-RFLP

Tabela 1. Lista das comunidades ribeirinhas amostradas, quantificação do número de moradias, galinheiros, porcos, bois e cachorros estimado de cada comunidade e o número de capturas de *Desmodus rotundus* e *Diaemus youngi*. O número ao lado do nome de cada comunidade representa sua posição no mapa da Figura 1. nd = não determinado..... 81
Tabela 2. Dados de captura dos morcegos hematófagos, número de amostras fecais coletadas, amplificações positivas e número de presas identificadas nas comunidades ribeirinhas amostradas dos rios Madeira, Aripuanã e no lago Ayapuá. Entre parênteses indica a número de amostras de *Diaemus youngi* analisadas..... 82
Tabela 3. Espécies de presas identificadas pelo método de PCR-RFLP usando o DNA das fezes dos morcegos hematófagos capturados nas comunidades ribeirinhas dos rios Madeira, Aripuanã e lago Ayapuá (porcentagem entre parênteses)..... 82

– INTRODUÇÃO GERAL –

Métodos empregados na investigação das interações presa-predador

As diversas interações que fazem parte da cadeia alimentar podem ser caracterizadas como relações tróficas entre os organismos que compõem um ecossistema. A princípio, estas relações envolvem níveis básicos de obtenção de energia do sol pelos produtores e a transferência dessa energia para os consumidores de várias ordens. A relação trófica entre organismos, representada pelas interações entre presa-predador é investigada há vários anos em estudos que buscam determinar o hábito alimentar das espécies e as consequências dessas interações para o ecossistema (Sheppard & Harwood, 2005).

Em diversas situações, a observação e quantificação das interações entre presa-predador podem ser difíceis de determinar em campo por meio de observação direta, especialmente quando envolvem espécies crípticas e/ou com alta mobilidade (Mukabana *et al.*, 2002a; Symondson, 2002). Amostras fecais coletadas em campo têm sido muito usadas em estudos com mamíferos para o conhecimento das presas das quais se alimentam. Tal abordagem metodológica apresenta a vantagem de não interferir nos comportamentos da presa e do predador, uma vez que não possui contato direto com eles. Entretanto, é difícil obter dados seguros e completos da composição da dieta para a maioria das espécies. Restos de presas podem ser visualmente identificados no estômago, nas fezes e em regurgitados dos predadores, mas muitas vezes o conteúdo pode ser digerido e desta forma não reconhecido visualmente. Muitas espécies de predadores ingerem alimentos líquidos como no caso de alguns insetívoros, de nectarívoros e de sanguinívoros. Presas com partes duras podem ser superestimadas nas fezes, enquanto presas com partes moles podem até não ser representadas. Em outras situações, a coleta de amostras necessita da captura do indivíduo, o que inviabiliza os estudos com espécies de animais ameaçadas (Kohn & Wayne, 1997).

Particularmente, a determinação da dieta em morcegos emprega métodos tradicionais que envolvem a quantificação de itens não digeridos como sementes e pedaços de insetos, encontrados nas fezes de morcegos capturados em redes de neblina ou coleta dos restos sob o abrigo diurno (Thomas, 1988; Whitaker, 1988). Estes métodos são amplamente usados, mas análises detalhadas e completas são dificultadas por problemas associados à identificação dos itens consumidos. Algumas fezes de morcegos frugívoros não possuem sementes,

permanecendo somente a polpa dos frutos. A identificação deste material pode ser feita somente quando as amostras ainda estão frescas (Thomas, 1988). Em morcegos insetívoros, as presas são muito mastigadas e a quantificação de insetos com exoesqueleto mais duro pode ser superestimada (Whitaker, 1988; Kalka & Kalko, 2006). Além disso, presas que não possuem exoesqueleto, como lagartas, são dificilmente amostradas. Tais métodos são limitados e para entendermos a ecologia de forrageamento de morcegos são necessárias técnicas que permitam uma análise mais detalhada da dieta.

O uso de isótopos estáveis, ácidos graxos, marcadores moleculares e análises por anticorpos monoclonais constituem métodos alternativos na determinação da dieta, tanto em invertebrados quanto em vertebrados (Symondson, 2002; Sheppard & Harwood, 2005; Fenolio *et al.*, 2006; Haubert *et al.*, 2006; Stowasser *et al.*, 2006; Gariepy *et al.*, 2007). Em insetos hematófagos, métodos imunológicos têm sido utilizados em estudos sobre a composição da dieta (Boreham, 1975; Gomes *et al.,* 2001; Gomes *et al.,* 2003). Um desses métodos, a reação por precipitina, foi utilizada em estudo sobre a determinação da dieta dos morcegos vampiros *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) e *Diaemus youngi* (Jentink, 1893) (Greehall, 1970). Esse método baseia-se em uma análise quantitativa da interação antígeno-anticorpo, tornando-se necessária a construção de um painel de anti-soros específicos para as presas avaliadas (Bull & King, 1923; Tempelis & Lofy, 1963). Entretanto, sua principal limitação é o alto custo e o tempo consumido para o desenvolvimento dos anticorpos, além desses serem pouco úteis na análise da dieta de predadores generalistas que se alimentam de múltiplas espécies de presas (Symondson, 2002). O imunoensaio mais frequentemente usado é o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que possui grande sensibilidade em se ligar a enzimas e assim indicar a presença de um antígeno específico (Symondson, 2002; Greenstone, 2006). Isto permite obter dados precisos do conteúdo estomacal de predadores. Contudo, várias condições prévias são necessárias para sua aplicação em campo como determinar os limites de detecção da técnica, os fatores que deterioram as taxas de antígeno, evitar efeito de reação cruzada em espécies próximas e os potenciais erros em detectar predação secundária (Sheppard & Haewood, 2005). Por isso, poucos estudos saem do laboratório para avaliar eventos de predação em condições naturais e a maioria tem focado as interações presa-predador que invovem invertebrados terrestres (Sheppard & Haewood, 2005).

Além dos testes imunológicos, somente isótopos estáveis têm sido usados na determinação da dieta de morcegos (Fleming, 1995; Herrera *et al.,* 2001a, 2001b, 2002; Voigt & Kelm, 2006). Este método é baseado na diferença isotópica entre diferentes grupos de itens

alimentares consumidos (planta vs. inseto; graminia vs. arbusto) (Hobson, 1999; Herrera *et al.,* 2002; Voigt & Kelm, 2006). Muitas vezes, plantas e insetos são consumidos na mesma proporção, mas não necessariamente possuem importância nutricional semelhante. A vantagem dos isótopos estáveis é que eles revelam a importância nutricional de cada alimento ingerido, pois seus resultados representam o que o animal assimila do alimento e não somente o que ele ingere. Por exemplo, em cinco espécies de morcegos frugívoros, análises por isótopos estáveis indicaram que a maior parte da proteína assimilada durante o ano provem de frutos, embora exista uma tendência de aumentar a contribuição de insetos no final da estação chuvosa e início da seca (Herrera *et al.,* 2002). Este método é relativamente recente em estudos de hábitos alimentares de morcegos da região Neotropical e em geral é utilizado para comparar a contribuição de frutos e insetos na nutrição e na mudança sazonal da dieta de morcegos frugívoros. Isótopos estáveis já foram empregados para estudar a dieta dos morcegos frugívoros *Artibeus jamaicensis* Leach, 1821, *Sturnira lilium* (Geoffroy, 1810), *Carollia brevicauda* (Schinz, 1821), *Uroderma bilobatum* Peters, 1866, *Dermanura phaeotis* (Miller, 1902), dos nectarívoros *Leptonycteris curasoae* Miller, 1900 e *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766) e dos insetívoros *Pteronotus parnnelli* (Gray, 1843) e *Antrozous pallidus* (Le Conte, 1856) (Fleming *et al.,* 1993; Herrera *et al.,* 1993; 2001a, 2001b, 2002). Em geral, os resultados destes estudos mostram que frutos constituem o principal recurso protéico durante o ano tanto para morcegos frugívoros quanto nectarívoros. No morcego insetívoro *Antrozous pallidus* (Vespertilionidae), uma quantidade substancial de carbono é obtida do consumo de plantas das famílias Cactaceae e Agavaceae, provavelmente quando o morcego visita as flores para comer insetos e ingere acidentalmente néctar ou partes florais, sugerindo que esse comportamento pode representar o primeiro estágio na evolução da nectarivoria e frugivoria em morcegos vespertilionídeos (Herrera *et al.,* 1993).

Isótopos estáveis também foram usados para examinar a origem do sangue ingerido pelo morcego hematófago *D. rotundus* (Herrera *et al.,* 1998; Voigt & Kelm, 2006). O gado, presa bastante atacada por esses morcegos, possui uma assinatura isotópica muito distinta da encontrada em mamíferos selvagens. Tal diferença pode ser observada porque o gado ingere principalmente plantas C_4, enquanto mamíferos selvagens ingerem plantas C_3 (Voigt & Kelm, 2006). A análise da seleção de presas indicou que *D. rotundus* prefere se alimentar de gado, devido à semelhança na proporção de C_4 entre *D. rotundus* e o gado. A preferência por bovinos ocorre muito provavelmente pelo fato destes mamíferos estarem confinados em fazendas representando assim uma fonte de alimento mais previsível (Voigt & Kelm, 2006). Herrera *et al.* (1998) verificaram que quando bovinos não estão disponíveis, morcegos

vampiros conseguem sangue de animais selvagens que se alimentam de plantas C_3 como pacas, antas e veados.

Embora sejam úteis em diversas situações, isótopos estáveis são informativos somente nos casos em que são comparados itens alimentares com diferenças isotópicas. Por causa da grande variedade de frutos e insetos que morcegos frugívoros podem consumir, existe uma grande sobreposição nos valores isotópicos entre os itens ingeridos (Herrera *et al.,* 2001a). A falta de conhecimento taxonômico principalmente das espécies de insetos consumidos por morcegos frugívoros pode levar a problemas de interpretação da origem protéica na dieta. Ao contrário dos métodos que examinam restos de animais (pêlos, ossos, partes de insetos) e plantas (sementes) encontrados nas amostras fecais, isótopos estáveis não trazem informações sobre a identificação taxonômica e frequência do item ingerido. Para a coleta dos dados também existe a necessidade da captura do animal e de um banco de informações dos itens consumidos.

Uso de técnicas baseadas em DNA e métodos não invasivos em estudos das interações presa-predador

Avanços da biologia molecular tornaram acessíveis as investigações de interações tróficas da cadeia alimentar que não eram possíveis com métodos tradicionais (Symondson, 2002; Sheppard & Harwood, 2005). O uso de técnicas baseadas em DNA tem sido empregado principalmente em estudos da dieta em invertebrados terrestres (Mukabana, 2002a; Sheppard & Harwood, 2005), no qual os indivíduos são mortos para a coleta do estômago e análises via PCR (Polymerase Chain Reaction). Entretanto, este tipo de coleta muitas vezes não é possível e admissível em estudos com vertebrados, especialmente para animais ameaçados e/ou carismáticos. A coleta não invasiva de amostras, como fezes e regurgito, tem-se mostrado eficiente na obtenção de DNA para determinação da composição da dieta, principalmente em estudos envolvendo vertebrados selvagens, pois não requer a captura do animal (Kohn & Wayne, 1997; Taberlet *et al.,* 1997; Scribner & Bowman, 1998; Dallas *et al.,* 2003; Nagata *et al.*, 2005; Livia *et al.*, 2007). Populações de vertebrados ameaçados são difíceis de se estudar devido principalmente às baixas densidades em que são encontrados. Nestes casos, fezes são frequentemente usadas para confirmar a presença do animal em determinada área e na análise de sua dieta (Kohn & Wayne, 1997; Idaghdour *et al.,* 2003; Banks *et al.,* 2003).

Basicamente, os experimentos que envolvem análises moleculares da dieta baseiam-se na identificação e diferenciação do DNA da presa e do predador nas amostras fecais, regurgito

ou conteúdo estomacal. Em geral são desenvolvidos pares de iniciadores ("*primers*") espécie-específicos que amplificam uma determinada região do DNA da espécie alvo, a qual será analisada e comparada, possibilitando assim a identificação das espécies da presa e do predador. Asahida *et al.* (1997) foram os primeiros a desenvolverem uma técnica baseada na amplificação do DNA extraído a partir do conteúdo estomacal do predador e identificaram o consumo de larvas e juvenis do linguado *Kereius bicoloratus* (Basilewski) (Pleuronectiformes) pelo camarão *Crangon affinis* (De Haan, 1849) (Decapoda). Nesse estudo, parte do fragmento do *D-loop* (região não codificadora onde ocorre o controle da replicação e transcrição do genoma mitocondrial) foi amplificada, clonada e sequenciada para o desenho de *primers* específicos que amplificam fragmentos de 1,46 Kpb do DNA mitocondrial do linguado.

Diversos *primers* espécie-específicos já foram desenvolvidos para amplificar o DNA, principalmente de genes mitocondriais, de espécies de presas como afídeo, lesma, caracol, molusco, crustáceo, minhoca, Collembola, Diptera, Homopera, Hemiptera, Lepidoptera, visando a identificação destas presas na dieta de invertebrados (ver revisão de Sheppard & Harwood, 2005). A maioria desses estudos foi realizada em laboratório com animais criados em cativeiro e poucos em condições naturais de campo (Hoogendoorn & Heimpel, 2002; Agustí *et al.,* 2003; Kaspar *et al.,* 2004; Harper *et al.,* 2005).

Métodos tradicionais de caracterização do hábito alimentar em mamíferos têm sido conduzidos em combinação com análises genéticas a partir do DNA extraído de fezes para identificar a dieta do predador (identificação das presas) (Evans *et al.*, 1998; Deagle *et al.*, 2005), a espécie do predador (Reed *et al.,* 1997; Farrell *et al.,* 2000; Livia *et al.*, 2007), o sexo (Fedriani & Kohn 2001; Dallas *et al.,* 2003) e o indivíduo que originou a amostra (Reed *et al.,* 1997; Morin *et al.,* 2001; Banks *et al.,* 2003). Devido à dificuldade de identificar as espécies de felinos e canídeos com base no tamanho das amostras fecais, Farrell *et al.* (2000) analisaram um fragmento de 146 pb do gene citocromo b do genoma mitocondrial a partir do DNA extraído das fezes coletadas das espécies. Com a identificação das espécies dos predadores por técnicas moleculares, seus hábitos alimentares puderam ser inferidos por meio da visualização dos restos das presas nas fezes. Em outro estudo sobre o hábito alimentar de carnívoros, marcadores de DNA microssatélites e genes ligados ao sexo foram utilizados para distinguir os indivíduos e o sexo de uma população de coiotes *Canis latrans* Say, 1823 a partir do DNA genômico total extraído das fezes (Fedriani & Kohn, 2001). Tal informação possibilitou conhecer detalhes da dieta de machos e fêmeas dos coiotes, antes impossível de ser acessada utilizando somente métodos tradicionais.

O sucesso da detecção molecular de espécies de presas consumidas por predadores depende em grande parte do nível de degradação a que o DNA é submetido, durante o processo de digestão. A degradação influenciará sobremaneira o tamanho dos fragmentos de DNA da presa que poderão ser amplificados. Outro fator importante a ser considerado é o tempo de permanência do DNA da presa no trato digestivo do predador. Estudos têm demonstrado que fragmentos menores que 300 pb do DNA da presa são amplificados com sucesso, pois fragmentos maiores de DNA são quebrados mais rapidamente durante a passagem pelo trato digestivo do predador (Zaidi *et al.,* 1999; Chen *et al.,* 2000; Agustí *et al.,* 1999, 2003; Juen & Traugott, 2005). O sucesso da detecção do DNA dos ovos de *Helicoverpa armigera* Habner (Lepidoptera: Noctuidae) no trato digestivo do predador *Dicyphus tamaninii* Wagner, 1951 (Heteroptera: Miridae) foi de 50% usando *primers* que amplificam fragmentos de 600 pb, mas aumentou para 75% em fragmentos de 254 pb (Agustí *et al.,* 1999). Esses autores também observaram que 4 horas após os ovos serem ingeridos pelo predador, apenas 45% das presas puderam ser detectadas pela análise dos fragmentos contendo 254 pb.

Em geral, fragmentos pequenos de DNA da presa resistem melhor a longos períodos de digestão comparado a fragmentos maiores. Contudo o poder de detecção mesmo dos fragmentos menores de DNA tende a diminuir com o aumento do tempo de permanência no trato digestivo do predador (Agustí & Symondson, 2001; Agustí *et al.,* 1999, 2000; Chen *et al.,* 2000; Hoogendoorn & Heimpel, 2001). Estudo realizado com o invertebrado terrestre *Anthocoris tomentosus* Pericart, 1971 (Heteroptera), o qual foi alimentado em cativeiro com *Cacopsylla pyricola* Föerster, 1848 (Homoptera), demonstrou que após 8 horas todas as predações puderam ser detectadas, mas após 32 h somente 15% do DNA da presa pode ser amplificado (Agustí *et al.,* 2003). Neste estudo os autores desenvolveram *primers* específicos que amplificam um fragmento de 188 pb da região COI (Cytochrome Oxidase subunit I) do genoma mitocondrial da presa.

Estudos controlados com vertebrados em cativeiro são difíceis de serem realizados, especialmente com espécies ameaçadas ou de grande porte, devido ao baixo número de réplicas e os custos elevados para a realização dos experimentos. Por isso, muitas análises são feitas a partir de coletas de fezes realizadas em campo apenas. Nesses casos a qualidade do DNA pode ser afetada por fatores climáticos. Estudos mostram que, em geral, quantidades maiores de DNA, e de melhor qualidade, são obtidas de amostras novas e coletadas durante o inverno (Lucchini *et al.,* 2002; Nsubuga *et al.,* 2004).

Outro aspecto considerado em estudos de análise molecular desta natureza diz respeito à escolha das regiões do genoma a serem amplificadas. Em seu estudo experimental usando

besouros *Pterostichus cupreus* Linnaeus como predador de mosquitos, Zaidi *et al.* (1999) sugerem que a análise de regiões de genes com cópias múltiplas pode maximizar as chances de amplificação quando comparado a regiões do DNA que possuem poucas cópias, simplesmente porque uma quantidade maior do DNA alvo pode ser preservado por um determinado período no intestino do predador. Estudos que analisam amostras fecais de vertebrados também chegaram às mesmas conclusões (Kohn & Wayne, 1997: Farrel *et al.,* 2000). Sequências do DNA mitocondrial ocorrem em um grande número de cópias por célula e por isso aumentam as probabilidades de alcançar um resultado positivo, em termos de sucesso na amplificação de fragmentos, mesmo a partir de DNA degradado.

Existe uma variedade de marcadores moleculares que podem ser usados em estudos da caracterização da dieta animal e genética de populações (Mukabana *et al.,* 2002a; Symondson, 2002). A escolha do marcador molecular apropriado depende do tipo de informação que se pretende obter, seja ela relacionada ao predador ou à presa. Embora o uso de marcadores de genes mitocondriais tenha prevalecido nos estudos sobre os hábitos alimentares de diversas espécies, o grau de polimorfismos de fragmentos curtos do DNA mitocondrial é limitado. Isso implica em um baixo potencial para uso desses marcadores em situações que necessitem identificação individual. Nesse sentido, marcadores de DNA microssatélites, também chamadas de Sequências Simples Repetidas (SSR) são os marcadores mais informativos e os mais indicados em estudos sobre identificação individual, bem como em análise de parentesco e exclusão de paternidade (Mukabana *et al.,* 2002a; Ortega *et al.*, 2003).

O uso de marcadores microssatélites tem sido frequentemente empregado em estudos sobre a dinâmica de transmissão de parasitas por artrópodes hematófagos (Chow-Shaffer *et al.,* 2000; Michel *et al.,* 2001; Mukabana *et al.,* 2002b). Devido à alta especificidade e conteúdo informativo, os polimorfismos de DNA microssatélites do genoma nuclear, detectados em amostras de sangue ingerido por insetos hematófagos, têm possibilitado conhecer detalhes relacionados à epidemiologia de algumas doenças tropicais. Dentre estes destacam-se: 1) a especificidade por tipo de hospedeiro (Torr *et al.,* 2001); 2) preferência por diferentes presas (Ansell *et al.,* 2000); 3) auxílio no desenvolvimento de estratégias para o controle de vetores de doenças, como a malária (Dye, 1990). Marcadores microssatélites já foram usados para inferir sobre os níveis de proteção conferida por repelentes (Gokool *et al.,* 1992, 1993), quantificar a taxa de infecção por *Plasmodium* associado ao comportamento alimentar de *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Koella *et al.,* 1998), determinar a taxa de ataque de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Chow-Shaffer *et al.,* 2000; Ansell *et al.,* 2000), *Glossina* spp. (Torr *et al.,* 2001) e *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Michel *et al.,* 2001) em

diferentes indivíduos (humanos), comparando preferência por mulheres grávidas e não grávidas (Ansell *et al.,* 2002) e taxa de exposição a doenças (Michel *et al.,* 2001). Em vertebrados, microssatélites também foram utilizados com sucesso na caracterização da dieta em gaivotas (Scribner & Bowman, 1998) e peixes (DeWoody *et al.,* 2001).

Além disso, marcadores microssatélites têm sido utilizados para estimar o tamanho populacional, a abundância e a distribuição espacial em diversas espécies de mamíferos de grande porte com base na análise de DNA extraído de amostras fecais (Frantz *et al.,* 2003; Hung *et al.,* 2004; Bellemain *et al.,* 2005; Prugh *et al.*, 2005; Hájková *et al.*, 2006; Piggott *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2003, 2007). A grande capacidade de identificação individual dos microssatélites permite detectar a recaptura de indivíduos já conhecidos, pela análise de diversas amostras fecais coletadas em uma determinada área. Por meio da captura e recaptura das fezes de diferentes indivíduos, autores têm proposto modelos matemáticos capazes de estimar o tamanho das populações (Hung *et al.,* 2004; Bellemain *et al.,* 2005). Estes resultados são importantes para elaborar e aplicar programas eficientes de manejo, manutenção e preservação de espécies de mamíferos ameaçados.

Devido a capacidade de amplificar fragmentos curtos a partir do DNA extraído de amostras fecais, muitos dos marcadores moleculares podem ser sequenciados para acessar a identificação da espécie do predador (Farrell *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003, 2007) e da presa (Casement, 2001; Jarman *et al.*, 2004). Um conjunto de *primers* grupo-específico da região do DNA genômico que codifica para RNA ribossômico (rDNA) foram desenvolvidos para amplificar o DNA extraído das fezes coletadas de baleias Fin (*Balaenoptera physalus* Linnaeus, 1758) e pinguins de Adélia (*Pygoscelis adeliae* (Hombron & Jacquinot, 1841)) (Jarman *et al.*, 2004). Estes predadores marinhos possuem uma dieta muito variada e difícil de ser acessada através do uso de *primers* espécie-específicos, pois vários desses *primers* teriam que ser desenvolvidos. Os *primers* grupo-específico puderam então amplificar um grande número de presas pertencentes a Eucariotos, ao superfilo Bilateria, filo Chordata e subordem Nototheniodei. O produto de PCR foi clonado e sequenciado para comparação com sequências do banco de dados do GenBank e posterior identificação do item ingerido (Jarman *et al.*, 2004).

Em outro estudo, análises do DNA extraído de amostras fecais coletadas em campo permitiram identificar e diferenciar quatro espécies de grandes carnívoros (*Puma concolor* Linnaeus, 1771, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) e *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766)) (Farrell *et al.*, 2000). Devido à impossibilidade da captura desses animais, um fragmento de 146 pb do citocromo b foi amplificado do DNA extraído das

fezes e sequenciado. Os fragmentos de DNA gerados foram comparados com o padrão das sequências conhecidas de indivíduos dessas espécies mantidas em cativeiro para a identificação da espécie que originou a amostra fecal analisada (Farrell *et al.*, 2000).

Análises moleculares do DNA extraído de amostras fecais têm sido usadas como uma estratégia para o monitoramento espacial de populações de mamíferos e para a identificação de híbridos, empregando marcadores microssatélites para a identificação dos indivíduos da espécie em questão (Piggott *et al.* 2006; Adams *et al.*, 2007). Contudo, mamíferos como canídeos e felinos possuem grande sobreposição morfológica das suas fezes e várias das amostras coletadas em campo podem ser originadas de outras espécies diferentes da espécie alvo (Farrell *et al.*, 2000; Davison *et al.*, 2002). Neste caso, o sequenciamento de fragmentos do DNA mitocondrial tem sido sugerido como uma alternativa para a identificação da espécie. Por exemplo, Adams *et al.* (2007) em um estudo para localizar híbridos na população do lobo vermelho *Canis rufus* Audubon & Bachman, 1851, coletaram 151 amostras fecais na área de estudo, no qual 62 delas falharam nas análises por microssatélites. O sequenciamento de um fragmento de 146 pb do citocromo b e comparação com sequências do GenBank indicou que estas amostras corresponderam a sete espécies de mamíferos diferentes do lobo vermelho (Adams *et al.*, 2007).

Estudos sobre a relação presa-predador que empregam análises moleculares do conteúdo do trato digestivo ou amostras fecais, muitas vezes estão interessados em investigar o potencial de invertebrados predadores como agentes do controle biológico de uma ou poucas espécies de pragas (Agustí *et al.*, 2003, 2005; Sheppard *et al.*, 2004; Juen & Traugott, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Nestes casos, o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para até três espécies de presa é mais econômico do que análises por sequenciamento, pois seus resultados são alcançados pela amplificação da espécie alvo, enquanto que os altos custos do sequenciamento tornam impraticável amplos estudos ecológicos. Além disso, estudos com invertebrados utilizam o predador com a presa ainda no seu estômago para a extração de DNA (Chen *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2003; Juen & Traugott, 2005). A amplificação por marcadores universais de um DNA misto, contendo DNA extraído da presa e do predador, terá como produto da PCR um fragmento formado tanto pelo DNA da presa quanto do predador, o que inviabiliza a identificação da presa na análise do fragmento sequenciado.

Outra técnica molecular que tem sido utilizada na investigação das interações presa-predador envolve a combinação da amplificação de uma determinada região do genoma via PCR e a análise posterior por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). A técnica

PCR-RFLP tem sido amplamente utilizada como uma poderosa ferramenta para a determinação precisa de espécies (Evans *et al.,* 1998; Silva *et al.*, 1999; Wagener *et al.*, 2004; Livia *et al.*, 2007).

Basicamente a técnica de PCR-RFLP consiste na clivagem de um fragmento amplificado de DNA por enzimas de restrição (Dowling *et al.*, 1990; Arias & Infante-Malachias, 2001). As enzimas clivam o DNA em um sítio de reconhecimento específico formado por quatro a seis pares de bases. Para uma determinada região amplificada do genoma, os fragmentos gerados a partir da ação da enzima de restrição, irão variar de tamanho de uma espécie para outra, dependendo do número e da distribuição dos sítios de reconhecimento no fragmento de DNA analisado. Por sua vez, a natureza da variação dos sítios pode se dar por rearranjos da sequência no local de corte da enzima, através da duplicação, inversão, adição ou deleção de bases no DNA. Todas essas alterações podem criar, eliminar ou mudar a posição dos sítios de clivagem, afetando o número de fragmentos gerados e consequentemente seus tamanhos (Dowling *et al.*, 1990; Arias & Infante-Malachias, 2001). A identificação das espécies é feita pela diferenciação entre os padrões dos perfis de restrição entre as espécies analisadas.

Esta técnica molecular tem sido usada com sucesso em análises forenses nas quais pretende-se, por exemplo, averiguar a origem de determinados alimentos, nos casos em que carnes de uma espécie animal de alto valor comercial é misturada ou até mesmo substituída por outras espécies de menor valor comercial (Céspedes *et al.,* 1998; Colombo *et al.,* 2000; Sun *et al.,* 2003; Pascoal *et al.,* 2005). A autenticação de alimentos de origem animal via PCR-RFLP também pode ser útil quando a mistura de carnes põe em risco a saúde humana. Por exemplo, a doença da "vaca louca" (encefalopatia espongiforme bovina) pode ser transmitida para o gado e humanos através da inclusão na ração do gado de algum tipo de material contaminado de origem bovina (Bellagamba *et al.,* 2001; Pascoal *et al.,* 2005). Atualmente, a União Européia considera restos de boi (vísceras e tecido cerebral) como material de alto risco e vem proibindo sua mistura na alimentação do gado. A determinação de espécies por PCR-RFLP pode ser de interesse em outras análises forenses, quando manchas de sangue, ossos e conteúdos do estômago de animais precisam ser identificados (Zehner *et al.,* 1998).

Para a analise por PCR-RFLP é necessário o uso de *primers* universais capazes de amplificar o DNA de uma variedade de espécies de mamíferos, aves e peixes (Kocher *et al.,* 1989), uma vez que a origem das amostras analisadas é desconhecida. Características do genoma da mitocôndria tem tornado essa organela atrativa para estudos de identificação de

espécies animais através de PCR-RFLP (Silva *et al.*, 1999; Wagener et al, 2004; Steuber *et al.,* 2005). O genoma mitocondrial possui herança materna e por isso não segue padrões de segregação mendeliana e não sofre recombinação (Arias & Infante-Malachias, 2001). Em vertebrados, essa molécula possui uma alta taxa de evolução, a qual estima-se ser 10 vezes superior à do genoma nuclear (Calcagnotto, 2001). Este fenômeno poderia estar sendo causada pela baixa fidelidade na replicação das mitocôndrias, alta exposição a radicais livres e baixa eficiência do mecanismo de reparo (Li & Graur, 1991). Existe uma variação nas taxas de substituição de nucleotídeos entre os 37 genes descritos para esta molécula (Arias & Infante-Malachias, 2001). Por exemplo, em alguns mamíferos a região controle é a que mais acumula mutações sendo usada principalmente em estudos populacionais, enquanto que o citocromo b está entre os mais conservados e preferencialmente usado em análises filogenéticas (Pereira, 2000). Essas características de herança materna e falta de recombinação permitem traçar uma genealogia materna muito importante para os estudos de dispersão dos organismos e das relações evolutivas, entre indivíduos, espécies e populações (Pereira, 2000).

A utilização de fragmentos curtos do citocromo b (<200 pb) tende a diminuir as chances das mutações gerarem grandes diferenças intraespecíficas nos sítios de restrição das enzimas, favorecendo o reconhecimento de espécies geograficamente próximas. Mesmo assim, a região do citocromo b apresenta polimorfismo interespecífico suficiente para distinguir entre várias espécies de vertebrados como boi, ovelha, galinha, humano e o porquinho da Índia (*Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758)) utilizando a técnica de PCR-RFLP. Oshaghi *et al.* (2006) evidenciaram tal padrão detectando fragmentos de diferentes tamanhos após digestão com a enzima *Taq* I.

Para uma análise de *fingerprinting* visando à diferenciação de espécies com a técnica PCR-RFLP, a escolha das enzimas de restrição se faz com base no padrão único de tamanho e número de fragmentos obtidos após a digestão, o qual é diferente para cada uma das espécies testadas, conferindo assim um padrão de identificação inequívoco (Wagener *et al.*, 2004; Steuber *et al.,* 2005). Geralmente são usadas mais de duas enzimas para se ter um conjunto de informações que confirmem a identificação das espécies. As enzimas também podem ser escolhidas em função de sua especificidade, por exemplo, quando uma determinada enzima cliva o DNA de somente uma das espécies testadas, ou por exclusão, quando nenhuma das enzimas corta o DNA de uma das espécies analisadas (Steuber *et al.,* 2005).

Semelhante aos marcadores microssatélites, os marcadores PCR-RFLP também têm sido utilizados como um método molecular eficiente para discriminar espécies de presas presentes no conteúdo estomacal de insetos hematófagos (Steuber *et al.,* 2005; Oshaghi *et al.,*

2006). O conhecimento do comportamento de forrageio desses insetos, que utilizam diversas espécies de mamíferos como fonte de alimento, é um pré-requisito importante para ações de controle de doenças, pois possibilita identificar o grau de contato do vetor (inseto) com os animais reservatórios da doença e o seu potencial risco de transmissão para humanos (Kirstein & Gray, 1996; Meece *et al.*, 2005; Steuber *et al.,* 2005). Microssatélites têm sido comumente usados para investigar as interações entre esses insetos e humanos apenas. Os marcadores PCR-RFLP, por sua vez, apresentam a vantagem de discriminar várias espécies de hospedeiros ou presas, mesmo quando são filogenéticamente próximas. Por exemplo, PCR-RFLP foi capaz de discriminar 10 espécies de Bovidae por meio da análise da clivagem de um fragmento de 358 pb do gene citocromo b utilizando três enzimas de restrição (*Taq* I, *Alu* I e *Hind* II) (Steuber *et al.,* 2005). A família Bovidae é considerada a principal fonte de alimento para moscas tsé-tsé (Díptera: Glossinidae) transmissoras de tripanossomíases. Muitas das espécies de Bovidae são encontradas em simpatria com humanos, usadas como animais de criação em comunidades rurais, tornando-se um reservatório da doença. Em estudo realizado por Oshaghi *et al.* (2006) no Irã, foi possível discriminar corretamente o DNA de humanos, bois e ovelhas pela análise do conteúdo estomacal dos mosquitos *Anopheles sacharovi* Favre, 1903 e *A. stephensi* Liston, 1901 (Culicidae) transmissores de malária, por meio da técnica de PCR-RFLP.

Até o presente, apenas um estudo utilizou técnicas moleculares para investigar a dieta de morcegos hematófagos (Carter *et al.,* 2006). As análises foram feitas utilizando amostras de fezes do morcego vampiro *Diaemus youngi* alimentado em cativeiro com sangue de galinha. O resultado desses autores demonstrou que o DNA da galinha extraído das fezes do morcego pode ser isolado e amplificado com sucesso. Neste estudo foi amplificado, via PCR, um fragmento de 200 pb do gene nuclear RAG-1, altamente conservado em aves (Carter *et al.,* 2006).

Devido à alimentação dos morcegos hematófagos ser composta exclusivamente de sangue (Greenhall *et al.*, 1983, 1984; Greenhall, 1988; Fenton, 1992; Greenhall & Schutt, 1996), suas fezes são formadas apenas por partes moles, semelhantes a uma pasta escura (Figura 1). Obviamente, isso significa que o uso de técnicas tradicionais de visualização direta de restos triturados da presa não se aplica ao estudo do hábito alimentar desses morcegos. A dieta de morcegos hematófagos tem sido acessada unicamente através da observação direta dos morcegos se alimentando sobre as presas, o que muitas vezes limita a identificação e a quantificação das diferentes presas domésticas e selvagens em condições naturais de campo

(Sazima, 1978; Sazima & Uieda, 1980; Greenhall *et al.*, 1983; Delpietro *et al.*, 1992; Uieda, 1992, 1993; Uieda *et al.*, 2002).

Os experimentos ilustrados anteriormente demonstram que a utilização de técnicas moleculares a partir de DNA amplificado via PCR das amostras fecais podem ser aplicadas em morcegos hematófagos. Provavelmente estas novas técnicas são as únicas que possibilitam a quantificação precisa dos eventos de predação, o qual incluem o número de espécies utilizadas e a taxa de uso das diferentes presas disponíveis, bem como as consequências deste comportamento. Estes dados permitem explorar uma nova área do comportamento de forrageio de morcegos hematófagos, essenciais para compreendermos melhor sua interação com os humanos e animais domésticos a fim de serem tomadas medidas de manejo adequadas para este grupo de morcegos.

Figura 1. Exemplo de amostra fecal recém coletada do morcego hematófago *Desmodus rotundus* em condições naturais.

Considerações taxonômicas e distribuição dos morcegos hematófagos

Os morcegos hematófagos (Mammalia, Chiroptera) compreendem três espécies, distribuídas em três gêneros, *Desmodus rotundus* (Figura 2), *Diphylla ecaudata* Spix, 1823 e *Diaemus youngi*. Até a década de 80, estes morcegos eram considerados membros de uma família distinta, Desmodontidae, possivelmente ligado ao hábito da alimentação exclusiva por sangue. No entanto, características afins contribuíram para a inclusão dos morcegos hematófagos na família Phyllostomidae. A espécie *D. youngi* inicialmente foi descrita dentro

do gênero *Desmodus*. Miller (1906, apud Greenhall & Schutt, 1996) criou o gênero *Diaemus* para esta espécie de morcego vampiro, mas Handley (1976) e Honacki *et al.,* (1982) ainda a incluíam dentro de *Desmodus*. Somente depois, Koopman (1988, 1993) concluiu que *Diaemus* representava um gênero válido. No presente estudo, a classificação taxonômica utilizada segue as recomendações de Koopman (1993), a qual insere os morcegos hematófagos na família Phyllostomidae.

Desmodus rotundus é considerada a espécie mais comum de morcego hematófago, podendo ser encontrado desde o México, passando pelas Américas Central até o extremo sul da América do Sul. Sua distribuição limite sul se estende até a costa do Chile (Pacífico), Argentina central e a costa do Uruguai (Atlântico) (Figura 3). Estes morcegos não são encontrados nas ilhas do Caribe, com exceção das ilhas de Trinidad e Margarita, na costa norte da Venezuela. Também podem ocorrer em elevações de até 2000 metros, ao norte dos Andes e Equador (Goodwin & Greenhall, 1961; Jones & Carter, 1976; Greenhall *et al.,* 1983; Flores-Crespo & Arellano-Sota, 1991; Brass 1994).

Figura 2. Indivíduo de *Desmodus rotundus* macho capturado ao se alimentar de porcos na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, localizada a 30 km de Manaus.

Por outro lado, *D. ecaudata* e *D. youngi* são considerados raros ou pouco comuns ao longo de sua distribuição nas Américas. *Diaemus youngi* ocorre na porção leste do México, e parte das Américas Central e do Sul (Jones & Carter, 1976; Greenhall *et al.,* 1984; Koopman,

1988; Brass, 1994). Na América do Sul é encontrado da Amazônia Central e Guianas, até o norte da Argentina e sudeste brasileiro, bem como nas ilhas de Trinidad e Margarita (Mares *et al.,* 1981; Koopman, 1988; Brass, 1994) (Figura 3). Esta espécie não é encontrada na parte oeste dos Andes e nas ilhas do Caribe (Jones & Carter, 1976; Greenhall *et al.,* 1984; Koopman, 1988; Brass, 1994). *Diphylla ecaudata* é a espécie de morcego hematófago menos conhecida quanto a distribuição. Ele pode ser encontrado do sul do Texas, passando a leste do México e seguindo por toda América Central, onde possui maior abrangência em relação a *D. youngi* (Figura 3). Na América do Sul se estende do leste dos Andes, Bolívia, Peru, Brasil central até a costa do Atlântico (Figura 3). Sua distribuição na Amazônia brasileira é desconhecida na literatura, mas dados recentes indicam sua presença nessa região (Uieda *et al.,* 2002).

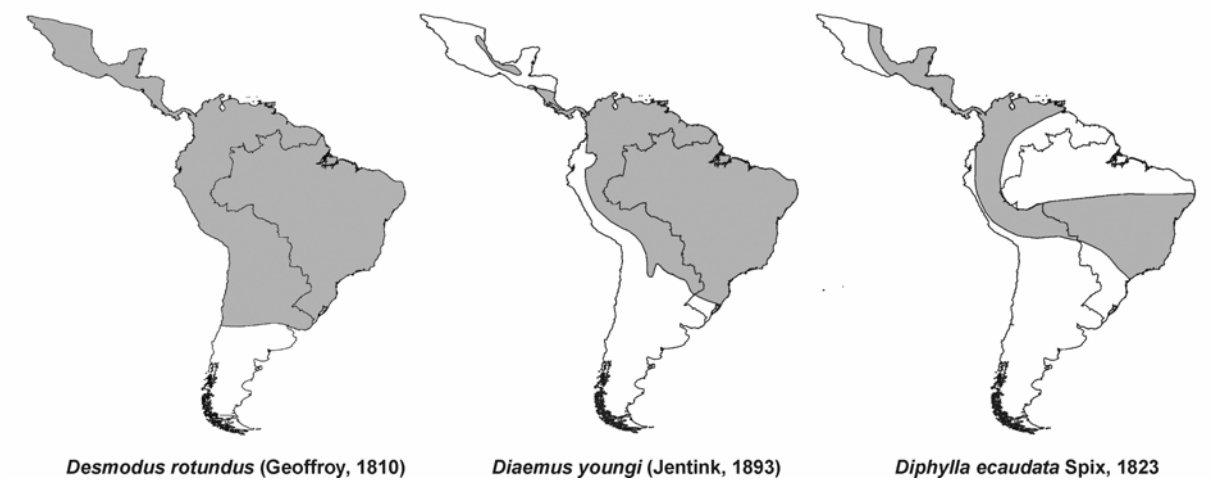


Figura 3. Distribuição das três espécies de morcegos hematófagos pela América Latina. Mapa reproduzido de Patterson *et al.,* 2005.

Comportamento alimentar dos morcegos hematófagos

Os estudos sobre a biologia de morcegos hematófagos iniciaram-se na década de 60, devido os ataques ao gado pela espécie *D. rotundus*, sendo considerada na América Latina a principal transmissora da raiva a esses animais (Taddei, 1983). Observações sobre o comportamento alimentar de morcegos hematófagos têm sido registradas tanto em condições naturais, diretamente em animais de criação em seus abrigos (Crespo *et al.,* 1961, 1974; Wimsatt, 1969; Greenhall *et al.,* 1969, 1971; Young, 1971; Turner, 1975; Sazima, 1978; Uieda, 1992, 1993; Sazima & Uieda, 1980), quanto em condições de cativeiro (Crespo *et al.,* 1971, 1972; Greenhall, 1972; Schmidt & Greenhall, 1972; Delpietro & Russo, 2002).

Os animais de criação têm sido citados como a principal fonte de alimento das três espécies de morcegos hematófagos. *Diaemus youngi* e *D. ecaudata* são considerados mais especializados quanto à preferência alimentar, explorando sangue de aves, enquanto *D. rotundus* alimenta-se principalmente de mamíferos (Greenhall, 1988). No Brasil, estudos detalhados sobre o comportamento alimentar de *D. ecaudata* e *D. youngi* foram realizados por Uieda *et al.* (1982, 1992 e 1994), em condições experimentais de cativeiro. Seus resultados indicaram que *D. ecaudata* é especialista em sangue de aves, enquanto *D. youngi* concentra sua alimentação em aves, mas também pode procurar mamíferos quando existe escassez de aves. Tal comportamento demonstra uma maior flexibilidade alimentar em *D. youngi* comparado à *D. ecaudata*.

Estudos sobre a alimentação de *D. rotundus* em cativeiro, revelam que uma variedade de outros animais considerados não-domésticos pode ser utilizada como fonte de alimento. Já foram observados répteis, anfíbios, aves e mamíferos (Greenhall, 1988). Outras espécies de morcegos, como *Sturnira lilium*, também podem ser atacadas por *D. rotundus* (Brass, 1994). Estes estudos indicam que em locais onde existe baixa disponibilidade ou acessibilidade a animais de criação, os animais silvestres passam a ser a fonte principal de alimento para esta espécie de morcego.

A seleção dos tipos de presas utilizadas pode variar entre localidades (Uieda, 1982). Em Trinidad-Tobago, por exemplo, Goodwin & Greenhall (1961) citam bois, cavalos, cabras, porcos, aves, ovelhas, cães e humanos em ordem de preferência na dieta de *D. rotundus*. No nordeste da Argentina, *D. rotundus* ataca gado, cavalos, porcos, ovelhas e burros, de acordo com a disponibilidade destes animais (Delpietro, 1992).

Uma variedade de fatores pode influenciar a preferência por tipo de presa em *D. rotundus*, incluindo a disponibilidade, acessibilidade e abundância dos recursos (Thompson *et al.*, 1982; Voigt & Kelm, 2006). Contudo, Lord (2001) acredita que *D. rotundus* são animais mais dependentes da disponibilidade de abrigos adequados, do que da abundância de alimento. Essa preferência ou não aceitação de determinadas presas também pode resultar de variações entre populações, ou mesmo entre indivíduos de uma mesma população (Uieda, 1994).

Impacto econômico do ataque de morcegos hematófagos

Antes da chegada dos europeus ao continente americano, a fonte de alimento dos morcegos hematófagos eram os animais silvestres e possivelmente os indígenas (Greenhall,

1965, 1988). Neste período, a população desses morcegos era provavelmente menor do que a atual. Com a chegada dos europeus às Américas, trazendo seus animais de criação, houve um aumento na disponibilidade de alimento, o que deve ter favorecido o crescimento populacional desses morcegos (Greenhall, 1988; Linhart, 1975). *Desmodus rotundus* foi provavelmente a espécie de hematófago mais favorecida com a introdução de animais domésticos. Neste novo contexto, os animais de criação tornaram-se presas fáceis, uma vez que não possuíam adaptações contra tais predadores, representando uma fonte de alimento abundante e acessível (Goodwin & Greenhall, 1961; Greenhall, 1965).

Na década de 80, foi estimado que 70 milhões de cabeças de gado viviam em simpatria com morcegos hematófagos na América Latina (Acha & Malaga-Alba, 1988). Devido ao fato de alimentarem-se exclusivamente de sangue, os morcegos hematófagos possuem grande capacidade de transmissão da raiva paralítica para suas presas. O morcego *D. rotundus* é considerado uma praga para a pecuária neotropical e indicado como o principal responsável pela transmissão da raiva paralítica do gado (Greenhall, 1988; Acha & Málaga-Alba, 1988). Segundo o Centro Pan Americano de Zoonoses, entre 1980 e 1992, os maiores índices de mortalidade de gado por raiva foram registrados, em ordem decrescente, no Brasil, Bolívia, Colômbia, Venezuela e México (Brass, 1994). O Brasil é um dos países que mais tem sofrido com a raiva paralítica do gado. Em 1983 e 1984, as perdas econômicas foram estimadas em 34 milhões e 31 milhões de dólares, respectivamente.

A documentação de casos de raiva paralítica do gado pode estar subestimada, devido à falta de registro e identificação dos animais mortos em função da doença. Muitas das mortes não foram diagnosticadas por meio de exames laboratoriais, podendo ser negligenciadas nas estimativas do impacto desta doença para a pecuária (Acha & Málaga-Alba, 1988). Outros prejuízos causados pelo ataque dos morcegos são a perda de peso dos animais, redução da qualidade do couro e aumento das chances de contrair infecções nos ferimentos (Constantine, 1970, 1988).

No entanto, nem todos os casos de raiva podem ser atribuídos exclusivamente aos morcegos hematófagos. Outros animais, como os cães, são potenciais transmissores de raiva, principalmente para humanos, devido ao contato direto com esses animais (Belotto, 2001). Entre 1995 e 2000, dos 525 casos de raiva humana registrados, 80% foram causados por ataque de cães, os outros 20 % foram atribuídos a morcegos hematófagos (Belotto, 2001).

Apesar de não serem considerados tão nocivos ao homem, *D. ecaudata* e *D. youngi* também foram favorecidos pela colonização européia na América tropical (Greenhall, 1988; Linhart, 1975). A criação de aves domésticas permitiu ampliar os tipos de presas na dieta

dessas espécies de morcegos hematófagos. Em áreas rurais ou em criações de fundos de quintal, a presença de aves domésticas pode até substituir os ataques a aves selvagens. Do mesmo modo como ocorreu com *D. rotundus*, a abundância e acessibilidade desse novo recurso alimentar permitiram um aumento populacional de *D. ecaudata* e *D. youngi* (Greenhall, 1988; Linhart, 1975). Registros da morte de aves em decorrência das agressões de *D. ecaudata* e *D. rotundus* é um fenômeno conhecido e citado na literatura (Husson, 1962; Greenhall, 1988; Uieda, 1992). Contudo, não são conhecidos os impactos econômicos à criação de aves causados por essas espécies de hematófagos.

A flexibilidade alimentar de *D. youngi*, incluindo além de aves, mamíferos domésticos (cabras, porcos e possivelmente o gado) em sua dieta, pode futuramente transformar este morcego em um perigo às criações de animais. O tipo de presa e comportamento alimentar dos morcegos hematófagos podem indicar sua vulnerabilidade às perturbações ambientais causadas pelo homem. Embora a criação de animais domésticos tenha beneficiado as populações de *D. ecaudata* e *D. youngi*, estas são consideradas espécies raras, que formam colônias pequenas e não matam suas presas quando estas são abundantes. Por isso, devem ser preservadas também no contexto dos programas de controle a morcegos hematófagos (Uieda, 1992).

Seres humanos como fonte de alimento

Além de animais domésticos, seres humanos têm sido frequentemente mencionados como fonte de alimento para *D. rotundus* (Gardner, 1977; Greenhall, 1988; Brass, 1994; Schneider *et al.,* 1996). Os primeiros relatos destes ataques datam do século XVI, quando os exploradores europeus chegaram nas Américas (Brass, 1994). A maior parte dos registros oficiais de agressões a seres humanos deve-se ao fato das vítimas terem morrido, muitas vezes associadas à transmissão da raiva (Lopez *et al.,* 1992; Rosa *et al.,* 2006).

Em 1973 foi criado no Brasil o Programa Nacional de Profilaxia da Raiva (PNPR) com o propósito de combater a transmissão da raiva para humanos através do controle da zoonose em animais domésticos e o tratamento de pessoas que tenham tido algum ferimento causado por eles. Desde então foi observada uma redução nos casos de raiva em humanos, com uma queda de mais de 50% entre 1997 e 2006 comparado com a década anterior (Figura 4a). Programas de vacinação e controle da raiva em animais domésticos (cães e gatos) foram os principais responsáveis pela diminuição desses casos, especialmente após 1993 (Figura 4a).

Morcegos hematófagos ocupam a terceira posição na transmissão de raiva para humanos, com 134 casos registrados entre 1986 e 2007 (SVS, 2007) (Figura 4b). Este número atingiu seu ápice recentemente, quando em 2004 e 2005 o Brasil presenciou o maior surto de raiva transmitida por morcegos já registrado no mundo, em um período curtíssimo de tempo (um mês). Em 2004, os casos ocorreram nos municípios de Viseu e Portel no estado do Pará, distantes 600 km um do outro, onde morreram 21 pessoas (Rosa *et al.,* 2006). Em 2005, outro foco de raiva humana foi identificado em Godofredo Viana, Candido Mendes, Carutapera e Turiaçu no Maranhão, também resultando em um número elevado de óbitos (19 pessoas) (SVS, 2005). A partir do surgimento desses surtos de raiva humana provocada por morcegos, o Ministério da Saúde e a Secretaria de Saúde do Estado do Pará intensificaram as investigações de ataques por morcegos hematófagos em humanos no interior do estado, principalmente em situações de suspeitas de transmissão de raiva.

Casos de ataques por morcegos hematófagos em humanos têm sido detectados em áreas mais remotas no Brasil, Belize, Peru e Venezuela (McCarthy, 1989; Lopez *et al.,* 1992; Schneider *et al.,* 1996; Warner *et al.,* 1999). No Brasil, ataques a seres humanos não são eventos raros e ainda acontecem em várias regiões do norte e nordeste (Schneider *et al.,* 1996; Gonçalves *et al.,* 2002; Uieda *et al.,* 2002; Schneider *et al.,* 2001; Bobrowiec, 2007) (Figura 4c). No município de Aporá, Bahia, em 1990 foram registrados 32 pessoas atacadas por *D. rotundus*, chegando a 308 pessoas em 1991, onde três morreram por causa da transmissão da raiva (Gonçalves *et al.,* 2002). Os ataques foram concentrados entre fevereiro e abril durante a estação seca. Em Viseu no Pará, 1558 pessoas relataram terem sido mordidas por *D. rotundus* diversas vezes na vida e outras 838 já tinham sido mordidas mais de uma vez nos últimos 12 meses (Rosa *et al.,* 2006).

Em algumas localidades, o aumento de ataque em humanos é temporário e ocorre quando existe uma interrupção do tipo de presa habitual de *D. rotundus* (McCarthy, 1989; Caraballo, 1996; Warner *et al.,* 1999). Por exemplo, em um vilarejo em Belize, o controle de uma epidemia de febre suína causada por porcos incluiu o extermínio dos suínos, a principal fonte de alimento de *D. rotundus* (McCarthy, 1989). Os morcegos passaram então a se alimentar de humanos, principalmente de crianças. O desmatamento seguido da ocupação humana pode provocar a diminuição na disponibilidade das presas selvagens para *D. rotundus* através da pressão de caça ou simplesmente por afugentar esses animais. Nesta circunstância, este morcego passa a se alimentar dos animais de criação, domésticos e até mesmo do homem, onde procura abrigo próximo a sua fonte de alimento, incluindo casas abandonadas, porões ou qualquer outro local pouco perturbado, principalmente devido ao seu

comportamento mais flexível comparado aos outros hematófagos (Greenhall, 1988; Delpietro, 2001).

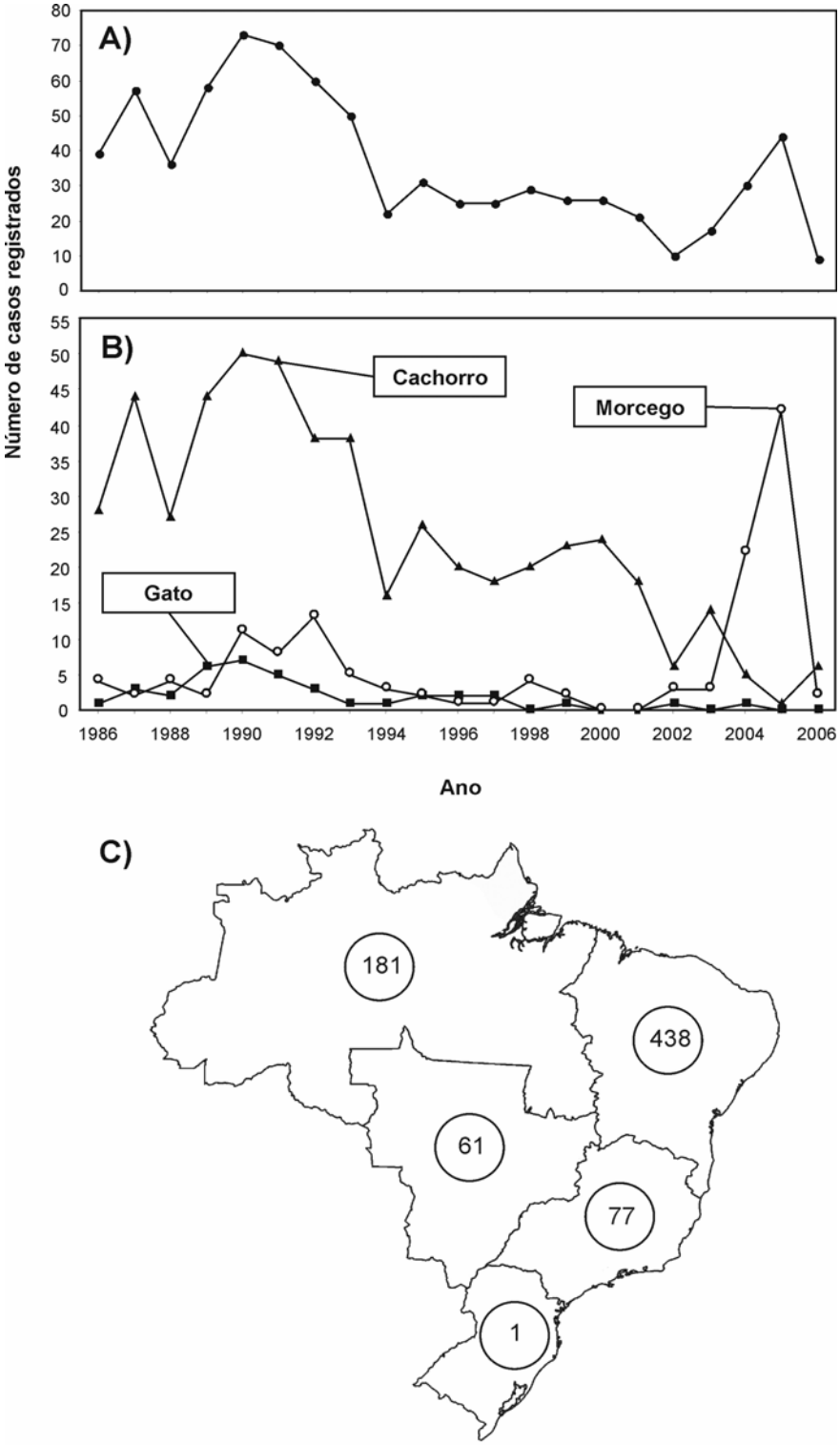


Figura 4. Número de casos registrados de raiva humana no Brasil entre 1986 e 2006. a) número total de casos transmitidos; b) número total de casos transmitidos pelos três principais animais vetores; c) distribuição dos casos de raiva humana nas cinco regiões brasileiras. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (2007).

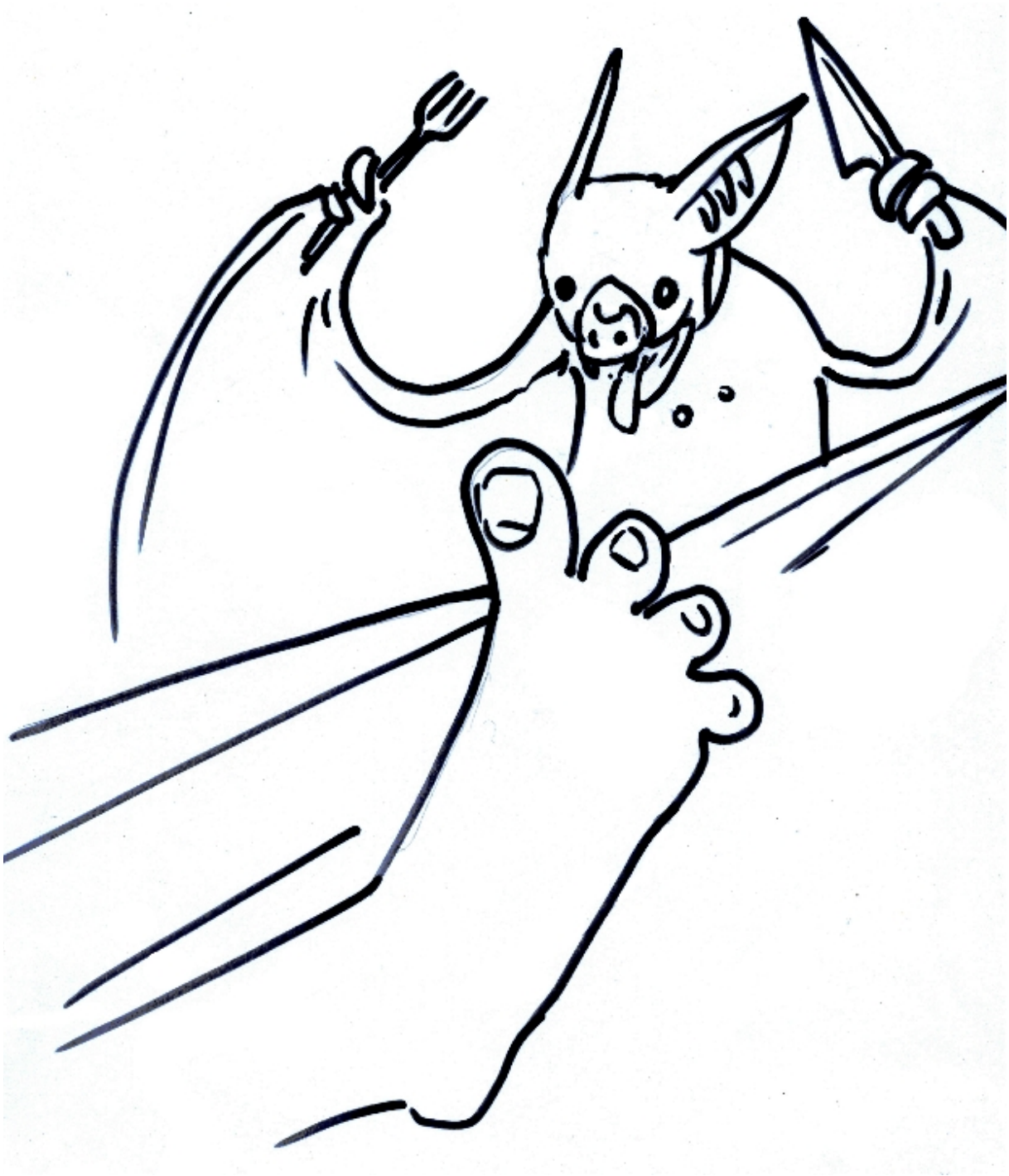
As baixas condições sócio-econômicas, habitacionais e de saúde implicam em fácil acesso dos morcegos aos seres humanos e seus animais domésticos. Nestas condições, as agressões humanas por morcegos hematófagos na região norte do Brasil são frequentes e possivelmente ocorrem há muito tempo. Uieda *et al.* (2002) acreditam que as interações entre seres humanos e morcegos hematófagos estejam ocorrendo principalmente em povoados pequenos e isolados, bem como na periferia de algumas cidades maiores, onde o desmatamento da floresta é mais recente. Casos como este são observados na periferia de Manaus, onde a expansão urbana desordenada acontece nos locais de contato com áreas ainda florestadas. Na zona rural, a introdução de gado é apontada como a principal causa do aumento das populações de *D. rotundus* (Greenhall, 1988). Como consequência do aumento das populações de morcegos hematófagos, verifica-se um aumento da incidência de raiva nos morcegos e posteriormente nos animais domésticos e seres humanos (Lord, 1988). Isso pode explicar a ocorrência dos surtos de raiva no Pará e Maranhão. Schneider *et al.* (1996, 2001) verificaram um grande potencial de infecção rábica humana na região amazônica brasileira e indicaram que o tratamento anti-rábico das pessoas seria o modo mais adequado para a prevenção desta zoonose. Até o momento não foram registrados casos recentes de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos no estado do Amazonas. No entanto, os recentes eventos ocorridos na periferia da Amazônia e a alta frequência de registros de pessoas atacadas por *D. rotundus* na região indicam a potencialidade da ocorrência de novos surtos desta grave zoonose. Medidas de monitoramento e de prevenção devem ser, portanto, tomadas, a fim de se evitar o surgimento de novos surtos com significantes perdas de vidas humanas, como os ocorridos no leste da Amazônia.

– OBJETIVOS –

O hábito alimentar de morcegos hematófagos, em especial de *Desmodus rotundus*, tem sido inferido através de observações das agressões em animais de criação (Delpietro *et al.*, 1992; Uieda, 1992, 1993), registro de pessoas atacadas (Schneider *et al.*, 1996, 2001), dados epidemiológicos da raiva paralítica dos herbívoros, especialmente sobre focos da zoonose em locais remotos (Gonçalves *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2006), e prejuízos econômicos causados no gado (Mayen, 2003). Em comum todos estes estudos estão voltados para questões relacionadas à saúde pública e os riscos que estes morcegos podem causar quando em contato muito próximo com os seres humanos. Observações diretas em condições naturais e em cativeiro são úteis e trazem informações a respeito do comportamento de forrageio dos morcegos (Sazima, 1978; Sazima & Uieda, 1980). Contudo, dados quantitativos das potenciais presas atacadas por *D. rotundus* ainda não foram acessados em condições naturais de campo. Métodos tradicionais que investigam a dieta de morcegos frugívoros e insetívoros não podem ser aplicados em *D. rotundus* pois suas amostras fecais não possuem partes sólidas que possibilitam identificar a espécie do item ingerido.

Este estudo tem como objetivo principal investigar a composição da dieta alimentar do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na Amazônia brasileira. Por meio de análise molecular buscou-se compreender os padrões de utilização de presas por *D. rotundus* em ambientes antrópicos. Os objetivos específicos deste estudo foram:

1) Desenvolver um método molecular com base na técnica de PCR-RFLP para identificação inequívoca das espécies de presas (galinha, boi, porco, cachorro e seres humanos) utilizadas na alimentação do morcego hematófago *D. rotundus*.
2) A partir do desenvolvimento do método molecular de PCR-RFLP para identificação das presas, foi caracterizada a dieta de diferentes populações de *D. rotundus* na Amazônia brasileira. Capturas e coletas de amostras fecais de *D. rotundus* foram realizadas em comunidades ribeirinhas localizadas no médio rio Madeira, rio Aripuanã e no lago Ayapua, rio Purus, Estado do Amazonas. As análises moleculares dessas amostras foram realizadas para identificar as espécies de presas utilizadas, a frequência de consumo de cada presa e a preferência por tipo de presa por *D. rotundus*.

– CAPÍTULO 1 –

Desenvolvimento de método molecular para identificação das presas atacadas pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae)