

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

Setembro, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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-orientador: Dra. Maristerra Rodrigues Lemes

Dissertação 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

Setembro, 2007

Bobrowiec, Paulo Estefano Dineli

Caracterização molecular da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Mammalia: Chiroptera) na Amazônia brasileira –
Manaus: INPA/UFAM,
2007.

xiv, 101 p. ilustr. (algumas coloridas)

Tese de Doutorado - Área de concentração Genética.

1. Genética 2. Morcegos 3. *Desmodus rotundus* 4. Preferência alimentar 5. PCR-RFLP

CDD 19º ed. 595.735

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, com capturas realizadas em comunidades ribeirinhas localizadas na Amazônia brasileira. Os resultados indicaram que *D. rotundus* consome principalmente galinhas e porcos.

Palavras chave:

Morcego hematófago, PCR-RFLP, gene citocromo b, enzimas de restrição, preferência alimentar, 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.

À FAPEAM e ao CNPq pela bolsa de estudos concedida, ao INPA, ao GCBEV pelo apoio logístico que tornaram possível a concretização da tese. Ao Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas (LabGen) do INPA, coordenado por meus orientadores, pelo apoio logístico e financiamento que possibilitaram a realização deste estudo. Agradeço a Anselmo D'Affonseca por disponibilizar o viveiro para a realização dos experimentos com os morcegos em cativeiro. Sou grato ao Instituto Piagaçu pelo suporte financeiro e logístico para as coletas de campo na RDS Piagaçu-Purus, em particular a Dra. Claudia Pereira de Deus, Renato da Silveira e Paulo Piagaçu.

Agradeço à Fundação de Hematologia e Hematoterapia do Amazonas (HEMOAM) pelo apoio em fornecer sangue humano usado na alimentação dos morcegos em cativeiro, em particular a Dr. 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. À Escola Agrotécnica Federal de Manaus por fornece o sangue de porco.

À todos aqueles que passaram pela casa do Tiradentes: Luciana, Karl, Ciro, Fabio Trupico, Milton, Óleo, Wilde, Tatiana, Luciano e Geise.

Também não posso deixar de agradecer as pessoas que gentilmente me auxiliaram em campo: Fabio Trupico, Ângela, Taise, Tatiana, Brian, Wanderval Poraquê, Paulo Piagaçu, Ana.

À turma do LabGen aquele abraço: Mahatma, Thieme, Grabiela, Izabela, Joicy, Rafael Angrizani, Rafael Arruda, Carolina, Raquel, Alessandra e Vanessa.

Agradeço especialmente à Viviane, uma grande pessoa que se instalou em minha vida, além de me mostrar que Nutella é uma das coisas mais deliciosas desse mundo!

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 de *D. rotundus*, o qual mostrou-se eficaz na identificação das cinco espécies de presas (galinha, boi, porco, humano e cachorro) mais atacadas por esta espécie de morcego em comunidades ribeirinhas 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 presas analisadas. O DNA genômico total foi extraído com sucesso das amostras fecais coletadas, bem como de amostras de sangue das presas, as quais serviram como controle no experimento. Foram utilizados marcadores 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 preferência por cada presa utilizada por morcegos hematófagos em condições naturais. 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 seqüenciados 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 *Diaemus youngi*, outra espécie de morcego hematófago na região, 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 have been showed efficient for studies of feeding ecology but this approach fail 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 *D. 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 markers were used for PCR amplification of a mitochondrial *cytrocrome b* gene region (380 bp) using DNA isolated from bat's feces and prey's blood. For the RFLP analysis PCR's 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. 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 natural conditions which allow the precise identification of the prey species of the bats were using for feeding in the Brazilian Amazon. 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 Genbank 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 nature. The analysis showed that chicken was the prey's species most commonly 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 *Diaemus youngi*, another vampire bat species found in the region, 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 nature. 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	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
Métodos empregados na investigação das interações presa-predador.....	1
Uso de técnicas moleculares 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	24
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRESAS ATACADAS PELO MORCEGO HEMATÓFAGO <i>Desmodus rotundus</i> (CHIROPTERA)	
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	28
Captura e manutenção dos morcegos em cativeiro.....	28
Coleta das amostras fecais.....	30
Extração de DNA.....	30
Amplificação do DNA.....	31
Seqüenciamento 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 - Seqüenciamento 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	59
CARACTERIZAÇÃO DA DIETA DO MORCEGO HEMATÓFAGO <i>Desmodus rotundus</i> 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 do lago Ayapua.....	70

Preferência alimentar.....	71
Discussão.....	72
Técnicas para determinação de dieta em morcegos hematófagos.....	72
Ecologia da alimentação de <i>Desmodus rotundus</i>	73
Dieta de <i>Diaemus youngi</i>	77
Seres humanos como fonte de alimento para <i>Desmodus rotundus</i>	78
CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1.	Exemplo de amostras fecal recém coletada do morcego hematófago <i>Desmodus rotundus</i> em condições naturais.....	13
Figura 2.	Indivíduo de <i>Desmodus rotundus</i> 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 <i>et al.</i> 2005.....	15
Figura 4.	Número de casos registrados de raiva humanos no Brasil entre 1986 e 2006. A) número total de casos transmitidos; B) número total de casos transmitidos pelos três principais animais; C) distribuição dos casos de raiva humana nas cinco regiões brasileiras. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (2007).....	19

CAPÍTULO 1.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO MOLECULAR PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRESAS ATACADAS PELO MORCEGO HEMATÓFAGO *Desmodus rotundus* (CHIROPTERA)

Figura 1.	Local de captura dos morcegos na Fazenda Experimental da UFAM. a) rede <i>mist-nets</i> armada entre as cocheiras dos porcos; b) morcego <i>Desmodus rotundus</i> capturado quando se aproximava para atacar os porcos.....	49
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.....	49
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 <i>D. rotundus</i> alimentando-se de sangue de boi oferecido em bebedouro.....	50
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 <i>D. rotundus</i> 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.....	51
Figura 5.	Fragmento do gene <i>cyt-b</i> (~380 pb) amplificado a partir de DNA obtido de amostras de sangue de cinco espécies de presas e do morcego hematófago <i>D. rotundus</i> . Colunas 1-2: galinha; Colunas 3-4: boi; Colunas 5-6: porco; Colunas 7-8: humano; Colunas 9-10: cachorro; Colunas 11-12: <i>D. rotundus</i>	52
Figura 6.	Fluxograma mostrando a seqüência 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 <i>Desmodus rotundus</i> na Amazônia brasileira, bem como para a identificação do próprio morcego.....	53
Figura 7.	Perfis de restrição obtidos após a clivagem de produtos amplificados do gene <i>cyt-b</i> (~380 pb) com a enzima <i>Hae</i> III, para cinco espécies de presas de <i>D. rotundus</i> . Cada painel mostra o padrão de clivagem do DNA obtido do sangue de seis amostras/presa.....	54

Figura 8.	Comparação dos perfis de restrição obtidos após a clivagem de fragmento amplificado do gene <i>cyt-b</i> com cinco enzimas de restrição (<i>Hae</i> III, <i>Rsa</i> I, <i>Bmg</i> BI, <i>Xho</i> I e <i>Taq</i> I) de amostras de sangue visando diferenciar as espécies de presas de <i>D. rotundus</i> . Colunas 1-2: galinha; Colunas 3-4: boi; Colunas 5-6: porco; Colunas 7-8: humano; Colunas 9-10: cachorro; Colunas 11-12: <i>D. rotundus</i> . M: marcador de 50 pb.....	55
Figura 9.	Padrões de clivagem do DNA pelas enzimas <i>Rsa</i> I, <i>Bmg</i> BI, <i>Taq</i> I e <i>Xho</i> I para seis amostras obtidas de sangue de cinco espécies de presas de <i>D. rotundus</i> . M: marcador de 50 pb.....	56
Figura 10.	Fragmento amplificado do gene <i>cyt-b</i> (~380 pb) a partir de DNA extraído de amostras de fezes de <i>D. rotundus</i> , 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.....	56
Figura 11.	Perfis de restrição obtidos após clivagem de fragmento amplificado de gene <i>cyt-b</i> pela enzima <i>Hae</i> III, a partir de DNA obtido das fezes de <i>D. rotundus</i> (colunas 1-10) e de amostras do sangue das presas (colunas 11-12). M: marcador ladder 50 pb.....	57
Figura 12.	Perfis de restrição obtidos após clivagem de fragmento amplificado de gene <i>cyt-b</i> pelas enzimas <i>Rsa</i> I, <i>Bmg</i> BI, <i>Taq</i> I e <i>Xho</i> , a partir de DNA obtido das fezes de <i>D. rotundus</i> (colunas 1-10) e de amostras do sangue das presas (colunas 11-12). M: marcador ladder 50 pb.....	58

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 e redes 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 <i>D. rotundus</i> . a-b) cachorros com sinal de sangramento nas costas provocado pelo ataque do morcego <i>D. rotundus</i> enquanto estas presas dormiam na comunidade Bacuri, lago Ayapuá; b) porco sangrando no focinho provocado pelo ataque de <i>D. rotundus</i> , enquanto dormiam em uma pocilga contraída sob o assoalho de uma casa da comunidade Itapinima, rio Madeira; d) filhote de porco mordido na orelha e pata dianteira direita por <i>D. rotundus</i> na comunidade Caviana, lago Ayapuá.....	85
Figura 4.	Morcegos <i>Diaemus youngi</i> e <i>Desmodus rotundus</i> alimentando-se de animais de criação e fezes encontradas sob um abrigo noturno. a) <i>Diaemus youngi</i> ao atacar uma galinha na comunidade Pinheiros, lago Ayapuá; b) <i>Desmodus rotundus</i> 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 <i>D. rotundus</i> dentro de uma pocilga enquanto se alimentava na comunidade caviana, lago Ayapuá; d) fezes de <i>D. rotundus</i> 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 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)

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 <i>cyt-b</i> (~360 pb), de diferentes espécies de presas e de <i>D. rotundus</i> , com base no programa NEB Cutter v.2.0.....	46
Tabela 2.	Espécies de mamíferos silvestres potencialmente atacados por <i>D. rotundus</i> na Amazônia brasileira e identificação dos sítios de clivagem das cinco enzimas selecionadas, com base na análise de seqüências da região do gene <i>cyt-b</i> depositadas no GenBank.....	47
Tabela 3.	Espécies de aves silvestres potencialmente atacadas por <i>D. rotundus</i> na Amazônia brasileira e identificação dos sítios de clivagem das cinco enzimas usadas, com base na análise de seqüências da região do gene <i>cyt-b</i> depositadas no GenBank.....	48

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 <i>Desmodus rotundus</i> e <i>Diaemus youngi</i> . O número ao lado do nome de cada comunidade representa sua posição no mapa da Figura 1.....	81
Tabela 2.	Dados de captura dos morcegos hematófagos, número de amostras fecais coletadas, ampliações 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 <i>Diaemu youngi</i> 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).....	83

– INTRODUÇÃO GERAL –

Métodos empregados na investigação das interações presa-predador

As diversas interações que fazem parte de um sistema mais complexo da cadeia alimentar podem ser caracterizadas como as 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 (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. Entretanto, é difícil obter dados seguros 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 parte moles podem até não ser representadas. Em outras situações, a coleta de amostras necessita da captura do indivíduo, inviabilizando estudos em espécies de animais ameaçados (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 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 análises mais detalhadas 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; Garipey *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 de ser pouco útil na análise da dieta de predadores generalistas que se alimentam de múltiplas espécies de presas (Symondson, 2002). O imunoenensaio mais freqüente usado é o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, em inglês), o qual 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 e os potenciais erros em detectar predação secundária (Sheppard & Haewood, 2005). Por isso, poucos estudos saem do laboratório para avaliar eventos de depredação em condições naturais e a maioria tem focado sobre interações presa-predador em invertebrados terrestres (Sheppard & Haewood, 2005).

Além de 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 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 parnelli* (Gray, 1843) e *Antrozous pallidus* (Le Conte, 1856) (Fleming *et al.*, 1993; Herrera *et al.*, 1993; 2001a, 2001b, 2002). Em geral, os resultados mostram que frutos constituem o principal recurso protéico durante o ano tanto para morcegos frugívoros quanto nectarívoros. Em *Antrozous pallidus* (Vespertilionidae), uma substancial quantidade de carbono é obtida de espécies 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 C₄, enquanto mamíferos selvagens ingerem plantas C₃ (Voigt & Kelm, 2006). A análise da seleção de presas indicou que *D. rotundus* prefere se alimentar de gado, como demonstrado pela semelhança na proporção de C₄ 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 C₃ 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 moleculares 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 no 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, em inglês). Entretanto, este tipo de coleta muitas vezes não é possível e admissível em estudos com vertebrados, especialmente nos 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 freqüentemente 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 codificadora que contém o controle da replicação e transcrição do genoma mitocondrial) foi amplificada, clonada e seqüenciada 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 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 marcadores 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* Förster, 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 fragmento de 188 pb da região COI (Cytochrome Oxidase subunit I, em inglês) 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 freqüentemente 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 seqüenciados 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 pingüins 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 Bilatéria, filo Cordata e subordem Nototheniidei. O produto de PCR foi clonado e seqüenciado para comparação com seqüências 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 onça* (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 seqüenciado. Os fragmentos de DNA gerados foram comparados com o padrão das

seqüências 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 seqüenciamento 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 seqüenciamento de um fragmento de 146 pb do citocromo b e comparação com seqüências 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 seqüenciamento, pois seus resultados são alcançados pela amplificação da espécie alvo, enquanto que os altos custos do seqüenciamento 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 seqüenciado.

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, em inglês). 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 seqüência 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 conseqüentemente 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 pública. 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 de origem bovina contaminado (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 análise por PCR-RFLP é necessário o uso de marcadores 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 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 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 baixa taxa de mutação e o uso de fragmentos curtos do citocromo b limita ainda mais possíveis 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 porco de guiné 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 a 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). Microsatélites 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 poderem ser utilizados para discriminar várias espécies de hospedeiros ou presas, mesmo quando são filogeneticamente 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 entre aves (Carter *et al.*, 2006).

Devido a 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 (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, a taxa de uso das diferentes presas, a preferência alimentar dos recursos alimentares 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 amostras 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* foi incluída no gênero *Desmodus* por Handley (1976) e Honacki *et al.*, (1982), mas Koopman (1988, 1993) concluiu que *Diaemus* representa 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 no México e nas Américas Central e do Sul. Na América do Sul, sua distribuição limite sul se estende até a costa do Chile (Pacífico), Argentina central e a costa do Uruguai (Atlântico) (Figura 1). 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). 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).

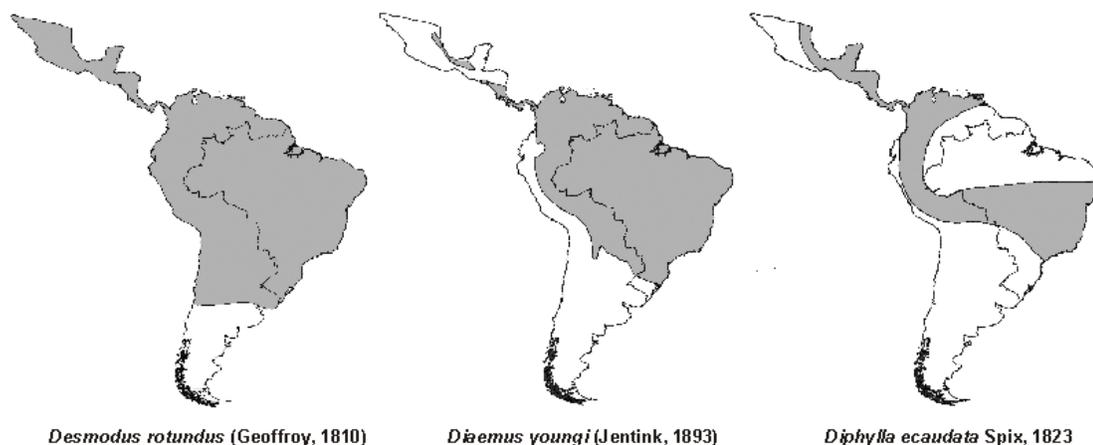


Figura 3. Distribuição das três espécies de morcegos hematófagos pela América Latina. Mapa reproduzido de Patterson *et al.*, 2005.

Comportamento alimentar dos morcegos hematófagos

Os estudos sobre a biologia de morcegos hematófagos iniciaram-se na década de 60, principalmente com a espécie *D. rotundus* ao atacar gado, sendo considerada a principal transmissora da raiva a esses animais na América Latina (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, 1982, 1992, 1993; Sazima & Uieda, 1980), quanto em condições de cativeiro (Crespo *et al.*, 1971, 1972; Greenhall, 1972; Schmidt & Greenhall, 1972; Uieda, 1994; 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 *Diphylla 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 a *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 uma fonte alternativa 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 selvagens 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, essas espécies de hematófagos foram pouco estudadas quanto ao comportamento alimentar e os impactos econômicos por eles causados à criação de aves não são conhecidos.

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 freqüentemente 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.

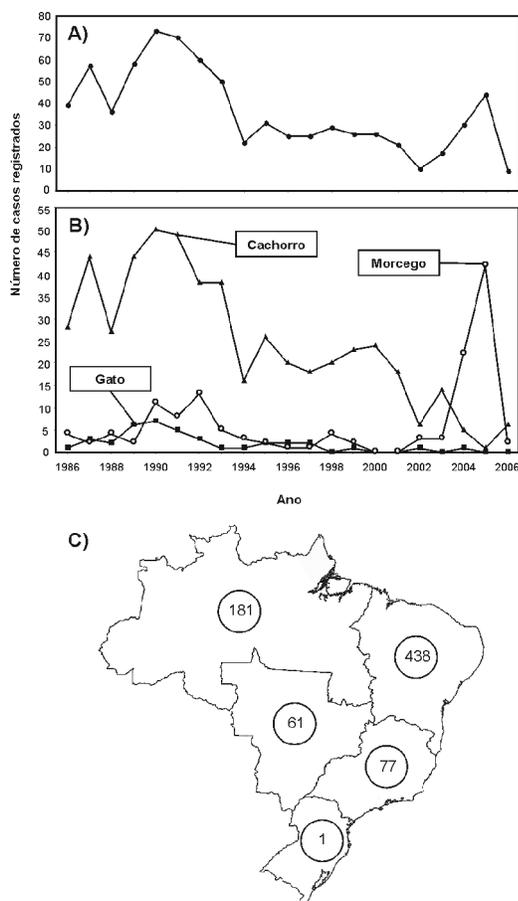


Figura 4. Número de casos registrados de raiva humanos no Brasil entre 1986 e 2006. a) número total de casos transmitidos; b) número total de casos transmitidos pelos três principais animais; c) distribuição dos casos de raiva humana nas cinco regiões brasileiras. Dados da Secretaria de Vigilância em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

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 cólera incluiu o extermínio dos porcos, 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).

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 freqüentes 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 é observado 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 bovino 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 recentemente 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. 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*. Análises por PCR-RFLP foram realizadas utilizando o DNA extraído de amostras de sangue das cinco espécies de presas com o intuito de buscar diferentes padrões de tamanho de fragmentos clivados pelas enzimas para cada espécie, o qual permita discriminar as presas. Após os testes com sangue, este método foi validado usando amostras fecais do morcego *D. rotundus* alimentado com sangue destas cinco presas em cativeiro.
- 2) A partir do desenvolvimento do método molecular de PCR-RFLP para identificação das presas, este estudo teve como propósito caracterizar 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. 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)

Título de cabeçalho: PCR-RFLP para identificação das presas de morcegos vampiros

Palavras chave: Amazônia, citocromo b, enzimas de restrição, identificação molecular, PCR-RFLP

Autores: Paulo Estefano D. Bobrowiec^{1,2}, Maristerra R. Lemes² e Rogério Gribel²

¹Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, ²Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Manaus, AM, 69083-000, Brasil

e-mail: pauloedb@inpa.gov.br, pauloedb@yahoo.com

INTRODUÇÃO

As interações entre presa-predador e seu papel na dinâmica dos ecossistemas em que vivem tem sido o objeto de diversos estudos sobre ecologia animal (Jones & Rydell, 2003). Da mesma forma, as relações entre parasita-hospedeiro vem chamando bastante atenção quando adquire grande relevância epidemiológica (Brass, 1994; Messenger *et al.*, 2003). Muitos dos predadores são vetores de doenças tropicais como a malária e a raiva parálitica dos herbívoros transmitida por morcegos (Dye, 1990; Brass, 1994). O desequilíbrio ambiental tem sido apontado como o principal responsável para o aumento da disseminação dessas doenças, pois provoca alterações populacionais e comportamentais nas relações entre presas e predadores. Em 2004 e 2005, foi registrado o maior surto de raiva humana ocorrido no Brasil transmitida por morcegos hematófagos. Tal evento teve repercussão internacional, sendo considerado o maior do mundo ocorrido em tão pouco tempo (um mês) (Rosa *et al.*, 2006).

Análises detalhadas da dieta animal são fundamentais para estimar as taxas de predação e preferência alimentar. Restrições metodológicas têm limitado o conhecimento sobre a ecologia alimentar dos predadores. Métodos tradicionais amplamente usados para avaliar a dieta de morcegos são baseados na visualização dos restos de animais e sementes encontrados nas amostras fecais. Entretanto, a mastigação e digestão podem dificultar a identificação dos itens ingeridos. Insetos menores e com exoesqueleto mole são mais triturados pela mastigação e podem ser subestimados na análise da dieta de morcegos insetívoros (Whitaker, 1988; Kalka & Kalko, 2006). Além disso, presas que não possuem exoesqueleto, como lagartas, por exemplo, dificilmente são amostradas (Whitaker, 1988). No caso de animais fugívoros, muitos frutos têm somente a polpa ingerida (Thomas, 1988) ou as sementes são totalmente destruídas (Nogueira & Peracchi, 2003), impossibilitando a identificação precisa. Esses métodos tradicionais de análise da dieta não podem ser aplicados satisfatoriamente em morcegos hematófagos devido sua alimentação ser composta exclusivamente de sangue.

A quantificação dos ataques de morcegos hematófagos em geral é feita por meio de sinais de sangramento nas presas, como no dorso do gado e nas patas de galinhas, ou pelo registro de animais mortos. Esses sinais podem ser pouco visíveis e desaparecem facilmente em períodos chuvosos ou são facilmente encobertos por sujeira e nas galinhas pelas suas penas. A utilização de métodos alternativos para verificação da composição da dieta em morcegos hematófagos como por exemplo isótopos estáveis são menos específicos e não

apresentam uma resolução taxonômica e quantitativa dos itens ingeridos (Herrera *et al.*, 2002; Voigt & Kelm, 2006).

Nas últimas duas décadas, avanços na biologia molecular têm permitido empregar técnicas baseadas no DNA presente nas fezes para acessar a identidade tanto do predador quanto das presas em estudos de distribuição geográfica, estrutura populacional e dieta (Farrell *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003; Dallas *et al.*, 2003). Análises via reação em cadeia da polimerase (PCR) permitem amplificar fragmentos de DNA mesmo pequenos, gerados em função da passagem do alimento pelo trato digestivo dos predadores (Symondson, 2002; Sheppard *et al.*, 2005). Assim, métodos moleculares com base na análise de DNA têm tornado as amostras fecais um valioso recurso para análise de hábitos alimentares e da interação predador-presa (Zaidi *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2001; Agustí *et al.*, 2005). A coleta de material não invasivo também evita os riscos de lesões causados durante a captura do animal, especialmente os ameaçados (Kohn & Wayne, 1997; Hung *et al.*, 2004).

Diversos marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos sobre a identificação das presas do conteúdo estomacal do predador, principalmente em estudos sobre a dieta de invertebrados terrestres (Agustí *et al.*, 2005; Juen & Traugott, 2007; Garipey *et al.*, 2007). Dentre os métodos moleculares disponíveis destaca-se a técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase e Análise de Polimorfismo em Fragmentos de Restrição), que consiste na amplificação via PCR de uma região específica do genoma e subsequente clivagem do fragmento de DNA amplificado por enzimas de restrição (Dowling *et al.*, 1990; Arias & Infante-Malachias, 2001). Este é considerado um método rápido, preciso e econômico para a diferenciação de espécies (Evans *et al.*, 1998; Wagener *et al.*, 2004; Oshaghi *et al.*, 2006). Sua aplicação também tem sido amplamente empregada em análise forense, como por exemplo, na autenticação de produtos alimentares de origem animal como carnes e peixes (Russel *et al.*, 2000; Partis *et al.*, 2000; Bellagamba *et al.*, 2001). Em estudos de entomologia aplicada, PCR-RFLP pode identificar os potenciais reservatórios de doenças usados por insetos hematófagos (Steuber *et al.*, 2005; Oshaghi *et al.*, 2006) e a contribuição de insetos no controle de pragas (Wagener *et al.*, 2004). Outra aplicação desta técnica relaciona-se a estudos de caracterização populacional, possibilitando distinguir espécies distribuídas em grandes áreas (Evans *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2003).

Até o presente, nenhuma técnica molecular foi desenvolvida para estudos da ecologia alimentar de morcegos. Apesar do hábito alimentar dos morcegos hematófagos e sua importância na transmissão da raiva, pouco se conhece a respeito da dieta desses morcegos em condições naturais.

Neste estudo foi desenvolvido um método para identificar as espécies de presas atacadas pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* utilizando-se a técnica PCR-RFLP. Os objetivos específicos do estudo consistiram em: (1) Desenvolver método molecular com base na técnica PCR-RFLP para identificação inequívoca das cinco espécies de presas (galinha, boi, porco, cachorro e seres humanos) preferencialmente atacadas por *D. rotundus* em comunidades do interior da Amazônia brasileira, utilizando-se inicialmente DNA extraído de amostras de sangue destas espécies; (2) Validar experimentalmente o método desenvolvido utilizando como fonte de DNA, amostras fecais coletadas de indivíduos de *D. rotundus* mantidos em cativeiro e alimentados com sangue das cinco espécies de presas testadas, de forma a disponibilizar um método não-invasivo e eficiente para a identificação e diferenciação dos recursos alimentares utilizados por *D. rotundus* em condições naturais. Espera-se que os resultados alcançados tenham aplicação em programas de controle de morcegos hematófagos e contribuam para estudos sobre a ecologia alimentar desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Captura e manutenção dos morcegos em cativeiro

Indivíduos de ambos os sexos de *D. rotundus* foram capturados com redes *mist-net* junto à pocilga da Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas e transportados para o cativeiro no dia seguinte (Figuras 1a e 1b). As gaiolas foram construídas nas dimensões de 0,6 x 0,6 x 1,0 m, com armação de ferro galvanizado e tela de arame ½ polegada, na qual um dos lados foi colocado uma placa de vidro de 6 mm transparente para melhor observação do comportamento dos animais. As gaiolas foram mantidas dentro de um viveiro de 2,0 x 2,0 x 2,0 m cercado com tela, em um local de mata sombreado no Bosque da Ciência do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, longe do trânsito de pessoas (Figura 2a). O viveiro foi construído de modo a proteger os morcegos contra a entrada de predadores como gatos e mucuras.

Para diminuir o estresse causado aos morcegos pela condição de cativeiro, um importante fator considerado foi o isolamento dos animais de forma a permitir o mínimo de contato visual possível com pessoas em movimento dentro do viveiro. Para isso, dois lados e o terço superior das gaiolas foram revestidos com lona preta (Figura 2b) e dentro de cada gaiola foi colocado uma pequena caixa de madeira para servir de dormitório para o morcego (Figura 2c). Os morcegos permaneceram dentro dos dormitórios durante o dia todo e parte da noite, quando não estavam se alimentando, provavelmente por ser o local mais protegido da gaiola (Figura 2d). O chão do viveiro foi umedecido durante os períodos mais secos. Os morcegos foram mantidos individualmente por gaiola evitando, dessa forma, a mistura e contaminação de amostras fecais entre indivíduos (Figura 2d). Visando facilitar a adaptação dos morcegos às condições de cativeiro, durante os primeiros três dias de cativeiro os mesmos foram alimentados diretamente de galinhas vivas, colocadas dentro das gaiolas (Figura 3a).

Para a realização dos experimentos os morcegos foram alimentados com sangue humano, de animais domésticos e de criação, com base em informações sobre espécies preferencialmente atacadas por *D. rotundus* em comunidades ribeirinhas na região Amazônica, por ordem: galinha (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758), cachorro (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758), homem (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758), porco (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) e boi (*Bos taurus* Linnaeus, 1758) (W. Uieda, comunicação pessoal).

O sangue de boi foi coletado de animais abatidos em matadouros legalizados situados na região de Manaus, AM. O sangue de porcos foi coletado de animais, previamente anestesiados, mantidos na Escola Agrotécnica Federal de Manaus, AM. A coleta do sangue de cachorro ocorreu em cooperação com o Centro de Controle de Zoonoses de Manaus, que fez a captura dos animais. Os cachorros (três indivíduos) foram transferidos para uma clínica veterinária e anestesiados para a retirada do sangue. Após a coleta os animais foram sacrificados. O sangue humano foi obtido na Fundação de Hematologia e Hematoterapia do Amazonas (HEMOAM) em Manaus, através de um acordo de cooperação científica (Protocolo número 1059) firmado entre a Fundação HEMOAM e o INPA para o projeto em questão. Por questões éticas, informações sobre os doadores não foram fornecidas. Para alimentação dos morcegos com sangue de galinha foram disponibilizados animais vivos, as quais foram mantidas dentro das gaiolas. Desta forma os morcegos puderam alimentar-se atacando diretamente as presas no cativeiro (Figura 3a).

A forma de armazenamento do sangue coletado variou para as diferentes presas analisadas. O sangue de boi foi misturado com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético; uso: 12 ml de EDTA por litro de sangue) durante a coleta, armazenado em cubas de gelo e congelado em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para não perder suas propriedades nutricionais, o sangue ficou congelado por no máximo duas semanas, quando então era descartado e repostado por sangue novo. As amostras de sangue coletadas de porco, humano e cachorro foram armazenadas em bolsas de coleta de sangue humano fornecidas pelo HEMOAM. Cada bolsa conteve o anticoagulante CPDA1 (citrato fosfato dextrose adenina1; uso: 0,14 ml de CPDA1 por mililitro de sangue) e foram armazenadas em geladeira a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os anticoagulantes utilizados no armazenamento das amostras de sangue, a princípio, não influenciaram no comportamento alimentar dos morcegos, os quais alimentaram-se normalmente de todos os tipos de sangue oferecido.

Os morcegos foram alimentados diariamente por volta das 19:00 h, com 30 ml de sangue de uma única espécie de presa colocado em bebedouros para beija-flor (Figuras 3b e 3d). As amostras de sangue congelado, utilizadas para alimentação dos morcegos, eram retiradas diariamente do freezer e mantidas a temperatura ambiente por uma hora para o completo descongelamento antes de serem oferecidas aos animais.

Coleta das amostras fecais

Durante dez dias, cada morcego em cativeiro foi alimentado com o sangue de um único tipo de presa, visando obter conteúdo específico da dieta nas fezes. Como os morcegos permaneciam grande parte do tempo dentro da caixa de madeira, um coletor de fezes foi colocado abaixo desse abrigo (Figura 3c), garantindo a coleta das amostras de fezes por dia de alimentação. Os coletores foram revestidos com lona esterilizada em álcool a qual era trocada diariamente. As gaiolas eram checadas rotineiramente no dia seguinte após a alimentação, para a coleta das fezes.

As amostras de fezes provenientes de um único morcego, resultantes de uma sessão diária de alimentação, eram coletadas e acondicionadas em um microtubo tipo eppendorf de 2 ml contendo sílica gel. Após as coletas os tubos contendo as fezes foram imediatamente congelados em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nos casos em que as fezes estavam aquosas e/ou misturadas com urina dos morcegos, um papel de filtro descartável foi usado para absorção do líquido, antes de serem acondicionadas nos tubos.

Visando detectar possíveis variações individuais com relação à ação do trato digestivo do morcego na qualidade do DNA, foram utilizados cinco indivíduos de *D. rotundus* no experimento, para cada tipo de sangue de presa testada. Considerou-se como unidade amostral, o conjunto de todas as fezes encontradas no coletor de cada morcego, por dia de alimentação (Figura 3c). Somente após três dias de alimentação com o sangue de um único tipo de presa, as amostras começaram a ser coletadas para as análises, procurando evitar a possibilidade de mistura de sangue de diferentes espécies de presas no trato digestivo do morcego.

Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído das amostras fecais (n=190 amostras) dos morcegos mantidos em cativeiro e de amostras de sangue (n=6 por espécie) das mesmas espécies de presas utilizadas para alimentar os morcegos. Para a extração do DNA utilizou-se o método de Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações. Foram utilizadas entre 30 e 90 mg de fezes ou 150 μl de sangue, nos quais acrescentou-se 500 μl de tampão de extração CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 0,02 M, Tris-HCl 0,1 mM, pH8,0) com proteinase K (10 mg/ml). Em seguida as amostras foram maceradas em um disruptor de células (Fast Prep FP120, Thermo) por 20 seg.

Após a maceração, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C por 30 min. O material foi misturado com 1 ml de clorofórmio e centrifugado por 10 min a 13000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, misturada com 750 µl de isopropanol frio e colocada a -20 °C por uma hora para a precipitação do DNA. Após centrifugação por 30 min a 13000 rpm o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e novamente centrifugado por 20 min a 13000 rpm. O DNA precipitado foi seco, ressuscitado em 50 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0) com RNase (10 µg/ml) e incubado em banho-maria por 30 min. As amostras de DNA extraído foram armazenadas em freezer a -20 °C.

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foram feitas por comparação com padrões de peso molecular conhecido (fago Lambda, Invitrogen), por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, em tampão 1X de TBE (Tris 1mM, ácido bórico 1 mM, EDTA 20 mM, MgCl₂, H₂O) a 100 V. Posteriormente o gel foi visualizado em um transluminador sob luz ultra-violeta (TFX-20.M Vilber Loumat) e fotodocumentado.

Amplificação do DNA

Para a amplificação do DNA extraído, tanto das fezes dos morcegos quanto do sangue das presas, foi utilizado um par de *primers* que amplifica uma região do gene mitocondrial citocromo b (*cyt-b* daqui por diante) de diversas espécies de mamíferos (Kocher *et al.*, 1989). Os *primers* usados na PCR foram o L14841 (forward 5'- AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA -3') e o H15149 (reverse 5'- AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A -3'). Estes *primers* amplificam fragmentos de DNA de tamanho pequeno, com aproximadamente 360 pb, possibilitando seu uso a partir de DNA possivelmente degradado na passagem pelo trato digestivo do morcego (Farrell *et al.*, 2000; Oshaghi *et al.*, 2006).

As amplificações do DNA foram feitas via reação em cadeia da polimerase (PCR) em volume final de 20 µl contendo tampão IO 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,4, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 50 mM MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 2,5 ng/µl de soro-albumina bovina (BSA), 2 mM de cada *primer* (fabricante), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Biotecnologia) e 5,0 ng de DNA. A reação de PCR foi realizada em um termociclador PTC-200 (MJ Research) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, 30 ciclos com os passos (1) 45 segs a 92 °C, (2) anelamento a 56 °C por 30 segs, (3) extensão a 72 °C por 1:30 min, e uma

etapa final de extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, sob luz ultravioleta, após eletroforese a 80 V. Os produtos amplificados foram quantificados utilizando marcador ladder 1 Kb plus, (Invitrogen). Controles positivo, contendo DNA extraído do sangue das presas testadas, e negativo (água destilada no lugar do DNA) foram incluídos em cada sessão de amplificação das amostras de fezes.

Seqüenciamento do DNA do sangue das presas e das fezes dos morcegos

Buscando confirmar a origem do DNA amplificado, se das presas ou eventualmente de *D. rotundus*, uma vez que as amostras de fezes coletadas poderiam conter também tecido do trato digestivo do morcego, foi realizado o seqüenciamento direto dos produtos da PCR. Para isto foram seqüenciados fragmentos amplificados a partir do DNA obtido de duas amostras de sangue de cada espécie de presa analisada, bem como de duas amostras de fezes dos morcegos que foram previamente alimentados com sangue de cada espécie de presa, conforme descrito anteriormente.

Os produtos da PCR foram purificados por meio da ação das enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase utilizando o Kit ExoSAP-IT (USB Cooperation) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, a reação de seqüenciamento foi preparada em um volume final de 10 µl contendo 1,5 µl de um dos *primers* na concentração 2 mM, 2 µl de Big Dye III (Applied Biosystems), 2 µL de tampão 5X para seqüenciamento (Applied Biosystems), 2 µl de PCR purificado e 2,5 µl de água ultra-pura. Em seguida as reações de seqüenciamento foram purificadas utilizando-se solução de acetato de sódio e EDTA (1,5M acetato de sódio, 250 mM EDTA, pH > 8,0) e etanol a 95% e 70%.

Após a secagem, os produtos contendo a reação de seqüenciamento foram re-suspendidos em tampão de carregamento composto por quatro partes de formamida para uma parte de azul dextran, desnaturados a 95 °C por 2 min e analisados sob eletroforese em gel de poliacrilamida 5% em um Seqüenciador Automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems). Os produtos da PCR foram seqüenciados nos dois sentidos *forward* e *reverse*.

As seqüências foram editadas manualmente no programa ChromasPro versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd). Após edição, as seqüências obtidas nos dois sentidos, *forward* e *reverse*, foram alinhadas de forma a obter a seqüência consenso. Para tal utilizou-se o programa BioEdit versão 7.0.5.3 (Hall 1999). Dessa forma as seqüências consenso obtidas das amostras analisadas foram comparados com seqüências do gene *cyt-b*, de diferentes espécies

de vertebrados, disponíveis no banco de dados do National Centre of Biotechnology Information (NCBI) utilizando-se a ferramenta BLAST (nucleotide BLAST). Dessa forma foi possível determinar a identificação específica do DNA presente tanto nas amostras de sangue quanto das fezes.

Análise PCR-RFLP - Identificação prévia dos sítios de clivagem e escolha das enzimas de restrição

A partir da análise das seqüências dos fragmentos de DNA (~360 pb) obtidos de amostras do sangue das presas e do morcego, procedeu-se à identificação e localização dos sítios de restrição reconhecidos por diferentes enzimas. Tal análise foi realizada utilizando-se o programa NEB Cutter versão 2.0 (Vincze *et al.*, 2003). O programa permitiu selecionar enzimas de restrição capazes de diferenciar as cinco espécies de presas, bem como *D. rotundus* da seguinte forma: (1) Inicialmente foi escolhida uma única enzima que clivasse o DNA das espécies de modo a formar grupos diferenciados com base nos tamanhos dos fragmentos gerados pela restrição; (2) Em uma segunda etapa procedeu-se à escolha de enzimas capazes de distinguir fragmentos específicos diferenciando assim cada uma das cinco espécies de presas e do morcego (*D. rotundus*).

Com o intuito de averiguar a possibilidade das enzimas de restrição selecionadas clivarem o DNA de animais selvagens em um padrão semelhante ao observado nas cinco espécies de presas domésticas testadas, seqüências do DNA de diversas espécies de mamíferos e aves selvagens, possivelmente atacadas por *D. rotundus* em condições naturais, foram checadas quanto ao padrão do tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas selecionadas. Para isto, seqüências homólogas do *cyt-b* desses animais selvagens depositadas no GenBank foram usadas no programa NEB Cutter v2.0 e o tamanho dos fragmentos clivados pelas enzimas selecionadas foi estimado. Os perfis de restrição gerados nessa simulação foram então comparados com os fragmentos observados para as cinco espécies domésticas testadas.

Análise PCR- RFLP – Protocolo

A digestão dos produtos de PCR foi preparada em um volume final de 10 ou 13 µl, combinando cinco ou nove µl de produto de PCR, dependendo da quantidade do produto

amplificado, 10U de enzima e 2 µl do tampão de digestão 10X fornecido pelo fabricante. Com base na análise dos sítios de clivagem descrita na seção anterior foram selecionadas cinco enzimas de restrição para o estudo: *Hae* III (isolado da bactéria *Haemophilus aegypticus*), *Rsa* I (isolado da bactéria *Rhodopseudomonas sphaeroides*), *Xho* I (isolado da bactéria *Xanthomonas campestris*), *Bmg* BI (isolado da bactéria *Bacillus megaterium*) e *Taq* I (isolado da bactéria *Termus aquaticus*). As reações de digestão foram incubadas por 4 h a 37 °C para as enzimas *Hae* III, *Rsa* I, *Xho* I e *Bmg* BI e 65 °C para *Taq* I de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen). A verificação da clivagem foi feita em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio sob eletroforese (tampão TBE 1X) a 60 V e posterior visualização em transiluminador sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos oriundos da digestão foram estimados utilizando-se marcador ladder 50 pb (GibcoBRL).

Para averiguar a qualidade e especificidade do processo de clivagem, os tamanhos dos fragmentos gerados a partir da ação das enzimas de restrição, tanto dos produtos amplificados do DNA das amostras de sangue quanto do DNA das fezes, foram comparados aos dos fragmentos estimados a partir da análise das amostras seqüenciadas feita no programa NEB Cutter v2.0.

RESULTADOS

Extração e amplificação do DNA

O protocolo CTAB modificado utilizado no presente estudo mostrou-se eficiente na extração de DNA tanto de amostras de sangue das presas quanto das fezes de *D. rotundus*. A figura 4 mostra géis de quantificação do DNA extraído de ambas amostras (sangue e fezes) os quais evidenciam a boa qualidade e quantidade do DNA extraído.

A amplificação do DNA extraído das amostras de sangue das presas possibilitou acessar, para as cinco espécies analisadas, um fragmento de aproximadamente 380 pb, utilizando o mesmo par de *primers* que amplifica região do gene *cyt-b* do DNA mitocondrial de vertebrados. Um fragmento adicional de aproximadamente 600 pb foi amplificado do DNA de sangue de cachorro (Figura 5).

Análise dos fragmentos amplificados - Seqüenciamento do DNA

O tamanho dos fragmentos seqüenciados variou de 340 pb em galinha a 352 pb em porco. A análise das seqüências da região do gene *cyt-b*, obtidas a partir de DNA extraído tanto de amostras de sangue das presas como das fezes dos morcegos, mostrou total semelhança (100% de sobreposição) com as seqüências correspondentes a esta mesma região do genoma mitocondrial para as espécies de presas analisadas, com base nos dados disponíveis no banco de dados do GenBank. Ou seja, houve total correspondência em relação às seqüências obtidas de cada espécie de presas, com as seqüências dessas espécies depositadas no GenBank. A análise das seqüências obtidas dos fragmentos amplificados a partir do DNA obtido das fezes não evidenciou qualquer semelhança com as seqüências disponíveis no GeneBank do morcego *D. rotundus*, eliminando dessa forma qualquer possibilidade de co-amplificação do DNA das presas e do morcego, oriundo das fezes.

Análise PCR-RFLP a partir do DNA obtido de amostras de sangue

A análise das seqüências da região do *cyt-b* (~360 pb), disponíveis no banco de dados do GenBank, para as cinco espécies de presas possibilitou localizar os sítios de clivagem das enzimas e estimar os tamanhos esperados dos fragmentos por meio do programa NEB Cutter

v2.0. No total foram selecionadas cinco enzimas de restrição (*Hae* III, *Rsa* I, *Xho* I, *Bmg* BI e *Taq* I), as quais, em combinação, possibilitaram distinguir as cinco espécies de presas utilizadas por *D. rotundus* na Amazônia brasileira, bem como o próprio morcego, considerando-se os padrões de clivagem da região analisada do gene *cyt-b*. A tabela 1 mostra os sítios de clivagem das enzimas selecionadas e os tamanhos esperados dos fragmentos com base na ação das enzimas para a região analisada do gene *cyt-b* de cada espécie de presa.

A enzima *Hae* III foi a enzima escolhida para utilização inicial uma vez que ela cliva o fragmento amplificado (~360 pb) de todas as presas, bem como de *D. rotundus*. As outras enzimas utilizadas foram: *Rsa* I (sítio de corte específico para galinha, cachorro, e *D. rotundus*), *Xho* I (específica para humano), *Bmg* BI (específica para boi) e *Taq* I (específica para humano e porco). O fluxograma da figura 6 mostra a seqüência das etapas de uso das enzimas de restrição selecionadas para a diferenciação das cinco espécies de presas preferencialmente atacadas pelo morcego hematófago *D. rotundus* na Amazônia brasileira. A figura 6 mostra ainda as estimativas dos tamanhos esperados dos fragmentos obtidos pela clivagem de produto de PCR (~360 pb) do gene mitocondrial *cyt-b* pelas enzimas selecionadas, nas diferentes espécies. Este procedimento possibilitou a identificação segura e clara das cinco espécies de presa, com base na utilização de apenas duas enzimas por espécie.

A qualidade dos produtos da PCR, avaliado pela quantidade e integridade dos produtos amplificados, foi considerada suficiente e adequada para a realização dos testes de restrição, para amostras de DNA extraído de sangue (Figura 5). A clivagem dos produtos da PCR, obtidos a partir do DNA extraído de seis amostras do sangue de três espécies de presas (galinha, porco e humano), pela enzima *Hae* III mostrou um padrão de restrição diferenciado daquele esperado pela análise dos sítios de clivagem das seqüências do GenBank (Figura 7). Na realidade os tamanhos dos fragmentos encontrados, após a clivagem dos produtos da PCR pela enzima *Hae* III, para estas espécies, foram um pouco maior que os tamanhos esperados dos fragmentos pela análise das seqüências no GenBank. Para cachorro, espécie que apresentou dois produtos de amplificação após a PCR, os fragmentos oriundos da clivagem por *Hae* III, de aproximadamente 275 e 84 pb também não corresponderam ao padrão esperado pela análise das seqüências no Genbank (232 e 127 pb) (Figura 7). Já os produtos obtidos, oriundos da clivagem pela mesma enzima (*Hae* III), foram semelhantes ao esperado de 284 e 75 pb para boi (Figura 7) e 266, 56 e 37 para o morcego *D. rotundus*, pela análise dos sítios de clivagem das seqüências depositadas no GenBank.

A análise dos fragmentos obtidos pela clivagem dos produtos da PCR, utilizando a enzima *Hae* III, mostrou padrões distintos de restrição entre as espécies de presas,

evidenciando fragmentos de diferentes tamanhos para boi, humano e cachorro, possibilitando dessa forma a diferenciação dessas espécies (Figura 8). Galinha e porco apresentaram o mesmo padrão de restrição pela ação da enzima *Hae* III, ou seja fragmentos de tamanhos semelhantes, no entanto ainda assim foi possível diferenciá-los das outras três espécies de presas (Figura 8). O padrão de clivagem do produto amplificado a partir do DNA do morcego *D. rotundus* por *Hae* III foi totalmente diferenciado dos padrões encontrados para as espécies de presas (Figura 4), descartando desta forma a possibilidade de confusão entre as espécies de presas e *D. rotundus*, em caso de amplificação mista de DNA das presas e do morcego, obtido de amostras de fezes (Figura 8).

Visando a identificação inequívoca das espécies das presas pelo método PCR-RFLP procedeu-se à análise de mais uma enzima de restrição, que em combinação com *Hae* III propiciou a identificação específica de cada uma das cinco espécies de presas. Como explicado anteriormente, a escolha das enzimas foi feita utilizando-se o programa NEB Cutter v2.0. Nesta segunda etapa, quatro enzimas (*Rsa* I, *Xho* I, *Bmg* BI, *Taq* I), foram utilizadas para diferenciar as cinco espécies de presas.

Os padrões de restrição observados pela ação da enzima *Rsa* I permitiu diferenciar as espécies galinha, cachorro e *D. rotundus* (Figura 8). A clivagem dos produtos da PCR por *Rsa* I resultou em fragmentos com tamanhos de 283, 42 e 34 pb para cachorro, os quais foram maiores que os fragmentos encontrados para galinha (Figura 9) e menores que em *D. rotundus* (Figura 8). Nenhum sítio de restrição da *Rsa* I foi identificado nas seqüências do DNA analisado de boi, porco e humano (Figura 8).

As enzimas *Xho* I e *Bmg* BI foram espécie-específicas para humano e boi, respectivamente, não clivando o DNA das outras espécies de presas e de *D. rotundus* (Figura 8). O padrão de clivagem encontrado pela ação de *Xho* I, evidenciou fragmentos de 215 e 144 pb em humanos, conforme esperado (Figura 9). A enzima *Bmg* BI clivou o DNA amplificado de boi em dois fragmentos de 219 e 140 pb (Figura 9), os quais correspondem aos tamanhos esperados pela análise realizada no NEB Cutter v2.0 para esta espécie.

A enzima *Taq* I clivou o DNA amplificado a partir de amostras de sangue de porco e de humano. A *Taq* I clivou o DNA dessas espécies gerando dois fragmentos de aproximadamente 210 e 150 pb (Figura 9).

Os resultados mostram que das quatro enzimas utilizadas na segunda etapa de desenvolvimento do método, visando a confirmação das espécies, a enzima *Rsa* I possibilitou diferenciar entre galinha, cachorro e *D. rotundus*; *Bmg* BI confirmou boi; *Taq* I confirmou a identificação de porco e *Xho* I, bem como *Taq* I, possibilitaram confirmar a identificação de

humanos. Ressalta-se que a análise final para a determinação do método considerou a combinação dos resultados obtidos na utilização da enzima *Hae* III e os dados obtidos com a clivagem de uma segunda enzima para a confirmação inequívoca da espécie.

Nas tabelas 2 e 3 são apresentadas as espécies de mamíferos (n=17) e aves (n=19) selvagens que podem ser atacadas por *D. rotundus* na Amazônia brasileira. As seqüências do *cyt-b* depositadas no GenBank para essas espécies, correspondente à mesma região do genoma mitocondrial amplificada no presente estudo, foram comparadas às seqüências de DNA das cinco espécies de vertebrados domésticos testadas aqui. Uma simulação de clivagem realizada nestas seqüências, por meio do programa NEB Cutter v.2.0, mostrou que o fragmento de DNA de interesse pode ser clivado para todas as espécies selvagens aqui investigadas, por pelo menos umas das enzimas usadas no estudo (Tabelas 2 e 3). No entanto, todos os fragmentos esperados do processo de clivagem possuem tamanhos diferenciados daqueles encontrados para as cinco espécies de presas domésticas testadas, impossibilitando qualquer confusão da identificação das presas domésticas.

Análise por PCR-RFLP a partir do DNA obtido de fezes dos morcegos

Os produtos da PCR oriundos da amplificação do DNA obtido de amostras de fezes dos morcegos alimentados em cativeiro, com sangue das presas, foram submetidos à clivagem por enzimas de restrição, conforme procedimento descrito anteriormente na análise PCR-RFLP a partir de DNA obtido de amostras de sangue. O DNA genômico total foi extraído de 190 amostras de fezes (média = 48 amostras por espécie de presa). O DNA extraído das amostras de fezes apresentou boa qualidade e quantidade sendo que a concentração final do DNA variou de 5 a 300 ng/ μ l (média = 95,5 ng/ μ l) (Figura 4). Para as amplificações por PCR e análise RFLP foram utilizadas 20 amostras de DNA obtido de fezes para cada espécie de presa. Nesta etapa foram escolhidas, dentre as 190 amostras de DNA disponíveis, aquelas que apresentaram maior concentração, distribuídas igualmente entre os indivíduos de *D. rotundus* utilizados no experimento de cativeiro.

A partir do DNA das 100 amostras selecionadas (20 amostras/presa), foi possível amplificar o fragmento de 380 pb do gene mitocondrial *cyt-b* para 99 amostras (Figura 10). Não foi possível amplificar o DNA obtido de apenas uma das amostras de fezes de galinha. Nenhuma das 20 amostras de fezes dos morcegos alimentados com sangue de cachorro amplificou o fragmento de 600 pb, como observado na amplificação do DNA extraído do sangue desta presa. O sucesso de amplificação das amostras de fezes foi menor comparado

com as amostras de sangue. A reação da PCR de 25 amostras de fezes teve que ser repetida até cinco vezes para obter um produto de amplificação de boa qualidade necessária para as análises pelas enzimas de restrição, enquanto que todas as amostras de sangue tiveram um bom produto da PCR com apenas uma reação por amostra. As amostras de DNA provenientes das fezes de cachorro foram as mais problemáticas, sendo necessárias 41 reações de amplificações para que todas as 20 amostras alcançassem quantidade adequada de produto amplificado para serem submetidas à clivagem pelas enzimas de restrição. Em cada uma das repetições da reação da PCR das amostras de fezes foram realizadas alterações no protocolo de amplificação. Tais alterações consistiram em aumentar a quantidade de DNA e de BSA de 5,0 ng para 7,5 ng. Além disso, o número dos ciclos da reação da PCR no termociclador subiu de 30 para 35 ciclos. Em poucos casos a reação da PCR foi realizada com 40 ciclos. Essas alterações no protocolo da reação da PCR permitiram obter amplificações de boa qualidade das amostras de fezes. Por causa das repetições das amplificações, um total de 150 reações da PCR foi realizado para que as 99 amostras fecais fossem clivadas pelas enzimas.

A análise comparativa dos perfis de restrição observados pela ação das enzimas utilizadas mostrou semelhança tanto para os produtos obtidos do DNA extraído das amostras de sangue quanto das fezes (Figuras 11 e 12), confirmando a presença do DNA das presas nas fezes do morcego, seu isolamento e posterior identificação pela técnica PCR-RFLP. A clivagem pela enzima *Hae* III do produto da PCR de algumas amostras de fezes dos morcegos alimentados com sangue de boi e cachorro produziu fragmentos de tamanho idêntico ao obtidos da clivagem do DNA amplificado das amostras de sangue dessas presas e também do morcego *D. rotundus*, indicando que em algumas amostras de fezes o DNA do morcego também pode ser extraído, amplificado e clivado. Contudo, os fragmentos correspondentes a clivagem do DNA amplificado do morcego sempre tiveram intensidade de brilho mais fraco no gel de agarose, não confundindo a identificação das presas.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a aplicabilidade da técnica PCR-RFLP para identificar com precisão as cinco espécies de presas preferencialmente utilizadas na alimentação do morcego hematófago *D. rotundus* na Amazônia brasileira. Esta técnica também tem sido usada como um método valioso na determinação da preferência alimentar de insetos hematófagos, evidenciando as espécies de presas atacadas (Steuber *et al.*, 2005; Oshaghi *et al.*, 2006). Em insetos hematófagos como *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) transmissor da malária, análises por PCR-RFLP a partir de material do estômago do inseto, possibilitaram distinguir o sangue humano de outras espécies de mamíferos e galinha (Oshaghi *et al.*, 2006), contribuindo dessa forma para o conhecimento acerca dos principais animais que atuam como reservatórios da doença e a sua importância na dinâmica de transmissão da malária para o homem.

Outros estudos têm utilizado a técnica de PCR-RFLP para a identificação de vertebrados, a partir da análise de material não-invasivo como fezes (Mills *et al.*, 2000; Ridlle *et al.*, 2003; Nagata *et al.*, 2005; Livia *et al.*, 2007). Por exemplo, Bidlack *et al.* (2007) diferenciaram sete espécies de carnívoros (*Canis latrans*, *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758), *Urocyon cinereoargenteus* (Schreber, 1775), *Lynx rufus* (Schreber, 1777), *Puma concolor*, *Procyon lotor* (Linnaeus, 1758) e *Mephitis mephitis* (Schreber, 1776)) utilizaram três enzimas de restrição (*Hpa* II, *Dde* I e *Hpy* CH4V), que clivaram um fragmento de 196 pb do gene mitocondrial *cyt-b* amplificado do DNA extraído de amostras fecais desses mamíferos de forma a obter perfis de restrição diferente para estas espécies.

O estudo aqui apresentado sobre a caracterização da dieta de *D. rotundus* é inédito no sentido de ser o primeiro a propor a utilização de uma técnica molecular que possibilita a identificação inequívoca de várias espécies de presas utilizadas por *D. rotundus* em sua alimentação. Do nosso conhecimento, até o presente o único estudo comparável ao aqui apresentado foi o realizado por Carter *et al.* (2006), no qual amplificaram um fragmento do genoma nuclear (RAG-1), a partir de DNA extraído das fezes do morcego hematófago *Diaemus youngi* criado em cativeiro. Posteriormente, a identificação da espécie de presa (galinha) utilizada pelo morcego foi adquirida por meio de seqüenciamento direto do DNA.

Isótopos estáveis também foram utilizados para investigar a preferência alimentar de *D. rotundus*, buscando diferenciar entre gado e mamíferos selvagens (Voigt & Kelm, 2006). Mesmo sendo útil em diversas situações, esta técnica é pouco eficiente para descrever

precisamente a dieta de morcegos hematófagos em vilarejos localizados no interior da Amazônia brasileira. Nestes locais, a criação de gado não é freqüente e outros animais como galinhas, porcos e cachorros provavelmente são mais apreciados por *D. rotundus* do que animais selvagens, em função da previsibilidade e acessibilidade desses animais domésticos como recurso alimentar.

Os pré-requisitos fundamentais para o sucesso na utilização da técnica PCR-RFLP observados no presente estudo foram: 1) Qualidade do DNA extraído das fezes do morcego que possibilite a posterior amplificação do DNA; e 2) Disponibilidade de iniciadores (*primers*) universais para amplificação de região(ões) do genoma de uma variedade de espécies de vertebrados utilizadas como presas (Kocher *et al.*, 1989). Análises via PCR para identificação dos itens da dieta no trato digestivo de predadores dependem também da capacidade de reconhecimento pelos *primers* das regiões flanqueadoras aos locos de interesse no genoma, os quais serão amplificados (Chen *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2004). Para tal faz-se necessária quantidade suficiente de DNA íntegro para a realização da PCR. O genoma mitocondrial atende a essa exigência, pois a maioria dos genes está presente em múltiplas cópias nas células, aumentando as chances de amplificação do DNA ainda que degradado durante a passagem pelo trato digestivo do predador (Chen *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2004). As amplificações da região do *cyt-b* no presente estudo ocorreram com sucesso para a maioria das amostras de DNA extraído das fezes testadas. Em função do sucesso das amplificações, foi possível realizar as análises PCR-RFLP para a maioria (99%) das amostras, as quais evidenciaram perfis de restrição capazes de identificar as cinco espécies de presas investigadas, a partir de material oriundo das fezes de *D. rotundus*. A confirmação das espécies também se deu pela análise de seqüenciamento dos produtos amplificados.

Em estudos que utilizam análise molecular via PCR para determinação da dieta, a partir de amostras de fezes de vertebrados coletadas em campo, é comum observar que o DNA extraído de parte dessas amostras falha em amplificar a região alvo do genoma sendo investigada (Farrell *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2003). No entanto, nenhum desses estudos relata o esforço, medido pelo número de reações de PCR realizadas para alcançar os resultados. Tal avaliação é importante no sentido de dimensionar os custos e tempo gastos na realização dos projetos.

No presente estudo verificou-se que o sucesso no processo de clivagem do DNA pelas enzimas de restrição utilizadas dependeu em muito da quantidade de produto amplificado. Das 99 amostras de DNA extraído a partir das fezes, para 25 amostras (25,3%) a reação de

PCR teve que ser repetida (mais de uma vez) a fim de obter-se uma quantidade de produto adequado para a análise de RFLP. Tal fato pode estar relacionado a diferenças na estrutura do DNA de cada espécie de presa e a conseqüente influência do processo de digestão durante a passagem pelo trato digestivo do morcego, na degradação do DNA dessas presas (Zaidi *et al.*, 1999). Neste sentido, Agustí *et al.* (2003) especulam sobre a possibilidade de um DNA rico em AT ser quebrado mais facilmente do que um DNA com predomínio de CG, devido as pontes de hidrogênio extras conferirem maior resistência ao DNA. O fragmento seqüenciado do sangue de cachorro apresentou mais bases A e T do que as outras espécies (58,4% do fragmento de 359 pb), mas esta diferença foi pequena quando comparado com boi (57%) e porco (56,7%). As seqüências analisadas do DNA de cachorro apresentaram maior número de bases A e/ou T seguidas. Tal cenário parece conferir locais de baixa resistência no fragmento, podendo resultar em uma degradação maior do DNA de cachorro. Fatores relacionados à estocagem do sangue oferecido aos morcegos em cativeiro foram descartados neste sentido uma vez que o sangue de cachorro foi armazenado em bolsas com CPDA1, da mesma forma como o sangue de porco e humano. As fezes foram coletadas de três morcegos diferentes, indivíduos também usados para obter parte das amostras de fezes com DNA de boi.

Diversos estudos têm desenvolvido e utilizado *primers* espécie-específicos para amplificação de regiões do genoma mitocondrial. Nestes estudos observou-se que o sucesso na identificação das presas, a partir do DNA extraído de fezes dos predadores, é diretamente afetado pelo tamanho dos fragmentos amplificados (Chen *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2003; Juen & Traugott, 2005). Fragmentos maiores de 300 pb podem ser menos detectados por serem mais facilmente degradados durante o processo de digestão pelo predador (Agustí *et al.*, 1999; Zaidi *et al.*, 1999; Sheppard *et al.*, 2005). No presente estudo, a utilização de um fragmento de DNA de tamanho muito pequeno (<300 pb) dificultaria a análise pela técnica PCR-RFLP em função do pequeno número de sítios de restrição encontrado. Aqui foi amplificado com sucesso um fragmento de aproximadamente 380 pb, um pouco maior do que o recomendado por outros estudos. De modo similar, Kirstein & Gray (1996) usaram um fragmento de 638 pb do *cyt-b* nas análises por PCR-RFLP para amplificar quatro espécies de mamíferos usados na alimentação do carrapato *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (Acari: Ixodidae). Provavelmente a rapidez da passagem do alimento pelo trato digestivo dos morcegos (15 minutos) (Thomas, 1988), associado ao grande volume das amostras fecais coletadas, permitiu extrair uma quantidade boa de DNA íntegro necessário para as amplificações.

Em invertebrados terrestres, fragmentos de DNA que variam de 140 a 387 pb podem resistir à digestão mais de 24 horas após a presa ser ingerida (Agustí *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 2004; Read *et al.*, 2006; Juen & Traugott, 2005; 2007). As amostras fecais dos morcegos em cativeiro foram coletadas entre 15 e 18 horas após o sangue ser colocado nas gaiolas. Testes prévios realizados por nós com *D. rotundus* capturado em condições naturais indicaram que as amostras fecais podem ser coletadas até 18 horas após o morcego hematófago ser capturado. Em ambas situações as amplificações foram realizadas com sucesso.

Uma vantagem da análise por PCR-RFLP sobre outros métodos que utilizam *primers* espécie-específicos para a amplificação do DNA é a possibilidade de identificar várias espécies a partir de um mesmo par de *primers* “universais”. Estudos que desenvolvem *primers* específicos geralmente estão interessados em conhecer o potencial de predadores no controle de uma determinada praga (Agustí *et al.*, 2005; Garipey *et al.*, 2007). Em alguns casos, cada amostra de DNA é amplificada por três *primers* específicos (Chen *et al.*, 2000; Agustí *et al.*, 2003; Juen & Traugott, 2005), onerando os custos da sua aplicação na análise de várias presas. Para a obtenção dos mesmos dados alcançados no presente estudo, seria necessário um total de 500 reações de PCR para amplificar 100 amostras a partir de cinco *primers* espécie-específicos (um para cada presa), sem considerar possíveis falhas na amplificação. Neste sentido, o método aqui desenvolvido utilizando a técnica PCR-RFLP mostrou-se bastante eficiente uma vez que de 100 amostras analisadas foi possível validar as identificações das presas a partir de pouco mais de 150 reações de amplificação no total.

O conjunto de cinco enzimas de restrição (*Hae* III, *Rsa* I, *Taq* I, *Bmg* BI e *Xho* I) utilizadas na análise PCR-RFLP possibilitou a identificação inequívoca das cinco espécies de presas testadas. O método, conforme anteriormente descrito, pode ser validado com a utilização de até duas enzimas de restrição para a confirmação da identificação segura de cada espécie de presa analisada.

Em condições naturais, *D. rotundus* pode também alimentar-se de uma variedade de presas. Os sítios de restrição de diversas espécies de mamíferos silvestres que ocorrem na região Amazônica foram acessados por meio do programa NEB Cutter v2.0 (Tabela 1). Para sete desses mamíferos, *Hae* III produziu o padrão de corte igual a uma das presas estudadas, mas a maioria não teve sítio de restrição para a segunda enzima usada (Tabela 2). Neste caso, a seqüência de uso das enzimas, proposto no fluxograma (Figura 1), foi crucial para a identificação inequívoca das cinco espécies de animais domésticos estudadas. Em estudo sobre a identificação das presas utilizadas pelo inseto hematófago do gênero *Anopheles*,

Oshaghi *et al.* (2006) constataram o potencial da enzima de restrição *Xho* I para distinguir ataques em humanos de uma gama de espécies domésticas e selvagens. Este resultado também foi evidenciado no presente estudo.

A diferença observada nos tamanhos dos fragmentos clivados pela técnica PCR-RFLP com o esperado a partir da análise dos sítios de restrição nas seqüências de DNA no GenBank para algumas enzimas (*Hae* III, *Rsa* I e *Taq* I), tanto do DNA do sangue quanto das amostras fecais, pode ser atribuída à amplificação de um fragmento de 380 pb, maior do que o esperado de 360 pb. Isso resultou em uma pequena mudança do comprimento dos fragmentos e não do local do sítio de restrição, o que não interferiu na identificação das presas. As seqüências do DNA analisado das espécies de presas disponíveis no GenBank auxiliaram na escolha das enzimas e o que validou o seu uso foram os resultados semelhantes das análises PCR-RFLP do DNA oriundo de amostras de sangue e das fezes.

Os resultados demonstraram que a técnica PCR-RFLP é uma ferramenta aplicável ao estudo da dieta do morcego hematófago *D. rotundus* podendo também ser estendida a estudos sobre a caracterização da dieta de outras duas espécies de morcegos hematófagos, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*. Outra conclusão resultante dos dados aqui obtidos é que em casos onde o fragmento de DNA amplificado não for clivado por nenhuma das enzimas testadas ou produzir fragmentos diferentes do observado pelo método proposto, o DNA poderá ser seqüenciado para a identificação das espécies de presas. O uso da técnica PCR-RFLP é muito flexível e depende principalmente do número e do conjunto de espécies que se pretende abranger para a escolha de enzimas informativas. Além disso, outros marcadores com alta variabilidade do genoma mitocondrial também podem ser usados. Porém, a escolha de *primers* universais que amplifiquem uma variedade de espécies de mamíferos e aves é fundamental para o êxito na sua aplicação.

A possibilidade de variação genética do fragmento do *cyt-b* entre locais geograficamente distantes pode alterar a posição dos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas, pelo rearranjo da seqüência no local de corte da enzima (Dowling *et al.*, 1990; Arias & Infante-Malachias, 2001). Testes preliminares com o DNA do sangue das presas de locais diferentes da Amazônia Central devem ser feitos para observar possíveis mudanças no padrão de tamanho dos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição.

O estudo da dieta de morcegos hematófagos é necessário para se conhecer a amplitude de espécies, domésticas e selvagens, da qual estes morcegos estão se alimentando e a preferência por tipo de presa. Estes dados permitem entender como invasões de áreas antes

florestadas na periferia das grandes cidades e comunidades menores do interior da Amazônia afetam o comportamento alimentar desses morcegos.

A despeito do aumento dos casos de raiva humana atribuída a morcegos vampiros, especialmente por causa dos surtos ocorridos em 2004 e 2005 na região norte do Brasil, o conhecimento da proporção da população de *D. rotundus* que estão atacando pessoas torna-se importante para auxiliar os programas de controle da zoonose e na escolha de modelos de saúde pública que considerem em sua matriz, aspectos da biologia dos morcegos hematófagos (Schneider, 1995). Estudos futuros também podem incluir a coleta de amostras fecais em condições naturais e nos abrigos diurnos para responder questões fundamentais da ecologia alimentar dos morcegos hematófagos.

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), de diferentes espécies de presas e de *D. rotundus*, com base no programa NEB Cutter v.2.0.

	Enzimas de restrição (Sítio de restrição)				
	<i>Hae</i> III GG↓CC	<i>Rsa</i> I GT↓AC	<i>Taq</i> I T↓CGA	<i>Xho</i> I C↓TCGAG	<i>Bmg</i> BI CAC↓GTC
Galinha (<i>Gallus gallus</i>)	159-126-74	210-149	360	360	360
Boi (<i>Bos taurus</i>)	284-75	360	360	360	211-148
Porco (<i>Sus scrofa</i>)	153-126-74-6	360	218-141	360	360
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	234-125	360	215-144	214-145	360
Cachorro (<i>Canis familiaris</i>)	232-127	283-42-34	360	360	360
Morcego (<i>Desmodus rotundus</i>)	266-56-37	325-34	360	360	360

Tabela 2. Espécies de mamíferos silvestres potencialmente atacados por *D. rotundus* na Amazônia brasileira e identificação dos sítios de clivagem das cinco enzimas selecionadas, com base na análise de seqüências da região do gene *cyt-b* depositadas no GenBank.

Ordem Espécie	Nome vulgar	Acesso NCBI	Presença do sítio de restrição para as enzimas				
			<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Bmg</i> BI	<i>Taq</i> I	<i>Xho</i> I
Artiodactyla							
<i>Mazama americana</i>	Veado mateiro	AJ000027					x
<i>Mazama gouazoubira</i>	Veado catingueiro	DQ379308					x
<i>Tayassu pecari</i>	Queixada	AY534303	x				x
<i>Pecari tajacu</i>	Cateto	AY726775	x	x			x
		DQ179066	x				
		DQ179068	x				
		DQ179072	x				x
		DQ179080	x				
		DQ179082	x				
Primates							
<i>Aloutta seniculus</i>	Guariba	AJ489759	x				
		AY065886	x				
		AF289982	x				
<i>Ateles belzebuth</i>	Macaco aranha	não existe					
<i>Lagothrix lagothricha</i>	Macaco barrigudo	AY671799	x		x		
Perissodactyla							
<i>Tapirus terrestris</i>	Anta	AF056030	x	x			
Rodentia							
<i>Agouti paca</i>	Paca	AY206574	x	x			
		AY206560	x	x			
<i>Dasyprocta fuliginosa</i>	Cutia preta	AF437784		x			
<i>Dasyprocta leporina</i>	Cutia vermelha	AF437785		x			
		AF437783		x			
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	Capivara	não existe					
<i>Myoprocta pratti</i>	Cutiara	MPU34850	x	x			x
Xenarthra							
<i>Bradypus variegatus</i>	Preguiça	AF232013	x	x			
<i>Choloepus didactylus</i>	Preguiça de dois dedos	não existe					
<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	Tamanduá bandeira	AY886756	x				
		AY886758	x				
<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá mirim	AF232023	x	x			
		AJ421450	x	x			

Tabela 3. Espécies de aves silvestres potencialmente atacadas por *D. rotundus* na Amazônia brasileira e identificação dos sítios de clivagem das cinco enzimas usadas, com base na análise de seqüências da região do gene *cyt-b* depositadas no GenBank.

Ordem Espécie	Nome vulgar	Acesso NCBI	Presença do sítio de restrição para as enzimas				
			<i>Hae</i> III	<i>Rsa</i> I	<i>Bmg</i> BI	<i>Taq</i> I	<i>Xho</i> I
Tinamiformes							
<i>Tinamus tao</i>	azulona	não existe					
<i>Tinamus major</i>	inhambu-de-cabeça-vermelha	NC002781					
<i>Tinamus guttatus</i>	inhambu-galinha	não existe					
<i>Crypturellus cinereus</i>	inhambu-preto	não existe					
<i>Crypturellus soui</i>	tururim	não existe					
<i>Crypturellus undulatus</i>	jaó	AY139629	x				
<i>Crypturellus strigulosus</i>	inhambu-relógio	TMU76056					
<i>Crypturellus variegatus</i>	inhambu-anhangá	não existe					
<i>Crypturellus bartletti</i>	inhambu-anhangáí	não existe					
<i>Crypturellus parvirostris</i>	inhambu-chororó	AY115393*		x			
<i>Crypturellus tataupa</i>	inhambu-chintã	AY016012		x			
Galliformes							
<i>Penelope jacquacu</i>	jacu-de-spix	AY145318	x	x			x
<i>Aburria cumanensis</i>	jacutinga-de-garganta-azul	não existe					
<i>Nothocrax urumutum</i>	urumutum	AF165470	x	x			
<i>Mitu tuberosum</i>	mutum-cavalo	AY098555	x				x
<i>Crax globulosa</i>	mutum-de-fava	AY141924	x	x			
<i>Psophia leucoptera</i>	jacamim-de-costas-brancas	não existe					
<i>Psophia viridis</i>	jacamim-de-costas-verdes	DQ485901	x	x			
Opisthocomiformes							
<i>Opisthocomus hoazin</i>	cigana	AF168119	x	x			

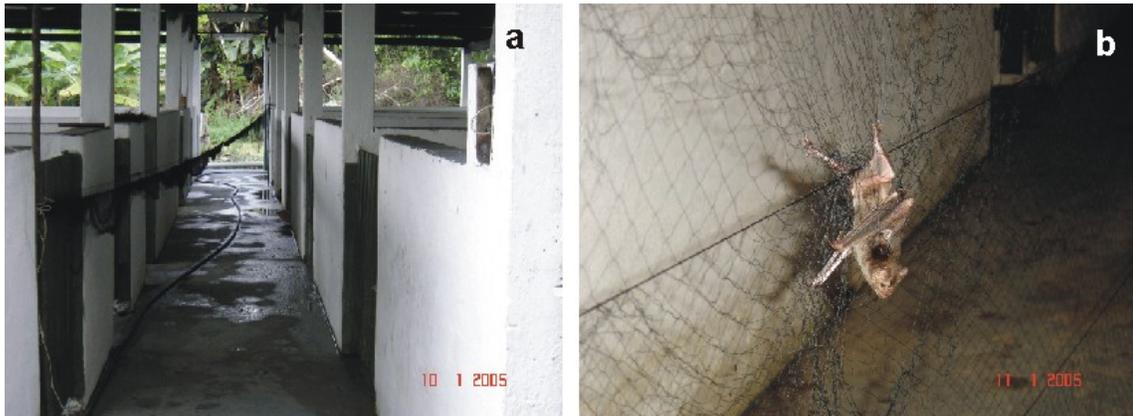


Figura 1. Local de captura dos morcegos na Fazenda Experimental da UFAM. a) rede *mist-nets* armada entre as cocheiras dos porcos; b) morcego *Desmodus rotundus* capturado quando se aproximava para atacar os porcos.



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.



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.

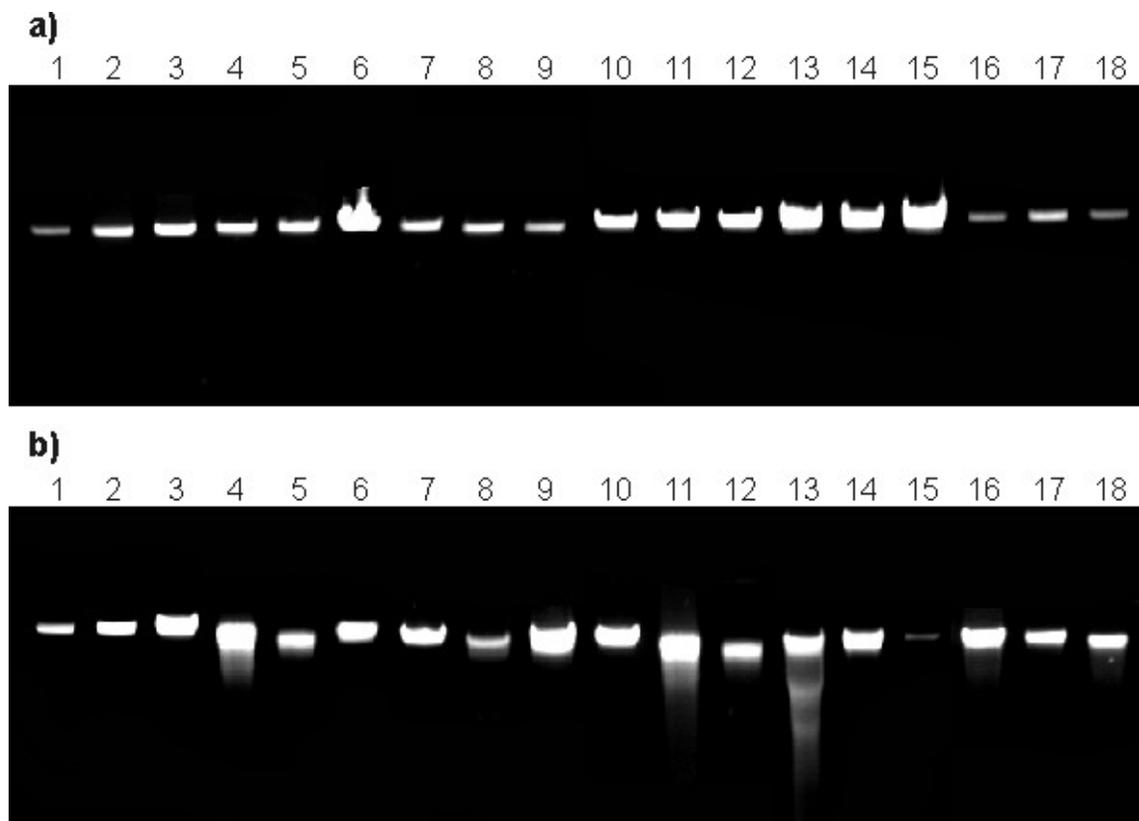


Figura 4. Gel de quantificação do DNA extraído das amostras de sangue e fezes. a) DNA do sangue das cinco espécies de presas testadas; b) DNA das amostras fecais de *D. rotundus* alimentado com sangue das presas. Colunas 1-3: marcador fago Lambda 25, 50, 10 ng; Coluna 4-6: galinha; Coluna 7-8: boi; Coluna 9-11: porco; Coluna 12-15: humano; Coluna 16-18: cachorro.

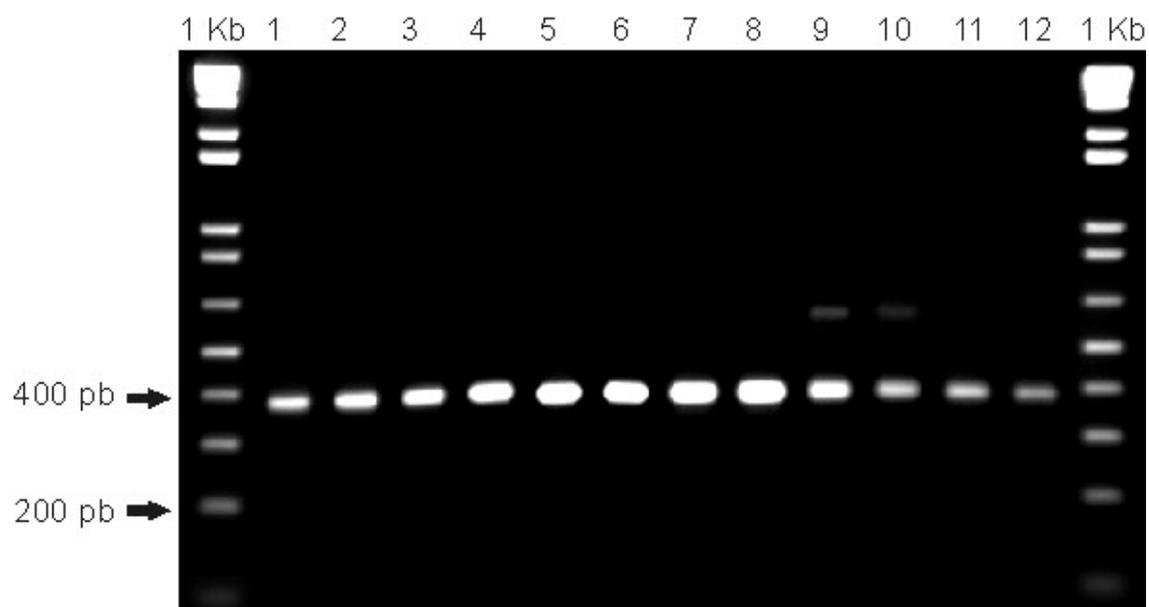


Figura 5. Fragmento do gene *cyt-b* (~380 pb) amplificado a partir de DNA obtido de amostras de sangue de cinco espécies de presas e do morcego hematófago *D. rotundus*. Colunas 1-2: galinha; Colunas 3-4: boi; Colunas 5-6: porco; Colunas 7-8: humano; Colunas 9-10: cachorro; Colunas 11-12: *D. rotundus*.

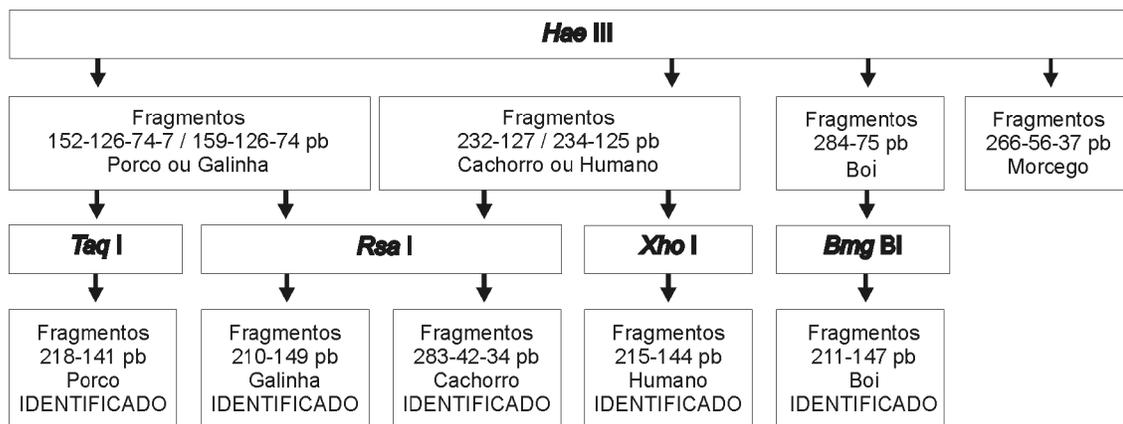


Figura 6. Fluxograma mostrando a seqüência de etapas das enzimas de restrição selecionadas durante o desenvolvimento do método molecular para a diferenciação das cinco espécies de presas preferencialmente atacadas pelo morcego hematófago *Desmodus rotundus* na Amazônia brasileira, bem como para a identificação do próprio morcego.

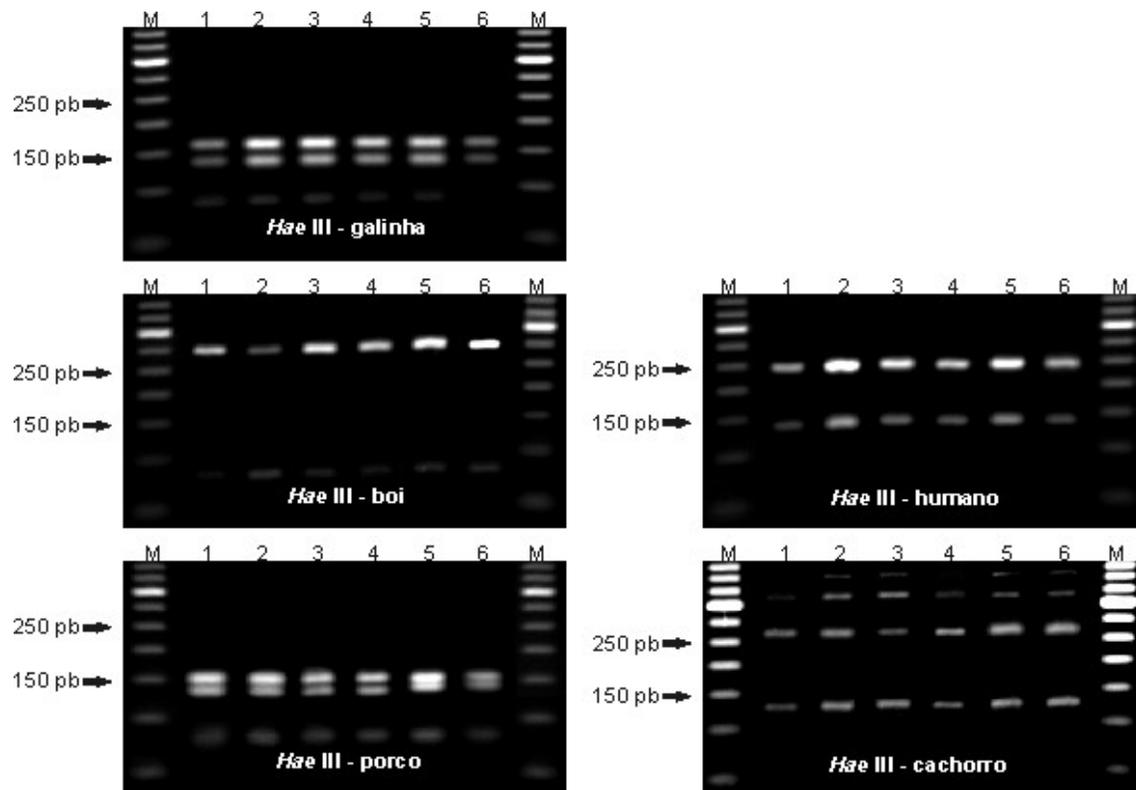


Figura 7. Perfis de restrição obtidos após a clivagem de produtos amplificados do gene *cyt-b* (~380 pb) com a enzima *Hae* III, para cinco espécies de presas de *D. rotundus*. Cada painel mostra o padrão de clivagem do DNA obtido do sangue de seis amostras/presa.

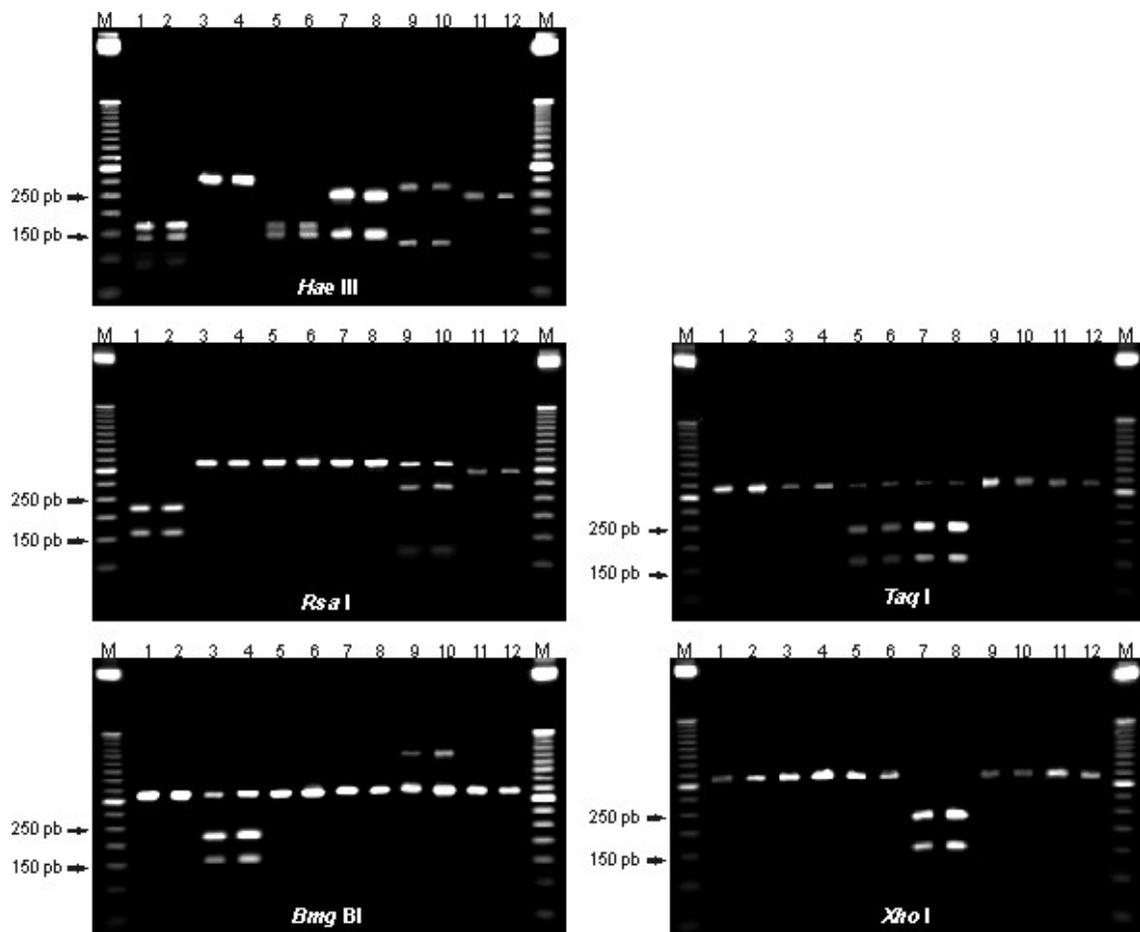


Figura 8. Comparação dos perfis de restrição obtidos após a clivagem de fragmento amplificado do gene *cyt-b* com cinco enzimas de restrição (*Hae* III, *Rsa* I, *Bmg* BI, *Xho* I e *Taq* I) de amostras de sangue visando diferenciar as espécies de presas de *D. rotundus*. Colunas 1-2: galinha; Colunas 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.

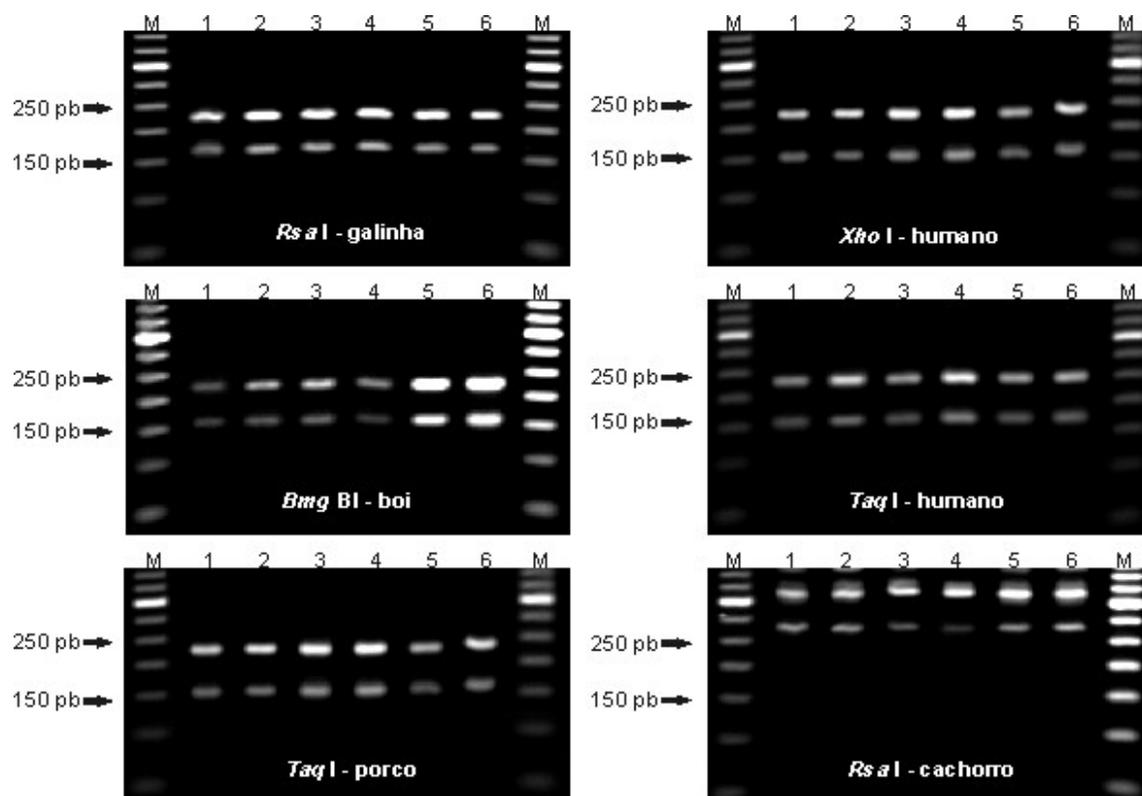


Figura 9. Padrões de clivagem do DNA pelas enzimas *Rsa* I, *Bmg* BI, *Taq* I e *Xho* I para seis amostras obtidas de sangue de cinco espécies de presas de *D. rotundus*. M: marcador de 50 pb.

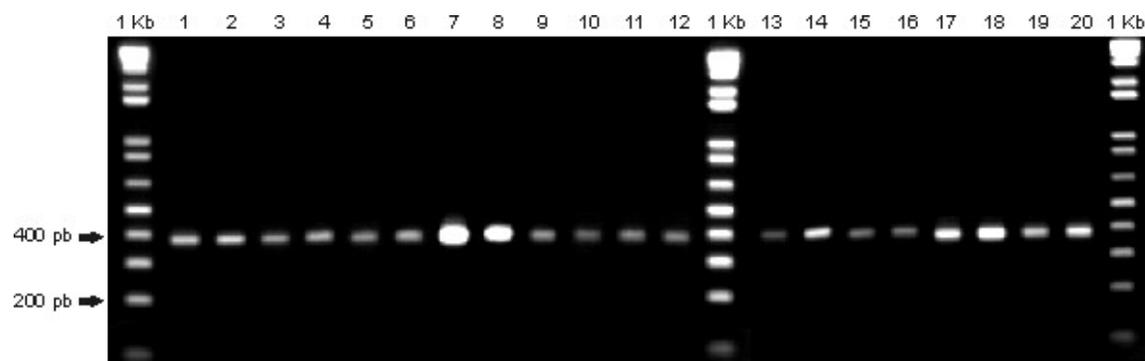


Figura 10. Fragmento amplificado do gene *cyt-b* (~380 pb) a partir de DNA extraído de amostras de fezes de *D. rotundus*, previamente alimentado com sangue de cinco espécies de presas. Colunas 1-4: galinha; Colunas 5-8: boi; Colunas 9-12: porco; Colunas 13-16: humano; Colunas 17-20: cachorro.

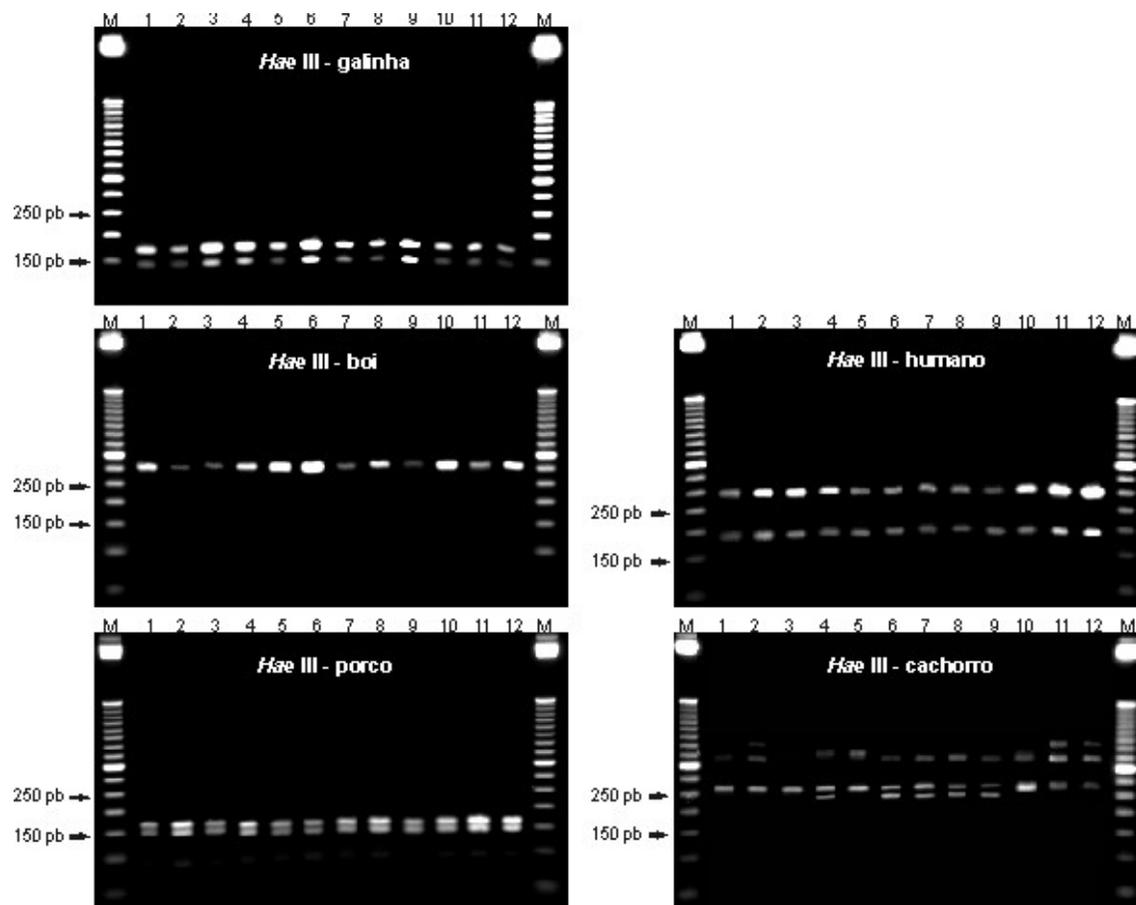


Figura 11. Perfis de restrição obtidos após clivagem de fragmento amplificado de gene *cyt-b* pela enzima *Hae* III, a partir de DNA obtido das fezes de *D. rotundus* (colunas 1-10) e de amostras do sangue das presas (colunas 11-12). M: marcador ladder 50 pb.

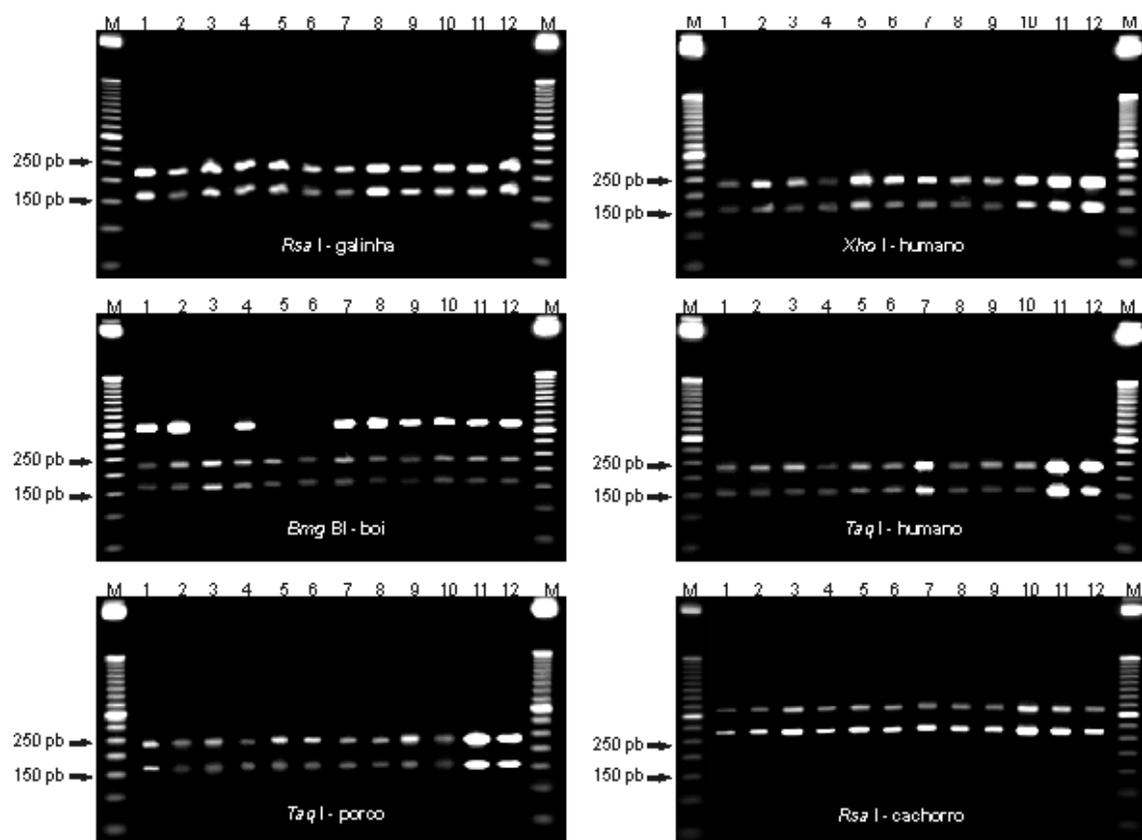


Figura 12. Perfis de restrição obtidos após clivagem de fragmento amplificado de gene *cyt-b* pelas enzimas *Rsa* I, *Bmg* BI, *Taq* I e *Xho* I, a partir de DNA obtido das fezes de *D. rotundus* (colunas 1-10) e de amostras do sangue das presas (colunas 11-12). M: marcador ladder 50 pb.

– CAPÍTULO 2 –

**Caracterização da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na
Amazônia brasileira usando a técnica molecular PCR-RFLP**

Título de cabeçalho: Caracterização da dieta de *Desmodus rotundus* por PCR-RFLP

Palavras chave: Amazônia, citocromo b, DNA fecal, ecologia alimentar, preferência alimentar, PCR-RFLP

Autores: Paulo Estefano D. Bobrowiec^{1,2}, Maristerra R. Lemes² e Rogério Gribel²

¹Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, ²Laboratório de Genética e Biologia Reprodutiva de Plantas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Avenida André Araújo, 2936, Manaus, AM, 69083-000, Brasil

INTRODUÇÃO

As três espécies de morcegos da subfamília Desmodontinae possuem o hábito alimentar mais especializado entre os morcegos Neotropicais, sendo dependentes exclusivamente de sangue (Greenhall, 1988; Fenton, 1992). Dentro deste cardápio restrito, o morcego vampiro *Desmodus rotundus* possui dieta mais flexível pois pode se alimentar do sangue de mamíferos e de aves, enquanto as duas outras espécies, *Diaemus youngi* e *Diphylla ecaudata*, se alimentam predominantemente de aves (Gardner, 1977; Greenhall, 1988). Estes morcegos são raros dentro da floresta primária (Bernard, 2001; Bobrowiec, 2003; Peters *et al.*, 2006), mas sua população aumenta quando em contato com vilarejos e fazendas (Delpietro *et al.*, 1992; Bobrowiec, 2007). Os animais de criação constituem uma fonte de alimento fácil, segura e constante, sendo os principais responsáveis por atrair e manter os morcegos hematófagos próximos às áreas antrópicas (Delpietro *et al.*, 1992; Voigt & Kelm, 2006). *Desmodus rotundus* já foi registrado ingerindo sangue de boi, cavalo, porco, cabras, cachorro e galinha (Greenhall, 1988; Delpietro *et al.*, 1992).

Em pequenas comunidades localizadas no interior da floresta tropical da América do Sul são comuns os registros de ataques a humanos, principalmente em crianças (López *et al.*, 1992; Warner *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1996, 2001). Devido às baixas condições sócio-econômicas e conseqüente precariedade das habitações, *D. rotundus* possui normalmente livre acesso às moradias das famílias de ribeirinhos e assentados de beira de estradas. Essas populações humanas, juntamente com seus animais de criação, são suscetíveis ao ataques por morcegos vampiros, não sendo claros ainda os fatores que levam esses morcegos a escolherem suas presas. A principal conseqüência desses ataques em humanos é a transmissão de doenças como o vírus da raiva, fatal em 100% dos casos. Recentemente o Brasil presenciou o maior surto de raiva humana transmitida por morcegos hematófagos, todos ocorridos em comunidades do interior da região Amazônica com número elevado de óbitos (Rosa *et al.*, 2006). Schneider *et al.* (1996, 2001) já haviam verificado um grande potencial de infecção rábica humana na região amazônica brasileira. No caso da raiva transmitida por vampiros, no entanto, somente após o aparecimento da zoonose é que as entidades responsáveis pelo controle zôo-sanitário tem tido condições de tomar providências. A proximidade entre humanos e morcegos hematófagos, o livre acesso às casas e o perigo significativo da transmissão de raiva humana, colocam em risco os ribeirinhos e colonos que vivem em lugares afastados. Assim sendo, é muito importante o monitoramento do hábito

alimentar dos morcegos hematófagos e a preferência por tipo de presa em condições naturais, a fim de se antecipar aos surtos de transmissão da raiva a humanos.

A predação por morcegos hematófagos é estimada através da observação direta das presas atacadas pelos morcegos (Delpietro *et al.*, 1992; Uieda, 1992, 1993). Isótopos estáveis têm sido utilizados como um método alternativo útil na avaliação da dieta desses morcegos e demonstrou a preferência de *D. rotundus* por gado nos locais onde rebanhos são comuns (Voigt & Kelm, 2006). Atualmente, diversos estudos têm empregado técnicas moleculares baseadas em PCR para avaliar taxas de predação (Agustí *et al.*, 2003; Sheppard & Harwood, 2005; Deagle & Tollit, 2007). Estas técnicas permitem o uso de fezes como fonte de DNA, especialmente quando os restos da presa estão muito degradados para análises morfológicas. Por causa da ingestão de sangue, as fezes de morcegos hematófagos são formadas somente por partes moles e a aplicação de métodos moleculares pode ser a melhor forma para a caracterização detalhada do hábito alimentar desses morcegos. A detecção do DNA da presa no trato digestivo e/ou nas fezes do predador depende da capacidade do fragmento de DNA resistir à digestão. Fragmentos curtos de DNA (<300 pb) possuem mais chances de amplificação do que fragmentos maiores (Zaidi *et al.*, 1999; Juen & Traugott, 2005). A análise de genes com múltiplas cópias do genoma mitocondrial (Chen *et al.*, 2000) e nuclear (Zaidi *et al.*, 1999) também aumentam a probabilidade de amplificação via PCR. Existem milhares de cópias do DNA mitocondrial por célula o que torna os marcadores moleculares da região COI, COII e *cyt-b* os mais usados quando se trabalha com DNA degradado (Agustí *et al.*, 2003, 2005; Steuber *et al.*, 2005). Nas situações em que se pretende identificar várias espécies, a análise de regiões específicas dos genomas por PCR seguido da clivagem por enzimas de restrição (PCR-RFLP) confere padrões de fragmentos que permitem diferenciar as espécies (Evans *et al.*, 1998; Mills *et al.*, 2000; Ridlle *et al.*, 2003; Nagata *et al.*, 2005; Oshaghi *et al.*, 2006; Livia *et al.*, 2007).

A identificação molecular das presas do morcego hematófago *D. rotundus*, a partir da análise do DNA obtido de amostras fecais, tem sido recentemente o foco de nossos estudos. Em um ensaio com morcegos em cativeiro foi possível desenvolver um método utilizando a técnica PCR-RFLP para distinguir cinco espécies de presas potencialmente atacadas por *D. rotundus*, incluindo o homem (Capítulo 1). Aqui, nós complementamos nosso estudo aplicando o método desenvolvido com o propósito de investigar a composição da dieta de morcegos hematófagos em comunidades ribeirinhas do interior da floresta Amazônica. O principal objetivo deste estudo foi identificar as presas atacadas por *D. rotundus* em condições naturais e quantificar a proporção que galinhas, gado, porco, cães e humanos estão sendo

utilizados como provedores de sangue para o morcego vampiro *D. rotundus*. Avaliamos, também, como os tipos de animais de criação e domésticos podem influenciar no padrão alimentar deste morcego vampiro. Tais informações poderão ajudar a entender como a ocupação das áreas de floresta por humanos afeta o comportamento alimentar de *D. rotundus*, deixando as pessoas e animais de criação susceptíveis aos ataques por esse morcego hematófago.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

O estudo de campo foi conduzido em 18 comunidades ribeirinhas localizadas nas margens do rio Madeira, rio Aripuanã e lago Ayapuá no rio Purus, estado do Amazonas, Brasil (Figuras 1, 2a e 2b). O rio Madeira é formado por água barrenta, enquanto o seu tributário, o rio Aripuanã, possui águas claras. O lago Ayapuá faz parte da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçu-Purus (827.317 ha), é formado por águas pretas que deságuam no rio Purus e possui forma oval, com 25 km em sua maior extensão durante o período da cheia. Estes locais são compostos por um mosaico de floresta de terra firme e locais inundados sazonalmente (várzea), com diferentes níveis de antropização entre eles. O lago Ayapuá incorpora uma grande área de floresta pouco perturbada e as comunidades praticamente não derrubam a floresta após 300 m da margem. Os ribeirinhos vivem da coleta da castanha (*Bertholletia excelsa* Humboldt & Bonpland) e em menor escala do comércio de farinha, pesca, caça e venda de madeira. O isolamento das comunidades do rio Aripuanã proporciona um grau de perturbação da floresta ainda menor, no qual os ribeirinhos vivem do extrativismo de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, 1927) e venda de farinha. Por outro lado, o rio Madeira é intensamente navegável e povoado, o que provoca um desmatamento de grande parte de suas margens, atingindo pelo menos 500 m de largura nas comunidades visitadas.

Capturas dos morcegos

Excursões de campo foram realizadas em setembro de 2004 (rios Madeira e Aripuanã), abril-maio (rios Madeira e Aripuanã) e junho (lago Ayapuá) de 2005 e fevereiro de 2007 (lago Ayapuá). Todas as comunidades de um trecho de aproximadamente 70 km seguindo os rios Madeira e Aripuanã foram visitadas (Figura 1). No lago Ayapuá foram amostradas as comunidades que tinham suas propriedades localizadas na terra firme (Figura 1). Nos rios Madeira e Aripuanã, cada comunidade foi amostrada de uma a três noites e no lago Ayapuá entre duas e oito noites. Em todas as comunidades, quantificou-se a disponibilidade de alimento para os morcegos hematófagos, anotando o número de galinhas e galinheiros, porcos, cachorros e bois. Os dormitórios dos animais foram checados quanto sua

vulnerabilidade à entrada dos morcegos. A partir de entrevistas com os moradores verificou-se a ocorrência de ataques em humanos pelos morcegos e sua periodicidade.

Nestes locais, os morcegos foram capturados usando quatro redes de neblina (6 e 12 m de comprimento, 2,5 m de altura, 4 bolsas, malha 36 mm), armadas em frente a galinheiros, currais, nos dormitórios dos porcos e ao redor das casas para maximizar a captura de morcegos hematófagos (Figuras 2c e 2d). As redes permaneceram abertas entre 21:00 e 06:00 h com o intuito de capturar os morcegos com o estômago cheio. Todos os morcegos foram colocados em sacos de pano individuais e checados no dia seguinte para a coleta das amostras fecais. Os morcegos capturados no lago Ayapuá foram marcados com um colar numerado e soltos no mesmo local onde foram capturados, enquanto que nos rios Madeira e Aripuanã todos os morcegos foram coletados e depositados na Coleção Zoologia do INPA (Lotes 171 e 178).

Coleta das amostras fecais e análises genéticas

As fezes foram coletadas até 18 h após o morcego ser capturado e foram armazenadas em tubos de 1,5 ml (tipo Eppendorf) contendo sílica gel. Somente nas excursões às comunidades dos rios Madeira e Aripuanã as amostras foram armazenadas à -20 °C, devido à disponibilidade de freezer. Por causa do longo período de permanência nas atividades de campo e a falta de eletricidade no local, não foi possível manter congeladas as amostras coletadas no lago Ayapuá. A quantidade coletada de uma amostra fecal foi suficiente para uma ou duas extrações do DNA genômico, usando o protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987) com algumas modificações (ver Capítulo 1).

O DNA extraído das amostras fecais foi amplificado utilizando *primers* universais que amplificam parte do gene citocromo b (*cyt-b*) do genoma mitocondrial de diversas espécies de mamíferos e aves (Kocher *et al.*, 1989). A amplificação do DNA foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, em inglês). Cada reação da PCR foi feita em volume final de 20 µl contendo tampão I0 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8,4, 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 50 mM MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, BSA (2,5 ng/µl), 2 mM de cada *primer*, 5 U/µl de *Taq* DNA polimerase (Phonetría Biotecnologia), 7,5 ng de DNA e H₂O destilada ultrapura. A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-200, MJ Research) usando o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 30 ciclos com os passos (1) 45 segs a 92 °C, (2) anelamento a 56 °C por 30 segs, (3) extensão a 72 °C por 1:30 min, e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose

1,5% corado com brometo de etídio sob eletroforese em tampão TBE 1X a 80 V e visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da PCR com quantidades adequadas de DNA foram clivados por enzimas de restrição segundo método previamente desenvolvido (ver figura 6 do Capítulo 1). Neste método propomos o uso de cinco enzimas de restrição (*Hae* III, *Rsa* I, *Taq* I, *Bmg* BI e *Xho* I), que usadas em combinação permitiram clivar os fragmentos amplificados do *cyt-b* de forma a produzir padrões de fragmentos capazes de diferenciar as cinco espécies mais comumente utilizadas por *D. rotundus* em sua alimentação (galinha, boi, porco, humano e cachorro). O método possibilitou a identificação das espécies de presas pela utilização de duas enzimas de restrição/presa, eliminando qualquer chance de confundir os padrões de restrição dos animais domésticos e de criação com os gerados em espécies de mamíferos e aves selvagens que podem ser atacadas por *D. rotundus*. Em uma primeira etapa utilizou-se a enzima *Hae* III para todas as amostras, devido clivar todas as espécies, inclusive o DNA do morcego. Esta enzima produziu quatro padrões de fragmentos distintos dependendo da espécie de presa: (1) galinha-porco; (2) boi; (3) humano; e (4) cachorro. O padrão dos perfis de restrição para *D. rotundus* não sobrepôs ao de nenhuma das espécies de presas, conferindo uma identificação inequívoca desses animais. Conforme os padrões de restrição gerados por *Hae* III, uma segunda enzima foi aplicada para confirmar a identificação. A enzima *Rsa* I foi usada para confirmar o DNA de galinha e cachorro, pois gerou fragmentos diferentes para estas duas espécies e não clivou nenhuma das outras; *Bmg* BI foi específica para boi; *Xho* I foi específica para humano; e *Taq* I confirmou porco.

A clivagem dos produtos da PCR pelas enzimas de restrição foi preparada em um volume final de 13 µl, combinando 9 µl de produto da PCR, 5U de enzima, 1,3 µl do tampão de digestão 10X fornecido pelo fabricante e água destilada ultrapura. A reação de digestão foi incubada por 4 h a 37 °C para as enzimas *Hae* III, *Rsa* I, *Xho* I e *Bmg* BI e 65 °C para *Taq* I, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen). Os produtos de restrição foram posteriormente analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio em eletroforese a 60 V e visualizados sob luz ultravioleta. Para a estimativa dos tamanhos dos fragmentos utilizou o marcador ladder 50 bp.

Nas situações em que o produto da PCR não foi clivado por nenhuma das enzimas ou gerou fragmentos distintos do esperado, nós analisamos o produto da PCR dessas amostras no Sequenciador Automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems). As seqüências foram comparadas com o banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta nucleotide BLAST para se chegar a identificação. Nossos resultados prévios (Capítulo 1) indicaram uma baixa

probabilidade de ocorrer falso positivo, quando uma espécie desconhecida (provavelmente selvagem) produz um padrão de tamanho de fragmentos igual a uma das cinco presas testadas, nas análises por PCR-RFLP aqui utilizadas. Para reforçar nossa observação, cinco amostras previamente identificadas pelas análises de PCR-RFLP foram escolhidas aleatoriamente, seqüenciadas e comparadas com seqüências das espécies de vertebrados disponíveis no GenBank.

Os produtos da PCR foram purificados por meio da ação das enzimas Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase utilizando o Kit ExoSAP-IT (USB Cooperation) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, a reação de seqüenciamento foi preparada em um volume final de 10 µl contendo 1,5 µl de um dos *primers* na concentração 2 mM, 2 µl de Big Dye III (Applied Biosystems), 2 µL de tampão 5X para seqüenciamento (Applied Biosystems), 2 µl de PCR purificado e 2,5 µl de água ultrapura. Em seguida as reações de seqüenciamento foram purificadas utilizando-se solução de acetato de sódio e EDTA (1,5M acetato de sódio, 250 mM EDTA, pH > 8,0) e etanol a 95% e 70%.

Após a secagem, os produtos contendo a reação de seqüenciamento foram re-suspendidos em tampão de carregamento composto por quatro partes de formamida para uma parte de azul dextran, desnaturados a 95 °C por 2 min e analisados sob eletroforese em gel de poliacrilamida 5% em um Seqüenciador Automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram seqüenciados nos dois sentidos *forward* e *reverse*.

As seqüências foram editadas manualmente no programa ChromasPro versão 1.34 (Technelysium Pty Ltd). Após edição, as seqüências obtidas nos dois sentidos, *forward* e *reverse*, foram alinhadas de forma a obter a seqüência consenso. Para tal utilizou-se o programa BioEdit versão 7.0.5.3 (Hall, 1999).

Análise dos dados

Nós estimamos o tamanho dos fragmentos clivados das amostras de fezes analisadas para todas enzimas de restrição e comparamos com o padrão de clivagem dos fragmentos de DNA amplificados a partir de amostras de sangue da presa correspondente. Cada amostra fecal teve a identificação comprovada somente quando apresentaram resultado positivo (clivagem do fragmento) e correto (padrão de fragmentos igual ao previamente conhecido para a presa) pela análise de duas enzimas de restrição.

Os dados dos rios Madeira e Aripuanã foram agrupados devido ao baixo número de amostras fecais identificadas no rio Aripuanã e pela proximidade geográfica destes dois rios.

A diferença na proporção dos itens consumidos por *D. rotundus* entre as localidades foi analisada usando o teste de aderência chi-quadrado com proporções esperadas iguais e correção de Yates (Zar, 1996). A preferência por tipo de presa (galinha ou porco) foi acessada pelo cálculo da proporção de seleção padrão, seguindo Manly *et al.* (2003):

$$\alpha_1 = \frac{\left(\frac{o_1}{\pi_1} \right)}{\left(\frac{o_1}{\pi_1} + \frac{o_2}{\pi_2} \right)}$$

Na associação morcego-presa, a_1 representa a probabilidade do morcego se alimentar da presa 1 quando as duas presas podem ser atacadas pelo morcego, pois não possuem nenhuma proteção dos seus abrigos contra a entrada dos morcegos. As variáveis o_1 e o_2 constituíram a porcentagem de consumo da presa 1 e 2, acessadas pelo método de PCR-RFLP. Os parâmetros p_1 e p_2 são a proporção das presas 1 e 2 no total da população destas duas presas. Baseado no comportamento do morcego, nós usamos o número de abrigos das presas (galinheiro e pocilgas) como sendo a estimativa mais realista da abundância de recurso. Isso porque morcegos vampiros procuram suas presas no mesmo lugar por várias noites consecutivas. Nas comunidades, as galinhas permaneciam à noite dentro de galinheiros e os porcos em cercados. Deste modo, os morcegos são atraídos para o local de maior concentração de presas, formando assim um único conjunto de alimento disponível. As comunidades nas quais não houve amostras fecais identificadas foram descartadas das análises estatísticas. O valor de a_1 varia entre 0 e 1, com altos valores indicando preferência no consumo da presa 1.

RESULTADOS

Presas disponíveis nas comunidades ribeirinhas

Todas as comunidades amostradas possuíam o hábito de criar galinhas e tinham cachorros (Tabela 1), cujos moradores relataram ataques por morcegos hematófagos aos animais (Figura 3 e 4b). Os galinheiros possuíam buracos que permitiam a entrada dos morcegos. O número de galinheiros variou de um a oito entre as comunidades ($3,6 \pm 1,9$ galinheiros) e cada casa possuía um ou dois galinheiros, com no máximo 15 galinhas por casa. Como uma estratégia para evitar a predação intensa dos animais, os moradores relataram que mudavam os galinheiros de lugar. Os ataques voltavam a ocorrer somente depois de algumas noites, provavelmente quando os morcegos descobriam a localização do recurso.

Durante as noites de captura nós observamos seis cachorros com sinais de sangramento nas costas (Figura 3a e 3b), presentes nas comunidades Pinheiros (1), Bacuri (2), Evaristo (2) e Jenipapo (1). No lago Ayapuá estes cachorros foram atacados em todas as noites de captura. Nós registramos porcos em cinco comunidades (Tabela 1), criados para alimentação dos moradores. Os porcos eram atacados todas as noites, motivo que prejudicava a sua criação, segundo os ribeirinhos (Figura 3c, 3d e 4c).

Bois foram observados em quatro comunidades (Tabela 1) e somente em Cachoeirinha os animais ($n=47$) permaneciam durante a noite em um cercado, onde eram constantemente atacados. Em uma casa ao lado do cercado, usada somente durante o dia, nós observamos dois indivíduos de *D. rotundus*. A quantidade de fezes encontrados no chão indicou que os morcegos usavam o local como abrigo noturno há bastante tempo (Figura 4d). Nas outras três comunidades, os bois ficavam soltos no pasto e os moradores não relataram ataques por morcegos.

O tamanho das comunidades, estimado pelo número de moradias, variou de uma casa no Baía, lago Ayapuá, até o registro de mais de 50 casas nas comunidades Porto Seguro e Jenipapo, rio Madeira. Durante o estudo foram registrados ataques de *D. rotundus* em pessoas em duas comunidades. Em Porto Seguro, uma família de cinco pessoas foi atacada por morcegos durante uma semana. Uma criança de oito anos e um adulto tinham sido sangrados em duas noites consecutivas. Esses foram os primeiros eventos de ataques por morcegos hematófagos registrados na comunidade. Em Tucunaré, rio Aripuanã, três crianças e um adulto foram atacados entre agosto e setembro de 2004. Os moradores informaram que os

ataques não eram raros e que quase todas as pessoas já tinham sido sangradas pelo menos uma vez na vida enquanto moravam na comunidade.

Análises moleculares da dieta dos morcegos hematófagos

Em 47 noites (725 horas/rede) capturamos 157 indivíduos de *D. rotundus* e seis *D. youngi*, em 15 das 18 comunidades ribeirinhas visitadas (Tabela 1). No lago Ayapuá foi capturado 55% do total de *D. rotundus* amostrados, enquanto que nos rios Madeira-Aripuanã 45% (Tabela 2). Nestes locais foi possível obter 88 amostras fecais, sendo 55 (63%) no lago Ayapuá. *Diaemus youngi*, outra espécie de morcego hematófago, foi capturado em ambos locais com seis amostras fecais coletadas. A Tabela 2 mostra a quantidade de ampliações e análises RFLP com resultado positivo. Para a maioria das amostras (n=58; 66%) foi amplificada com sucesso a região do gene *cyt-b* contendo aproximadamente 380 pb (Tabela 2).

A identificação da espécie da presa foi obtida de 48 (83%) das 58 amostras de fezes coletadas dos morcegos para as quais foi possível ter ampliações positivas (55% do total das amostras coletadas em campo). Outras 10 amostras falharam nas análises por RFLP, nestes casos procedeu-se ao seqüenciamento do DNA para a confirmação da origem das mesmas. Comparando os locais amostrados, foi obtido 73% de sucesso nas ampliações das amostras oriundas dos rios Madeira-Aripuanã e 92% de sucesso na identificação da presa a partir dessas ampliações. Já para o lago Ayapuá, 55% das amostras amplificaram com sucesso e em 75% delas foi possível identificar as espécies de presas (Tabela 2).

Os padrões observados dos perfis de restrição gerados na análise PCR-RFLP, a partir das amostras coletadas em condições naturais, foram idênticos aos observados em estudo preliminar com base na análise de fezes dos morcegos mantidos em cativeiro (Figura 5). Todas as amostras analisadas apresentaram padrões de restrição correspondentes ao esperado para uma das cinco espécies de presas testadas (Figura 5), não sendo observado qualquer padrão distinto que evidenciasse a presença de DNA de outra espécie de presa nas fezes coletadas.

Galinha foi a presa mais atacada por *D. rotundus*, constituindo quase dois terços (n=27; 61%) do total das amostras com identificação positiva (Tabela 3). Embora a criação de porcos tenha sido rara nas comunidades estudadas, esta presa foi identificada em 32% das amostras (n=14) (Tabela 3). Os outros 6% das amostras coletadas evidenciaram a presença do DNA de boi (n=2) e cachorro (n=1) (Tabela 3). As duas amostras com DNA de boi foram

provenientes da comunidade Cachoeirinha, rio Madeira. Em nenhuma das amostras fecais coletadas foi possível identificar o DNA humano, confirmando o relato dos ribeirinhos de que não houve pessoas atacadas durante as noites das capturas. Uma comparação da porcentagem das presas utilizadas por *D. rotundus* entre o lago Ayapuá e os rios Madeira-Aripunã não mostrou diferença significativa no consumo de galinhas ($\chi^2=0,210$; gl=1; $P=0,646$) e porcos ($\chi^2=1,399$; gl=1; $P=0,237$).

As análises das quatro amostras de fezes coletadas de *Diaemus youngi* que amplificaram indicou o consumo de galinha (n = 3) e porco (n = 1) (Tabela 3; Figura 4a). Devido os ataques em mamíferos por *D. youngi* serem considerados raros na literatura (Gardner, 1977; Uieda, 1992, 1993), as análises foram repetidas duas vezes para a confirmação deste resultado. Todos os testes confirmaram o consumo de porco para uma das amostras.

O seqüenciamento do DNA das 10 amostras não identificadas por PCR-RFLP revelou a presença apenas do DNA de *D. rotundus*. Por outro lado, as cinco amostras previamente identificadas pelo método PCR-RFLP desenvolvido confirmou, pelo seqüenciamento e comparação com dados do GenBank, a identificação do DNA de galinha (n=3) e porco (n=2).

Movimento dos morcegos entre as comunidades do lago Ayapuá

No lago Ayapuá, dos 69 indivíduos capturados de *D. rotundus* e *D. youngi*, 64 foram anilhados e 17 (27%) deles recapturados. Três morcegos anilhados em 2005 foram recapturados em 2007 e por isso não foram analisados quanto à distância de deslocamento. Os dados de recaptura indicaram que os morcegos foram capazes de voar entre as comunidades, percorrendo distâncias que variaram de 2 a 7 km ($3,5\pm 1,9$ km) em poucos dias (1 a 7 dias). A maioria dos morcegos (65%) foi recapturada na mesma comunidade onde foram originalmente anilhados (n=8) ou transitaram dentro da mesma margem do rio (n=3). Um indivíduo de *D. rotundus* percorreu 7 km, da comunidade Evaristo até ser recapturado na comunidade Bacuri, após quatro dias.

Os dados de dieta associados à disponibilidade das presas nas comunidades revelaram que *D. rotundus* possui grande mobilidade de vôo em uma mesma noite. No lago Ayapuá, porcos eram criados apenas na comunidade Caviana, mas três morcegos foram capturados com o DNA de porco nas fezes a 4,7 km, na comunidade Bacuri. Outro morcego que havia se alimentado de porco foi capturado no Baía, a 1,3 km. Em ambos os casos os morcegos cruzaram o rio Ayapuá de aproximadamente 1,5 km de largura.

Preferência alimentar de *D. rotundus*

A análise de preferência por um tipo de presa (a) foi testada somente entre galinha e porco devido corresponderem juntos a 94% do total das espécies atacadas por *D. rotundus*. Os dados utilizados corresponderam aos obtidos de 12 comunidades que tiveram estas duas presas identificadas nas fezes dos morcegos. Nestes locais foram encontradas sete pocilgas ($p_1=12,3\%$) em quatro comunidades e 50 galinheiros ($p_2=87,7\%$). Devido as comunidade Porto Seguro e Jenipapo serem contíguas e representar um local densamente povoado, com cerca de 50 famílias e aproximadamente 500 pessoas, não foi possível estimar o número de galinheiros nestas comunidades. Assim, para estes dois lugares, foram utilizados para o cálculo da proporção de presas, apenas os galinheiros onde as redes foram armadas ($n=8$ galinheiros). Galinhas e porcos foram identificados em 30 e 12 amostras fecais, respectivamente. Nós estimamos o valor de $a_{\text{porco}}=0,7$, indicando que na área de estudo *D. rotundus* teve preferência por porcos, mesmo estes animais sendo raros nas comunidades amostradas.

DISCUSSÃO

Técnicas para determinação de dieta em morcegos hematófagos

Recentemente, algumas técnicas têm sido utilizadas em estudos sobre a determinação da dieta de morcegos hematófagos, possibilitando a quantificação das presas atacadas (Carter *et al.*, 2006; Voigt & Kelm, 2006). Isótopos estáveis já foram usados para examinar a origem do sangue ingerido por *D. rotundus* (Voigt & Kelm, 2006). A análise do tecido dos morcegos apresentaram a mesma assinatura isotópica do gado, que consome plantas C₄, ao contrário de mamíferos selvagens que se alimentam de plantas C₃. Dessa forma pôde-se inferir sobre a origem do sangue ingerido pelo morcego, uma vez que os isótopos relacionados às plantas C₄, usadas pelo gado, ficaram também fixados nos tecidos dos morcegos. Em estudo utilizando análise molecular via PCR, Carter *et al.* (2006) demonstraram que *primers* do gene nuclear RAG-1, encontrado exclusivamente em aves, podem amplificar o DNA de galinhas isolado de amostras fecais de *Diaemus youngi*. Contudo ambos estudos foram mais restritos quanto à precisão e número de espécies identificadas. No caso de ataque a animais selvagens, o uso de isótopos estáveis não seria capaz de identificar a espécie provedora de sangue, pois segundo o estudo, todos os animais selvagens consomem plantas C₃, o que nem sempre é verdade. Além disso, outros animais que não se alimentam de plantas, como galinhas, porcos e cachorros, não poderiam ser identificados. Já no estudo de Carter *et al.* (2006), os *primers* do gene RAG-1 utilizados podem amplificar uma variedade espécies de aves e a identificação de cada espécie só seria acessada por meio do seqüenciamento do DNA.

No presente estudo foi possível detectar, com base no método desenvolvido utilizando a técnica molecular de PCR-RFLP, quatro espécies de presas na dieta de *D. rotundus*. A clivagem por enzimas de restrição de um fragmento amplificado do gene mitocondrial *cyt-b*, como previsto no capítulo 1, foi muito útil para distinguir entre as espécies de presas mais utilizadas na alimentação de *D. rotundus* na Amazônia brasileira..

Não houve dúvidas quanto a identificação das presas em nenhuma das amostras coletadas das fezes de *D. rotundus* em condições naturais. A identificação se deu tanto pela análise PCR-RFLP quanto pela técnica de seqüenciamento de DNA para aquelas amostras em que as enzimas de restrição não atuaram. Nestes casos, a análise dos fragmentos amplificados não digeridos que foram seqüenciados indicou a presença apenas do DNA do morcego. Esse fato já tinha sido previsto no nosso estudo preliminar (Capítulo 1) com morcegos em

cativeiro, no qual algumas amplificações clivadas pelas enzimas de restrição ainda tinham produto da PCR de 380 pb, provavelmente oriundo do DNA amplificado do morcego. Uma provável explicação para a falta de DNA da presa nas fezes é a quantidade limitada de fezes coletada de cada morcego no campo. Em cativeiro, a abundância de alimento oferecido aos morcegos aumenta as chances das fezes conter grande quantidade de DNA da presa. No campo, muitos dos morcegos capturados não estavam com o estômago cheio. Desta forma, cada amostra podia ter uma proporção muito pequena do DNA da presa, impossibilitando uma amplificação de boa qualidade para a digestão enzimática. De fato, a maioria das amostras coletadas foi suficiente apenas para uma extração de DNA, indicando que os morcegos tinham ingerido pouco sangue da presa na noite da captura.

O sucesso nas amplificações do DNA aqui observado (66%) foi semelhante ao encontrado em outros estudos que usaram DNA degradado para investigar a relação presa-predador em condições naturais (Farrell *et al.*, 2000; Lucchini *et al.*, 2002; Agustí *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Juen & Traugott, 2007). Entretanto, menos da metade (44%) das amostras fecais coletadas no lago Ayapuá puderam ser identificadas, comparado com 72,7% de identificações positivas dos rios Madeira-Aripuanã. Este baixo número de amplificações provavelmente está relacionado às condições inadequadas de armazenamento das amostras durante as excursões no lago Ayapuá, como mencionado nos métodos descritos. Por outro lado, todas as amostras fecais coletadas nas excursões dos rios Madeira-Aripuanã foram acondicionadas em freezer. A degradação do DNA por endonucleases pode ser evitada em condições de baixa temperatura, dessecação rápida e alta concentração de sal (Frantzen *et al.*, 1998; Nsubuga *et al.*, 2004). Um estudo realizado nos Alpes Italianos mostrou um sucesso de amplificação maior em amostras fecais de lobos (*Canis lupus*) coletadas na estação fria (Lucchini *et al.*, 2002). Em um local quente e úmido como a Amazônia, secar as fezes em sílica não foi suficiente para preservar o DNA das presas e nós, portanto, recomendamos fortemente, em estudos futuros, o imediato congelamento das amostras e manutenção das mesmas a baixas temperaturas após as coletas.

Ecologia da alimentação de *Desmodus rotundus*

As áreas de estudo possuem uma variedade de paisagens formadas por várzea, igapó, terra firme, floresta ombrófila densa, campinaranas e campinas, o que provavelmente ocasiona a existência de uma alta diversidade beta, tanto em termos de espécies vegetais como animais (Haugaasen & Peres, 2005; Rapp Py-Daniel *et al.*, 2007). Mamíferos de médio e

grande porte como paca, cutia, anta, primatas e várias espécies de aves estão presentes na região, principalmente nas áreas de baixa densidade populacional da RDS Piagaçu-Purus e rio Aripuanã (Haugaasen & Peres, 2005; Cohn-Haft *et al.*, 2007; Röhe, 2007). Estes animais silvestres são a fonte original de alimento para morcegos hematófagos, ou seja, constituem-se nas espécies para quais os vampiros adaptaram o seu comportamento alimentar, considerando a escala de tempo evolutivo.

Diversos estudos têm mencionado que mamíferos de médio e grande porte são as principais fontes de alimento de *D. rotundus* (Greenhall *et al.*, 1983; Voigt & Kelm, 2006). Os resultados das análises moleculares em nosso estudo não mostraram o consumo de animais selvagens na análise das 58 amostras fecais coletadas em ambientes antropizados. Morcegos hematófagos visitam usualmente apenas uma presa por noite (Wilkinson, 1988). A ausência de DNA de animais selvagens nas fezes sugere que provavelmente os morcegos analisados não haviam se alimentado deles anteriormente. Isso apóia a hipótese da grande adaptabilidade de *D. rotundus* a mudanças ambientais, aproveitando-se oportunisticamente da grande disponibilidade de alimento de mamíferos e aves domésticos geralmente disponíveis em pequenas e médias comunidades rurais.

A ausência da detecção de DNA de animais silvestres nas fezes dos morcegos hematófagos capturados indica que as áreas das comunidades tornaram-se os lugares prioritários para a alimentação dessas populações. A busca de alimento por parte dos morcegos hematófagos em áreas de comunidades humanas pode também ser estimulada pela caça, que virtualmente elimina mamíferos e aves silvestres de maior porte das áreas no entorno das comunidades. Animais domésticos são presas fáceis devido ficarem confinados em um cercado ou galinheiro durante a noite e não possuem adaptações contra tais predadores, representando uma fonte de alimento acessível, constante e abundante (Greenhall, 1988; Turner, 1975; Voigt & Kelm, 2006). Mesmo assim, o uso de animais selvagens não pode ser descartado e provavelmente ocorre em menor escala, fora dos arredores das comunidades, o que dificulta a captura desses morcegos para análises molecular a partir de amostras de fezes. Devido à pequena taxa de captura de morcegos hematófagos em ambientes de floresta primária (Bernard, 2001; Bobrowiec, 2003; Peters *et al.*, 2006) torna-se difícil investigar o hábito alimentar original dessas espécies em habitats não-antropizados.

Em locais onde existe a criação de bovinos, ocorre geralmente o aumento das populações de *D. rotundus* (Greenhall, 1988; Delpietro *et al.*, 1992). Nossos dados mostraram, no entanto, que a espécie de presa mais atacada por este morcego, nas condições ambientais das áreas de estudo, foram as galinhas. Contudo, quando a proporção de presas

disponíveis foi estimada, nossos resultados indicaram que *D. rotundus* apresentou preferência por porcos. A criação de porcos não foi muito freqüente entre as comunidades ribeirinhas estudadas e o número de animais também foi baixo. Por outro lado, todas as comunidades possuíam galinhas e praticamente cada casa tinha um galinheiro com 5 a 15 animais. Mesmo assim, porcos representaram um terço da dieta de *D. rotundus* nas áreas de estudo.

Nós argumentamos que animais de médio e grande porte podem suportar o ataque de mais de um morcego em uma mesma noite e assim sustentar e atrair mais indivíduos. Isso poderia explicar o alto consumo de porcos por *D. rotundus*. Além disso, a criação desses animais em cercados facilita a predação pelos morcegos. Na comunidade Caviana, lago Ayapuá, e Itapinima, rio Madeira, foram observados porcos sendo sangrados por dois indivíduos de *D. rotundus* ao mesmo tempo. Galinhas pelo contrário, morrem quando atacadas constantemente (Uieda, 1994). O mesmo autor observou, por outro lado, que porcos grandes mantidos em cativeiro podem ser visitados por vários indivíduos de *D. rotundus* ao mesmo tempo.

Presas maiores também tendem a atrair os morcegos para se alimentarem nas comunidades. No lago Ayapuá, três indivíduos de *D. rotundus* que se alimentaram de porcos foram capturados fora da comunidade que tinha este recurso. Estes morcegos provavelmente estavam se dirigindo a um abrigo e não procurando mais alimento em outro lugar. Os dados de recaptura também mostraram que os morcegos puderam se deslocar facilmente entre as comunidades em um curto período de tempo (1 a 7 dias). Wilkinson (1984) demonstrou que *D. rotundus* pode voar em uma noite o dobro da distância entre o abrigo diurno e o local de forrageio. Estas informações sugerem que *D. rotundus* pode procurar alimento em mais de uma comunidade, alternando o consumo de aves e mamíferos em diferentes noites.

Dados morfológicos e comportamentais apóiam o consumo de mamíferos por *D. rotundus*, mas as causas reais que levam à sua preferência ainda são desconhecidas. Características da capacidade locomotora quadrúpede de *D. rotundus* favorecem o consumo de mamíferos (Schutt, 1998). No geral, morcegos vampiros são muito ágeis e exibem movimentos quadrúpedes bastante complexos, mas *D. rotundus* é o único entre os morcegos hematófagos que pode correr e iniciar o vôo pulando do chão (Schutt & Simmons, 2006). Essa habilidade permite que este morcego se aproxime de grandes presas como bois ou outros mamíferos que durmam no chão, pois pode escapar levantando vôo rapidamente para evitar ser pisoteado (Schutt & Simmons, 2006).

Uieda (1992) observou que em locais onde são criadas galinhas e bovinos próximos um do outro, *D. rotundus* não procurou visitar os galinheiros todas as noites. Este autor sugere

que galinhas são exploradas como uma fonte secundária e alternativa de alimento quando bovinos estão disponíveis. Nós acreditamos que a quantidade de porcos disponíveis talvez não seja suficiente para sustentar a população de morcegos que forrageiam nas comunidades. Por isto, galinhas constituem uma fonte indispensável de alimento, o que justifica seu alto consumo. Em todas as comunidades onde havia porcos, também foi identificada a predação de galinhas pelas análises por PCR-RFLP. *Desmodus rotundus* é altamente suscetível à privação de alimento devido sua incapacidade de manter níveis adequados de glicose no sangue, a ponto de morrer após 2-3 noites consecutivas sem se alimentar (Freitas *et al.*, 2003). Estima-se que 30% dos indivíduos de uma população deste morcego não conseguem alimento todas as noites (Wilkinson, 1984). Como uma alternativa compensatória de sobrevivência por mais uma noite, morcegos aparentados podem compartilhar alimento através regurgitação de sangue (Wilkinson, 1985).

Pelas informações acima citadas, *D. rotundus* utiliza preferencialmente mamíferos, mas a identificação de boi e cachorro nas amostras fecais dos morcegos foi baixa, considerando a abundância desses animais em algumas comunidades. Em um trecho de 47 km do rio Madeira, três comunidades somaram quase 100 cabeças de gado. Cachorros ocorreram em todos os locais visitados. Nossas observações de campo e os relatos dos ribeirinhos confirmaram que alguns cachorros eram constantemente atacados.

O fato de cães e bois terem sido pouco representados em nossos resultados (n=3) pode ser devido a uma consequência do método de captura dos morcegos. Provavelmente nós não conseguimos capturar os morcegos que se alimentaram de bois e cachorros, na frequência que estes ataques ocorriam naturalmente nas localidades. Isto deve estar relacionado ao fato destes animais serem mantidos livres na área das comunidades. Durante as noites de capturas, eles ficavam agitados com a nossa presença e se afastavam dos locais onde as redes estavam armadas. Muitos dos cachorros permaneciam latindo durante a noite toda devido estarem incomodados com pessoas andando na comunidade em um horário incomum. No lago Ayapuá, no Baía, os bois sempre fugiram do cercado quando chagávamos a noite para abrir as redes. Esse comportamento dificultava não só a captura dos morcegos, mas possivelmente evitava que estas presas fossem atacadas naquela noite. Delpietro (1989) observou que quando bovinos e eqüinos dispersam o grupo pelo pasto ou ficam se movimentando a noite, esse comportamento diminui o risco de predação por morcegos hematófagos.

Somente na comunidade cachoeirinha, no rio Madeira, os bois eram mantidos em um cercado de 15 x 15 m. Nós constatamos que os animais eram atacados há bastante tempo por causa da grande quantidade de fezes encontradas em um abrigo noturno dos morcegos,

localizado ao lado do cercado. O confinamento dos animais permitiu a captura dos dois morcegos que tiveram amostras fecais coletadas com identificação positiva para boi após a análise por PCR-RFLP. Nas comunidades Bacuri e Pinheiros do lago Ayapuá foram capturados três indivíduos de *D. rotundus* com o estômago cheio, após terem atacado os cachorros que dormiam próximos das redes. Como mencionado anteriormente, a falta de um freezer para armazenar as amostras, provavelmente não permitiu preservar de forma adequada o DNA das presas para as análises moleculares.

Considerando que no lago Ayapuá alguns morcegos foram capturados distantes da fonte de alimento, a sub-amostragem de bois e cachorros provavelmente não influenciou nossa conclusão sobre a preferência de *D. rotundus* por mamíferos. Morcegos que se alimentaram de cachorros e bois também poderiam ter sido capturados nas redes armadas longe desses animais, como ocorreu com quatro indivíduos de *D. rotundus* que se alimentaram de porcos e foram capturados em comunidade que não possuíam esta presa.

Dieta de *Diaemus youngi*

A técnica de PCR-RFLP também mostrou-se eficaz no estudo da dieta de *Diaemus youngi*, como indicado pelas análises das amostras deste morcego coletadas em campo. *Diaemus youngi* é conhecido na literatura por preferir sangue de aves (Sazima & Uieda, 1980; Carter *et al.*, 2006), mas ocasionalmente pode consumir o sangue de mamíferos (Gardner, 1977; Uieda, 1992, 1993). Um estudo feito em cativeiro mostrou que esta espécie também pode se alimentar de suínos e caprinos, mas somente quando galinhas não eram oferecidas aos morcegos (Uieda, 1994).

Nossos resultados mostraram que, de fato, o principal item consumido por *D. youngi* foram galinhas. Uma das amostras analisadas indicou o consumo de porco. Provavelmente, este é o primeiro registro que comprova o consumo do sangue de um mamífero, no caso porco, feito por *D. youngi* na natureza. Este indivíduo de *D. youngi* foi recapturado uma vez e a análise das duas amostras fecais coletadas mostraram o consumo do sangue de galinha e porco, indicando a flexibilidade alimentar deste morcego hematófago. Devido ao tamanho amostral reduzido para esta espécie, nós não pudemos inferir sobre a frequência com que mamíferos podem ser atacados por *D. youngi*, mas possivelmente ocorre quando este morcego não encontra aves domésticas ou selvagens para se alimentar. A competição com *D. rotundus* por galinhas associada à falta de aves selvagens próximas a comunidade podem ter forçado *D.*

youngi a atacar porcos. Esta presa pode suportar o ataque de vários morcegos em uma noite (Uieda, 1994).

Seres humanos como fonte de alimento para *Desmodus rotundus*

Relatos de pessoas atacadas por morcegos hematófagos são comuns em regiões remotas da América do Sul (McCarthy, 1989; López *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1996, 2001; Warner *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2006; Uieda *et al.*, 2002). Embora não tenham sido coletadas amostras fecais contendo DNA humano, ataques causados por *D. rotundus* em pessoas foram registrados em dois locais. A diferença dos ataques a humanos foi sua frequência e abrangência do número de pessoas atacadas entre essas comunidades. Em Tucunaré, rio Aripuanã, os ataques eram comuns e estavam ocorrendo há muito tempo, enquanto que em Porto Seguro, rio Madeira, os ataques estavam concentrados somente em uma casa e esta era a primeira vez que os moradores registraram ataques por morcegos hematófagos na comunidade. As habitações dos ribeirinhos possuíam diversas aberturas que permitiam a entrada de morcegos ao interior das mesmas, característica também observada nas moradias das outras comunidades. Os animais de criação e domésticos usados na alimentação de *D. rotundus* consistiam de galinhas e cachorros. A diferença entre essas duas comunidades esteve relacionada à criação de porcos em Tucunaré, os quais eram atacados por *D. rotundus*. No entanto, em outras quatro comunidades visitadas neste estudo observou-se também que os moradores criavam porcos, mas não foram relatados casos de pessoas atacadas nestes locais. Isso indica que, a princípio, o tipo de presa disponível nas comunidades parece não influenciar o ataque de morcegos hematófagos a humanos.

Uma característica contrastante entre as duas comunidades foi o número de moradias e conseqüentemente o número de pessoas que habitavam cada local. A comunidade Tucunaré possuía cinco casas, enquanto que na comunidade Porto Seguro vivia mais de 50 famílias. Além disso, Porto Seguro era contígua à comunidade Jenipapo, que juntas somavam mais de 500 pessoas em um trecho de 2 km ao longo da margem do rio Madeira. Embora não testado no presente estudo, a densidade populacional e o grau de perturbação das comunidades ribeirinhas visitadas provavelmente não foram características cruciais que determinaram o uso de pessoas como fonte de alimento por *D. rotundus*.

Os motivos que levam morcegos hematófagos a se alimentar de humanos ainda são desconhecidos. O fato dos ataques a humanos ter ocorrido somente em alguns lugares sem que houvesse alguma característica marcante em termos de recursos alimentares ou abrigos

nas comunidades, sugere que este comportamento pode ser aprendido por uma proporção de indivíduos das populações de *D. rotundus* em determinados locais. Ataques a seres humanos provavelmente começam a ocorrer nas comunidades quando as populações dos morcegos aumentam muito, excedendo a quantidade de alimento disponível. Neste momento, a competição por alimento e a defesa por território dificulta que morcegos jovens, que saíram de sua colônia recentemente, se alimentem dos animais domésticos. Devido à escassez de presas, estes morcegos passam a usar seres humanos como uma fonte alternativa de alimento. Isso pode estar acontecendo na comunidade Porto Seguro, pois segundo os moradores o ataque a humanos registrado aqui foi o primeiro a ocorrer na comunidade. Este evento ainda é raro no local e estão concentrados somente em uma família cuja casa esta localizada no meio da área da comunidade, sugerindo que o hábito de se alimentar de pessoas não esta fixado na população de *D. rotundus* local.

Durante o cuidado parental das fêmeas, este habito alimentar pode ser aprendido pelos filhotes e fixado na população dos morcegos. Jovens de *D. rotundus* podem ser alimentados por regurgitação de sangue pelas mães (Wilkinson, 1984; Delpietro & Russo, 2002). Se o sangue humano for repassado para os filhotes, esses morcegos passam a reconhecer o sangue desta presa como um item da sua dieta. Fêmeas também escoltam seus filhotes até as presas (Wilkinson, 1985), que acabam aprendendo como se aproximar para se alimentar de humanos. Quando o tamanho da população de morcegos se normaliza, o habito de se alimentar em humanos provavelmente persiste.

Em um povoado de Belize foi registrado um surto de ataques por *D. rotundus* após os porcos, a principal fonte de recurso dos morcegos, terem sido eliminados (McCarthy, 1989). Resultados semelhantes foram observados em um vilarejo no Peru, com aumento da utilização de sangue humano após a eliminação dos porcos (López *et al.*, 1992). No nordeste brasileiro, o transporte do gado para uma região diferente a procura de pastagens melhores durante a estação seca, pode ter sido a causa do aumento em de ataques a humanos neste período (Gonçalves *et al.*, 2002). Isso indica que quando a população dos morcegos passa por privação de alimento, presas alternativas passam a ser mais intensamente atacadas. Por isso, é possível prever o aumento do número de ataques a humanos em comunidades como a de Tucunaré, caso os porcos sejam eliminados e medidas preventivas do controle da população dos morcegos hematófagos não forem tomadas com antecedência.

Os resultados descritos aqui mostraram que a técnica de PCR-RFLP foi muito útil no estudo da dieta de morcegos hematófagos que forrageiam em áreas de comunidades humanas na Amazônia brasileira. Esta técnica fornece uma identificação rápida, econômica e precisa

das espécies de presas mais atacadas por morcegos hematófagos. Sua aplicação é ideal para pequenos laboratórios, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, pois não requer altos custos para a sua execução. Técnicas mais onerosas de seqüenciamento foram exigidas somente em 17% das amostras. Nós observamos que *D. rotundus* atacou somente as espécies de presas presentes na área das comunidades, com grande consumo de galinhas e porcos. A flexibilidade da dieta de *D. rotundus* foi favorecida pela diversidade de animais domésticos e de criação presentes nas comunidades, embora nossos resultados indicaram preferência por porcos.

Desmodus rotundus não possui a capacidade de armazenar energia por muito tempo, o que indica uma atividade alimentar intensa. Porcos podem resistir o ataque de vários morcegos em uma mesma noite e por isso representam uma importante fonte de alimento para morcegos vampiros. As pessoas tornam-se suscetíveis a ataques por *D. rotundus* nas condições encontradas nas comunidades estudadas, especialmente se ocorrer diminuição abrupta na disponibilidade de animais domésticos e se alguns hematófagos da população local tiverem experiências anteriores bem sucedidas na obtenção de sangue humano.

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.

Comunidades	Presas					Capturas	
	Moradias	Galinheiros	Bois	Porcos	Cachorros	<i>D. rotundus</i>	<i>D. youngi</i>
Lago Ayapuá, rio Purus							
1 Pinheiros	4	8	0	0	6	25	3
2 Caviana	4	5	0	3	5	25	1
3 Bacuri	7	5	0	0	11	12	0
4 Baia	1	2	10	0	2	11	0
5 Evaristo	3	4	0	0	6	13	0
Rio Madeira							
6 Cachoeirinha	8	nd	20	0	nd	3	0
7 Porto Seguro	>50*	nd	0	0	nd	12	0
8 Jenipapo	>50	nd	0	0	nd	15	0
9 Macaco Prego	8	4	0	0	nd	0	0
10 Itapenima	4	3	47	4	nd	8	0
11 Vencedorzinho	4	4	0	2	nd	6	1
12 Realeza	2	1	0	0	nd	0	0
13 São Carlos	3	2	30	0	nd	1	0
14 Santa Rosa	6	5	0	0	nd	5	0
15 Santa Rita	6	2	0	0	nd	1	0
Rio Aripuanã							
16 Tucunaré	5*	nd	0	10	nd	7	0
17 São Miguel	5	5	0	2	nd	13	1
18 Arauazinho	5	1	0	0	nd	0	0

* comunidade com pessoas atacadas pelo morcego hematófago *D. rotundus*.

Tabela 2. Dados de captura dos morcegos hematófagos, número de amostras fecais coletadas, ampliações 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.

Locais	Noites	Capturas		Amostras fecais	PCR positivo	Identificação positiva
		<i>D. rotundus</i>	<i>D. youngi</i>			
Rio Madeira e Aripuanã	17	71	2	33 (2)	26 (2)	24 (1)
Lago Ayapuá *	30	86	4	55 (4)	32 (4)	24 (3)
Total	47	157	6	88 (6)	58 (6)	48 (4)

* incluindo recapturas

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).

Presa	<i>D. rotundus</i>			<i>D. youngi</i>
	Rio Madeira-Aripuanã	Lago Ayapuá	Total	
Galinha	15 (65,2)	12 (57,1)	27 (61,4)	3 (75,0)
Boi	2 (8,7)	0	2 (4,5)	0
Porco	6 (26,1)	8 (38,1)	14 (31,8)	1 (25,0)
Humano	0	0	0	0
Cachorro	0	1 (4,8)	1 (2,3)	0
Total	23	21	44	4

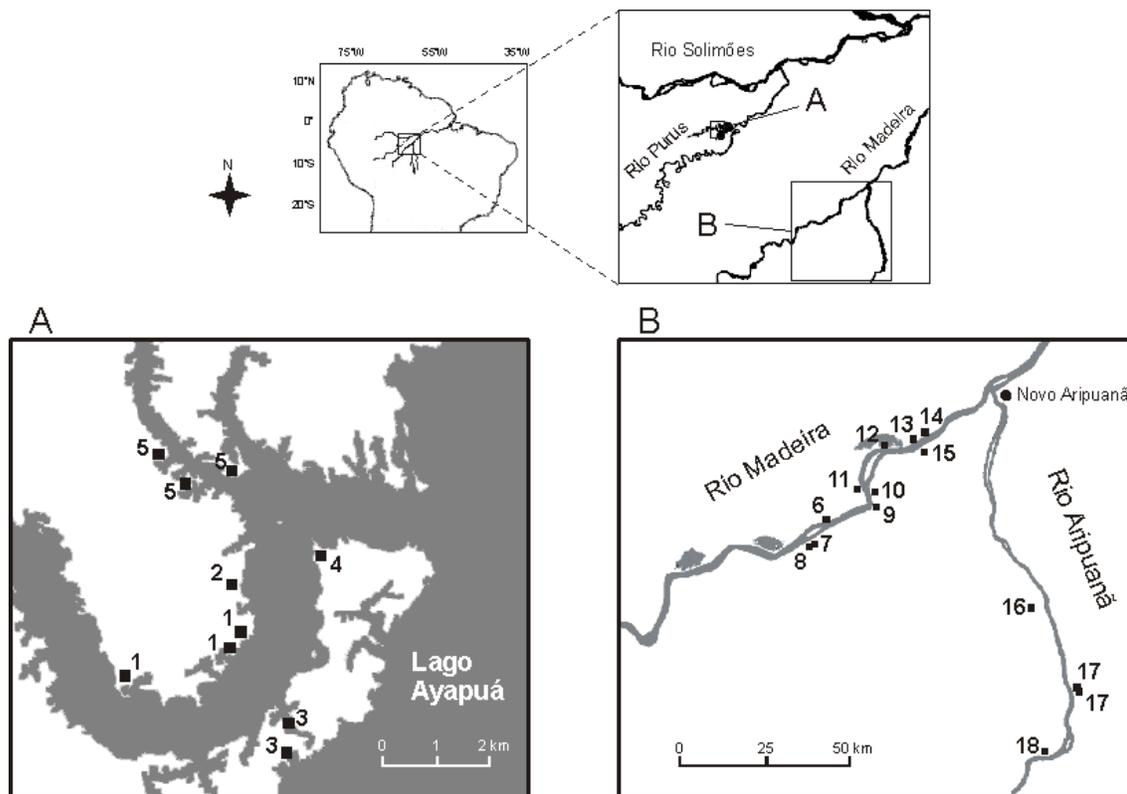


Figura 1. Mapa das áreas de estudo nos rios Madeira, Aripuanã e lago Ayapua, no rio Purus localizados na Amazônia Central. Os quadrados em preto representam os locais de captura dos morcegos hematófagos e os números correspondem as comunidades ribeirinhas amostradas. Para detalhes dos nomes das comunidades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



Figura 2. Comunidades ribeirinhas amostradas e redes 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.



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 contraída 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.



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 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.

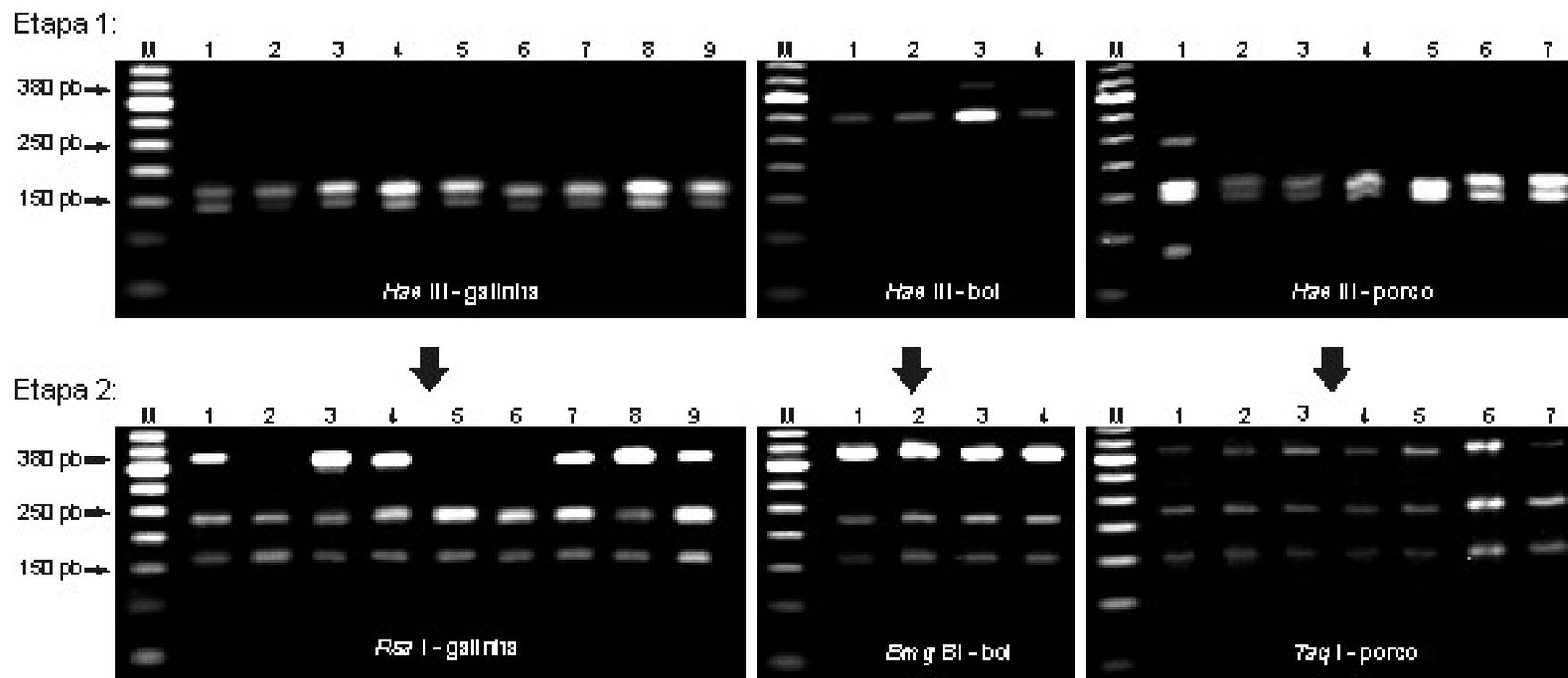


Figura 5. Padrões de restrição gerados pela análise PCR-RFLP a partir de amostras de fezes dos morcegos capturados nas comunidades ribeirinhas. Em cada mini-gel, as duas últimas colunas mostram produtos amplificados a partir do DNA do sangue da presa e as demais colunas correspondem a amostras de fezes.

CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas no presente estudo quanto a utilização de técnicas moleculares na identificação das presas atacadas por morcegos hematófagos, bem como sobre a preferência alimentar desses morcegos, são resumidas abaixo:

Capítulo 1.

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

- O método utilizado (CTAB modificado) para extração do DNA genômico total, tanto de amostras de sangue das cinco espécies de presas estudadas (galinha, boi, porco, humano e cachorro), quanto das fezes de *D. rotundus*, alimentado em cativeiro com sangue destas presas, foi extremamente eficiente mostrando excelente qualidade e quantidade do DNA.
- Os marcadores universais utilizados para amplificar uma região do gene *citocromo b* do genoma mitocondrial de vertebrados possibilitaram obter via PCR, um fragmento de 380 pb a partir do DNA extraído de amostras de sangue de cinco espécies de presas (galinha, boi, porco, humano e cachorro), assim como das amostras fecais de *D. rotundus* alimentado com sangue destas mesmas espécies. A amplificação ocorreu com sucesso mesmo considerando-se a possibilidade de degradação do DNA durante a passagem pelo trato digestivo do morcego.
- O seqüenciamento dos produtos da PCR obtido do DNA extraído de amostras de fezes do morcego *D. rotundus* alimentado em cativeiro com sangue das cinco espécies de presa testadas e sua comparação com seqüências da mesma região do genoma depositadas no banco de dados do GenBank, permitiram validar a origem do DNA analisado (presa ou do morcego *D. rotundus*). Os resultados mostraram que o DNA amplificado das amostras de fezes correspondeu em todos os casos, ao DNA da espécie de presa cujo sangue foi utilizado para alimentar o morcego em cativeiro.
- A técnica PCR-RFLP mostrou-se uma ferramenta útil na identificação inequívoca das espécies de presas (galinha, boi, porco, homem e cachorro) atacadas por *D. rotundus*, a

partir de análises do DNA extraído das fezes do morcego. Cinco enzimas de restrição (*Hae III*, *Rsa I*, *Xho I*, *Bmg BI* e *Taq I*) foram selecionadas e testadas neste estudo. O uso da enzima *Hae III* em combinação com uma das outras quatro enzimas, produziu padrões de fragmentos diferentes para as espécies de presas testadas, permitindo a identificação de cada espécie de presa pela análise PCR-RFLP utilizando duas enzimas de restrição apenas. A técnica permite também quantificar o uso desses recursos em condições naturais, tornando possível conhecer a preferência por tipo de presa, variação sazonal no consumo dos diferentes recursos disponíveis, diferenças na preferência alimentar entre machos e fêmeas e diferenças populacionais.

- Os padrões de clivagem esperados, a partir da análise dos sítios de restrição presentes no fragmento homólogo ao citocromo b utilizado neste estudo para espécies de mamíferos e aves selvagens, potencialmente atacadas por *D. rotundus* na Amazônia brasileira, mostraram-se totalmente diferenciados daqueles encontrados para as cinco espécies de presas domésticas testadas. Isso demonstra que a combinação das enzimas de restrição utilizadas no presente estudo permite a identificação inequívoca de galinha, boi, porco, homem e cachorro, sem a possibilidade de confundir com espécies de presas silvestres do morcego.
- A técnica PCR-RFLP mostrou-se como um método mais econômico e rápido no estudo sobre a caracterização da dieta do morcego hematófago *D. rotundus*, comparada com técnicas que envolvem o seqüenciamento direto do produto da PCR.

Capítulo 2.

Caracterização da dieta do morcego hematófago *Desmodus rotundus* na Amazônia brasileira usando a técnica molecular PCR-RFLP

- No presente estudo foi possível detectar, com base no método PCR-RFLP desenvolvido, quatro espécies de presas na dieta de *D. rotundus* coletados em condições naturais. Não houve dúvidas quanto a identificação das presas em nenhuma das amostras analisadas a partir de fezes de *D. rotundus*. A investigação realizada em comunidades ribeirinhas localizadas no médio rio Madeira, rio Aripuanã e lago Ayapuá, rio Purus, mostrou que galinha foi a espécie de presa mais consumida (62% das amostras) por *D. rotundus*, seguida por porco (31%), boi (4%) e cachorro (2%). A análise não indicou o consumo de

animais silvestres pelo morcego, sugerindo que os morcegos estão visitando as comunidades humanas somente em busca de alimento. O consumo de sangue de animais silvestres por parte dos vampiros capturados nestas comunidades provavelmente é inexistente ou raro.

- As poucas comunidades que criavam porcos apresentavam grande concentração de indivíduos de *D. rotundus* com DNA de este suíno nas fezes. Comparado com galinhas, os porcos possuem porte maior e por isso podem ser atacados por vários morcegos em uma mesma noite, permitindo provavelmente a manutenção de uma população maior de morcegos do que em comunidades onde são criadas apenas galinhas. Mesmo assim, galinha constitui um recurso alimentar presente em todas as comunidades, sendo importante especialmente onde não há criação de porcos e outros animais de maior porte.
- O acondicionamento em baixas temperaturas (-20 °C) das amostras fecais coletadas é essencial para o sucesso de amplificação do DNA extraído dessas fezes.
- Os dados de recaptura dos morcegos marcados no lago Ayapuá, mostraram que indivíduos de *D. rotundus* se movimentam com frequência entre as comunidades, especialmente aquelas localizadas em uma mesma margem de rio. A identificação por PCR-RFLP das presas atacadas, associada a sua disponibilidade nas comunidades, revelou que *D. rotundus* pôde voar distâncias de aproximadamente 5 km em uma mesma noite, incluindo cruzar rios de 1,5 km de largura.
- Também foi possível identificar com o método PCR-RFLP desenvolvido, itens da dieta de outra espécie de morcego hematófago *Diaemus youngi*. Este morcego teve preferência por sangue de galinhas sendo que porco também foi detectado como fonte de alimento. *Diaemus youngi* é conhecido por ter hábito alimentar especializado em aves e o consumo de sangue de mamíferos por *D. youngi* é considerado um evento raro na literatura. Por isso, este é o primeiro registro confirmando o consumo de sangue de um mamífero por *D. youngi* em condições naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acha, P.N. e Malaga-Alba, A. 1988. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. In: Greenhal, A.M. e Schmidt, U. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida. p. 246.
- Adams, J.R., Kelly, B.T. e Waits, L.P. 2003. Using faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*). *Molecular Ecology*, 12: 2175–2186.
- Adams, J.R. Lucash, C. Schutte, L. e Waits, L.P. 2007. Locating hybrid individuals in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area using a spatially targeted sampling strategy and faecal DNA genotyping. *Molecular Ecology*, 16: 1823–1834.
- Agustí, N. e Symondson, W.O.C. 2001. Molecular diagnosis of predation. *Antenna*, 25: 250–253.
- Agustí, N., de Vicente, C. e Gabarra, R. 1999. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction based technique for predator gut analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1467–1474.
- Agustí, N., de Vicente, C. e Gabarra, R. 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*, 9: 263–268.
- Agustí, N., Shayler, S.P., Harwood, J.D., Vaughan, I.P., Sunderland, K.D. e Symondson, W.O.C. 2003. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Molecular Ecology*, 12: 3467-3475.
- Agustí, N., Bourguet, D., Spataro, T., Delos, M., Eychenne, N., Folchers, L., e Arditi, R., 2005. Detection, identification and geographical distribution of European corn borer larval parasitoids using molecular markers. *Molecular Ecology*, 14: 3267–3274.
- Ansell, J., Hu, J.T., Gilbert, S.C., Hamilton, K.A., Hill, A.V.S. e Lindsay, S.W. 2000. Improved method for distinguishing the human source of mosquito blood meals between close family members. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 572-574.
- Arias, M.C. e Infante-Malachias, M.E. 2001. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para a determinação de polimorfismos no DNA. In: Matioli, S.R. (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Holos Editora. Ribeirão Preto. p. 143-152.
- Asahida, T., Yamashita, Y. e Kabayashi, T. 1997. Identification of consumed stone flounder *Kareius bicoloratus* (Basilewsky), from the stomach contents of sand shrimp, *Crangon affinis* (De Hann) using mitochondrial DNA analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 217: 153–163.
- Banks, S.C., Horsup, A. Wilton, A.N. e Taylor, A.C. 2003. Genetic marker investigation of the source and impact of predation on a highly endangered species. *Molecular Ecology*, 12: 1663–1667.
- Bellagamba, F., Moretti, V.M., Comincini, S. e Valfrè, F. 2001. Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3775-3781.
- Bellemain, E., Swenson, J.E., Tallmon, D., Brunberg, S. e Taberlet, P. 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 19: 150-161.
- Belotto, A.J. 2001. Raiva transmitida por morcegos na Américas: impacto na saúde pública e na produção. In: International seminar: bats as rabies transmitter. São Paulo. p. 24-25.

- Bernard, E. 2001. Vertical stratification of bat communities in primary forests of Central Amazon, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 17: 115–126.
- Bidlack, A.L., Reed, S.E., Palsbøll, P.J. e Getz, W.M. 2007. Characterization of a western North American carnivore community using PCR–RFLP of cytochrome *b* obtained from fecal samples. *Conservation Genetics*, (no prelo).
- Bobrowiec, P.E.D. 2003. *Padrão alimentar de morcegos frugívoros em áreas alteradas na Amazônia Central*. INPA/UFAM, Manaus, dissertação de Mestrado. 57p.
- Bobrowiec, P.E.D. 2007. Morcegos (Mammalia: Chiroptera). In: Rapp Py-Daniel, L., Deus, C.P., Henriques, A.L., Pimpão, D.M. e Ribeiro, O.M. (Eds.). *Biodiversidade do médio Madeira: bases científicas para propostas de conservação*. INPA, Manaus. p. 211-224.
- Boreham, P.F.L. 1975. Some applications of bloodmeals identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 83-91.
- Brass, D.A. 1994. *Rabies in bats: natural history and public health implications*. Livia Press, Ridgefield, Connecticut.
- Bull, C.G e King, W.V. 1923. The identification of the bloodmeal of mosquitoes by means of the precipitin test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3: 491-496.
- Calcagnoto, D. 2001. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: Matioli, S.R. (Ed.). *Biologia molecular e evolução*. Holos Editora. Ribeirão Preto. p. 52-63.
- Caraballo, A.J. 1996. Outbreak of vampire bat biting in a Venezuelan village. *Revista de Saúde Pública*, 30: 483-484.
- Carter, G.G., Coen, C.E., Stenzler, L.M. e Lovette, I.J. 2006. Avian host DNA isolated from the feces of white-winged vampire bats (*Diaemus youngi*). *Acta Chiropterologica*, 8: 255–274.
- Casement N 2001. *Dietary niche separation of Parus major and Parus caeruleus? Evidence from molecular scatology*. Undergraduate Dissertation, Oxford University (UK).
- Céspedes, A., García, T., Carrera, E., González, I., Sanz, B., Hernández, P.E. e Martín, R. 1998. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome *b* gene. *Journal of Food Science*, 63: 206-209.
- Chen, Y., Giles, K.L., Payton, M.E. e Greenstone, M.H. 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1887–1898.
- Chow-Shaffer, E., Sina, B., Hawley, W.A., de Benedictis, J. e Scott, T.W. 2000. Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 37: 492-502.
- Cohn-Haft, M., Pacheco, A.M.F., Bechtoldt, C.L., Torres, M.F.N.M., Fernandes, A.M., Sardelli, C.H. e Macêdo, I.T. 2007. Inventário ornitológico. In: Rapp Py-Daniel, L., Deus, C.P., Henriques, A.L., Pimpão, D.M. e Ribeiro, O.M. (Eds.). *Biodiversidade do médio Madeira: bases científicas para propostas de conservação*. INPA, Manaus. p. 145-178.
- Colombo, F., Viacava, R. e Giaretti, M. 2000. Differentiation of the species ostrich (*Struthio camelus*) and emu (*Dromaius novaehollandiae*) by polymerase chain reaction using an ostrich-specific primer pair. *Meat Science*, 56: 15-17.

- Constantine, D.G. 1970. Bats in the relation to the health, welfare, and economy of man. In: Wimsatt, W.A. (Ed.). *Biology of bats*. Academic Press, New York.
- Constantine, D.G. 1988. Transmission of pathogenic microorganism by vampire bats. In: Greenhall, A.M. e Schmidt, U. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida.
- Crespo, R.F., Vanella, J.M., Blood, B.D. e Carlo, J.M. 1961. Observaciones ecologicas del vampiro *Desmodus rotundus* (Geoffroy) en el norte de Cordoba. *Rev. Mus. Argent. Cin. Nat. Bernardino Rivadavia*, 6: 131-160.
- Crespo, R.F., Burns, R.J. e Linhart, S.B. 1971. Comportamiento del vampiro (*Desmodus rotundus*) durante su alimentacion en ganado bovino en cautiverio. *Tec. Pec. Mex.*, 18: 40-44.
- Dallas, J.F., Coxon, K.E., Sykes, T., Chanin, P.R.F., Marshall, F., Carss, D.N., Bacon, P.J., Piertney, S.B. e Racey, P.A. 2003. Similar estimates of population genetic composition and sex ratio derived from carcasses and faeces of Eurasian otter *Lutra lutra*. *Molecular Ecology*, 12: 275-282.
- Davison, A., Birks, J.D.S., Brooks, R.C. Braithwaite T.C. e Messenger J.E. 2002. On the origin of faeces: morphological versus molecular methods for surveying rare carnivores from their scats. *Journal of Zoology*, 257:141-143.
- Deagle, B.E., Tollit, D.J., Jarman, S.N., Hindell, M.A., Trites, A.W. e Gales, N.J. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology*, 14: 1831-1842.
- Deagle, B.E. e Tollit, D.J. 2007. Quantitative analysis of prey DNA in pinniped faeces: potential to estimate diet composition? *Conservation Genetics*, 8: 743-747.
- Delpietro, H.A. 1989. Case reports on defensive behaviour in equine and bovine subjects in response to vocalization of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 22: 377-380.
- Delpietro, H.A., Marchevsky, N. e Simonetti, E. 1992. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in north-east Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 14: 13-20.
- Delpietro, H., Konolsaisen, F., Marchevsky, N. e Russo, G. 1994. Domestic cat predation on vampire bats (*Desmodus rotundus*) while foraging on goats, pigs, cows and human beings. *Applied Animal Behavior Science*, 39: 141-150.
- Delpietro, V.A. e Russo, R.G. 2002. Observations of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) and the hairy-Legged vampire bat (*Diphylla ecaudata*) in captivity. *Mammalian Biology*, 67: 65-78.
- DeWoody, J.A., Fletcher, D.E., Wilkins, S.D. e Avise, J.C. 2001. Genetic documentation of filial cannibalism in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 5090-5092.
- Dowling, E.T., Moritz, C. e Palmer, J.D. 1990. Nucleic acids II: restriction sites analysis. In: Hillis, D.M. e Moritz, C. (Eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Massachusetts. p. 250-317.
- Doyle, J.J. e Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Dye, C. 1990. Epidemiologic significance of vector parasite interactions. *Parasitology*, 101: 409-415.
- Evans, B.S., White, R.W.G. e Ward, R.D. 1998. Genetic identification of asteroid larvae from Tasmania, Australia, by PCR-RFLP. *Molecular Ecology*, 7: 1077-1082.
- Farrell, L.E., Roman, J. e Sunquist, M.E. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9: 1583-1590.

- Fedriani, J.M. e Michael, H.K. 2001. Genotyping faeces links individuals to their diet. *Ecology Letters*, 4: 477-483.
- Fenolio, D.B., Graening, G.O., Collier, B.A. e Stout, J.F. 2006. Coprophagy in a cave-adapted salamander; the importance of bat guano examined through nutritional and stable isotope analyses. *Proceedings of the Royal Society, B*, 273: 439-443.
- Fenton, B.M. 1992. Wounds and the origin of blood-feeding in bats. *Biological Journal of the Linnean Society*, 47: 161-171.
- Fleming, T.H., Nunez, R.A. e Sternberg, L.S. 1993. Seasonal-changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia*, 94: 72-75.
- Fleming, T.H. 1995. The use of stable isotopes to study the diets the plant-visiting bats. In: Racey, P.A. e Swift, S.M. (Eds). *Ecology, evolution and behavior of bats*. Zoological Society of London, Clarendon Press, Oxford, p. 99-110.
- Flores-Crespo, R. e Arellano-Sota, C. 1991. Biology and control of vampire bat. In: Baer, G.M. (Ed.). *The natural history of rabies*. CRC Press, Florida.
- Frantz, A.C., Pope, L.C., Carpenter, P. J., Roper, T.J., Wilson, G.J., Delahay, R.J. e Burke, T. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology*, 12: 1649-1661.
- Frantzen, M.A.J., Silk, J.B., Ferguson, J.W.H., Wayne, R.K. e Kohn, M.H. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*, 7: 1423-1428.
- Freitas, M.B., Welker, A.F., Millan, S.F. e Pinheiro, E.C. 2003. Metabolic responses induced by fasting in the common vampire bat *Desmodus rotundus*. *Journal of Comparative Physiology, B. Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 173: 703-707.
- Gardner, A.L. 1977. Feeding habits. In: Baker, R.J., Jones, J.K. e Carter, D.C. (Eds.). *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae: Part I*. Lubbock, Texas Tech University. p. 293-350.
- Gariepy, T.D. Kuhlmann, U. Gillott, C. e Erlandson, M. 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of arthropods. *Journal of Applied Entomology*, 131: 225-240.
- Gariepy, T.D., Kuhlmann, U., Gillott, C. e Erlandson, M. 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. *Journal of Applied Entomology*, 131: 225-240.
- Gokool, S., Smith, D.F. e Curtis, C.F. 1992. The use of PCR to help quantify the protection provided by impregnated bednets. *Parasitology Today*, 8: 347-350.
- Gokool, S., Curtis, C. F. e Smith, D. F. 1993. Analysis of mosquito bloodmeals by DNA Profiling. *Medical and Veterinary Entomology*, 7: 208-215.
- Gomes, A.C., Silva, N.N., Marques, G.R.A.M. e Brito, M. 2003. Host-feeding patterns of potential human disease vector in the Paraíba valley region, State of São Paulo, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 28: 74-78.
- Gomes, L.A.M., Duarte, R., Lima, D.C., Diniz, B.S., Serrão, M.L. e Labarthe, N. 2001. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fuviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human host. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 693-695.

- Gonçalves, M.A.S., Sá-Neto, R.J., e Brasil, T.K. 2002. Outbreak of aggressions and transmission of rabies in human beings by vampire bats in northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35: 461-464.
- Goodwin, G.G. e Greenhall, A.M. 1961. A review of the bats of Trinidad and Tobago. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 122: 187-301.
- Greenhall, A.M. 1965. Notes on behavior of captive vampire bats. *Mammalia*, 29: 441-451.
- Greenhall, A.M. 1970. The use of a precipitin test to determine host preferences of the vampire bats, *Desmodus rotundus* and *Diaemus youngi*. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 40: 36-39.
- Greenhall, A.M. 1972. The biting and feeding habits of the vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Journal of Zoology*, 168: 451-461.
- Greenhall, A.M., Schmidt, U. e Lopez-Forment, W. 1969. Field observations on the mode of attack of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Mexico. *Anales del Instituto de Biología UNAM serie zoología*, 40: 245-252.
- Greenhall, A.M., Schmidt, U. e Lopez-Forment, W. 1971. Attacking behavior of the vampire bat, *Desmodus rotundus*, under field conditions in Mexico. *Biotropica*, 3: 136-141.
- Greenhall, A.M., Joermann, G. e Schmidt, U. 1983. *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species*, 202: 1-6.
- Greenhall, A.M., Schmidt, U. e Joermann, G. 1984. *Diphylla ecaudata*. *Mammalian Species*, 227: 1-3.
- Greenhall, A.M. 1988. Feeding behavior. In: Greenhall, A. M. and Schmidt, U. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida.
- Greenhall, A.M. e Schutt, W.A. Jr. 1996. *Diaemus youngi*. *Mammalian Species*, 533: 1-7.
- Greenstone, M.H. 2006. Molecular methods for assessing insect parasitism. *Bulletin of Entomological Research*, 96: 1-13.
- Hájková, P., Pertoldi, C., Zemanová, B., Roche, K., Hájek, B., Bryja, J. e Zima, J. 2007. Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. *Journal of Zoology*, 272: 1-9.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Handley, C.O. 1976. Mammals of the Smithsonian Venezuelan Project. *Brigham Young University Science Bulletin, Biological Series*, 20: 1-91.
- Harper, G.L., King, R.A., Dodd, C.S., Harwood, J.D., Glen, D.M., Bruford, M.W. e Symondson, W.O.C. 2005. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Molecular Ecology*, 14: 819-828.
- Haubert, D., Häggblom, M.M., Langel, R., Scheu, S. e Ruess, L. 2006. Trophic shift of stable isotopes and fatty acids in Collembola on bacterial diets. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2004-2007.
- Haugaasen, T. e Peres, C.A. 2005. Mammal assemblage structure in Amazonian flooded and unflooded forests. *Journal of Tropical Ecology*, 21: 133-145.
- Herrera, L.G., Fleming, T.H. e Findley, J.S. 1993. Geographic variation in carbon composition of the pallid bat, *Antrozous pallidus*, and its dietary implications. *Journal of Mammalogy*, 74: 601-606.
- Herrera, L.G., Fleming, T.H. e Sternberg, L.S. 1998. Trophic relationship in a neotropical bat community: a preliminary study using carbon and nitrogen isotopic signatures. *Tropical Ecology*, 39: 23-29.

- Herrera, L.G., Hobson, K.A., Estrada, D., Manzo, A., Méndez, G. e Sánchez-Cordero, V. 2001a. The role of fruits and insects in the nutrition of frugivorous bats: evaluating the use of stable isotope models. *Biotropica*, 33: 520–528.
- Herrera, L.G., Hobson, K.A., Mirón, L., Ramírez, N., Méndez, G. e Sánchez-Cordero, V. 2001b. Sources of protein in two species of phytophagous bats in a seasonal dry forest: evidence from stable-isotope analysis. *Journal of Mammalogy*, 82: 352–361.
- Herrera, L.G., Gutierrez, E., Hobson, K.A., Altube, B., Díaz, W.G. e Sánchez-Cordero, V. 2002. Sources of assimilated protein in five species of New World frugivorous bats. *Oecologia*, 133:280–287.
- Hobson, K.A. 1999. Stable-carbon and nitrogen isotope ratios of songbird feathers grown in two terrestrial biomes: implications for evaluating trophic relationships and breeding origins. *Condor*, 101: 799–805.
- Honacki, J.H., Kinman, K.E. e Koeppi, J.W. 1982. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Hoogendoorn, M. e Heimpel, G.E. 2001. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Molecular Ecology*, 10: 2059–2067.
- Hung, C-M., Li, S-H. e Lee, L.-L. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. *Animal Conservation*, 7: 301–311.
- Husson, A.M. 1962. *The bats of Suriname*. *Zoological Verh*, 58: 1-282.
- Idaghdour, Y., Broderick, D. e Korrida, A. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conservation Genetics*, 4: 789–792.
- Jarman, S.N., Deagle, B.E. e Gales, N.J. 2004. Groupspecific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology*, 13: 1313–1322.
- Jones, G. e Rydell, J. 2003. Attack and defence: interaction between echolocating bats and their insect prey. *In*: Kunz, T.H. e Fenton, M.B. *Bat ecology*. The University of Chicago Press, Chicago. p. 301-345.
- Jones, J.K. e Carter, D.C. 1976. Annotated checklist with keys to subfamilies and genera. *In*: Baker, R. J. (Ed.). *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae: Part I*. Lubbock, Texas Tech University. p. 7-38.
- Juen, A. e Traugott, M. 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator–prey system. *Oecologia*, 142: 244–252.
- Juen, A. e Traugott, M. 2007. Revealing species-specific trophic links in soil food webs: molecular identification of scarab predators. *Molecular Ecology*, 16: 1545–1557.
- Kalka, M. e Kalko, E.K.V. 2006. Gleaning bats as underestimated predators of herbivorous insects: diet of *Micronycteris microtis* (Phyllostomidae) in Panama. *Journal of Tropical Ecology*, 22: 1–10.
- Kaspar, M.L., Reeson, A.F., Cooper, S.J.B., Perry, K.D. e Austin, A.D. 2004. Assessment of prey overlap between a native (*Polistes humilis*) and an introduced (*Vespula germanica*) social wasp using morphology and phylogenetic analysis of 16S rDNA. *Molecular Ecology*, 13: 2037–2048.
- Kirstein, F. e Gray, J.S. 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its european vector *Ixodes ricinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4060–4065.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X. e Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 86: 6196-6200.

- Kohn, M.H. e Wayne, R.K. 1997. Facts from faeces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, 12: 223–227.
- Koopman, K.F. 1988. Systematics and distribution. In: Greenhall, A.M. e Schmidt, U. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida. p. 7-17.
- Koopman, K.F. 1993. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E. e Reeder, D.M. (Eds.). *Mammal species of the World*. The Smithsonian Institution Press, Washington, D. C. P. 137-241
- Li, W-H. e Graur, D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates, Massachusetts. p. 284.
- Linhart, S.B. 1975. The biology and control of vampire bats. In: Baer, G. (Ed.). *The natural history of rabies*. Academic Press, New York. p. 221-241.
- Livia, L., Francesca, V., Antonella, P., Fausto, P. e Bernardino, R. 2007. A PCR-RFLP method on faecal samples to distinguish *Martes martes*, *Martes foina*, *Mustela putorius* and *Vulpes vulpes*. *Conservation Genetics*, 8: 757–759.
- López, A., Miranda, P., Tejada, E. e Fishbein, D. 1992. Outbreak of human rabies in the Peruvian jungle. *The Lancet*, 339: 408.
- Lord, R.D. 1988. Control of vampire bats. In: Greenhall, A.M. e Schmidt, U. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida. p. 215-226.
- Lucchini, V., Fabbri, E., Marucco, F., Ricci, S., Boitani, L. e Randi, E. 2002. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, 11: 857–868.
- Ma, J., Li, D., Keller, M., Schmidt, O. e Feng, X. 2005. A DNA marker to identify predation of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) by *Nabis kinbergii* (Hem., Nabidae) and *Lycosa* sp. (Aranaea, Lycosidae). *Journal of Applied Entomology*, 129: 330–335.
- Manly, B.F.J., Mcdonald, L.L. e Thomas, D.L. 1993. *Resource selection by animals. Statistical design and analysis for field studies*. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Mares, M.A., Willig, M.R., Streilein, K.E. e Lacher, T.E. 1981. The mammals of northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Annals of the Carnegie Museum*, 50: 81-137.
- Mayen, F. 2003. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *Journal of Veterinary Medicine B*, 50: 469-472.
- McCarthy, T.J., 1989. Human depredation by vampire bats (*Desmodus rotundus*) following hog cholera campaign. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 320-322.
- Meece, J.K., Reynolds, C.E., Stockwell, P.J., Jenson, T.A., Christensen, J.E. e Reed, K.D. 2005. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome b gene. *Journal of Medical Entomology*, 42: 657-667.
- Messenger, S.L., Rupprecht, C.E. e Smith, J.S. 2003. Bats, emerging virus infection, and the rabies paradigm. In: Kunz, T.H. e Fenton, M.B. *Bat ecology*. The University of Chicago Press, Chicago. p. 622-679.
- Michael, E., Ramaiah, K.D., Hoti, S.L., Barker, G., Paul, M.R., Yuvaraj, J., Das, P.K., Grenfell, B.T. e Bundy, D.A. P. 2001. Quantifying mosquito biting patterns on humans by DNA fingerprinting of bloodmeals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65: 722-728.
- Mills, L.S., Pilgrim, K.L., Schwartz, M.K. e McKelvey, K. 2000. Identifying lynx and other North American felids based on mtDNA analysis. *Conservation Genetics*, 1: 285–288.

- Morin, P.A., Chambers, K.E., Boesch, C. e Vigilant, L. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, 10: 1835–1844.
- Mukabana, W.R., Takken, W. e Knols, B.G.J. 2002a. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology*, 18: 505-509.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Seda, P., Killeen, G.F., Hawley, W.A. e Knols, B.G.J. 2002b. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 92: 233-239.
- Nagata, J., Aramilev, V.V., Belozor, A., Sugimoto T. e McCullough, D.R. 2005. Fecal genetic analysis using PCR-RFLP of cytochrome b to identify sympatric carnivores, the tiger *Panthera tigris* and the leopard *Panthera pardus*, in far eastern Russia. *Conservation Genetics*, 6: 863–866.
- Nogueira, M.R. e Peracchi, A.L. 2003. Fig-seed predation by two species of *Chiroderma*: discovery of a new feeding strategy in bats. *Journal of Mammalogy*, 84: 225–233.
- Nsubuga, A.M., Robbins, M.M., Roeder, A.D., Morin, P.A., Boesch, C. e Vigilant, L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology*, 13: 2089–2094.
- Ortega, J., Maldonado, J.E., Wilkinson, G.S., Arita, H.T. e Fleischer, R.C. 2003. Male dominance, paternity, and relatedness in the Jamaican fruit-eating bat (*Artibeus jamaicensis*). *Molecular Ecology*, 12: 2409-2415.
- Oshaghi, M.A., Chavshin, A.R. e Vatandoost, H. 2006. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. *Experimental Parasitology*, 114: 259–264.
- Partis, L., Croan, D., Guo, Z., Clark, R., Coldham, T. e Murby, J. 2000. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Science*, 54: 369-376.
- Pascoal, A., Prado, M., Calo, P., Cepeda, A., e Barros-Velázquez, J. 2005. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *European Food Research and Technology*, 220:444–450.
- Patterson, B.D., Ceballos, G., Sechrest, W., Tognelli, M.F., Brooks, T., Luna, L., Ortega, P. Salazar, I. e Young, B.E. 2005. *Digital Distribution Maps of the Mammals of the Western Hemisphere, version 2.0*. NatureServe, Arlington, Virginia, USA.
- Pereira, S.L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23: 745-752.
- Peters, S.L., Malcolm, J.R. e Zimmerman, B.L. 2006. Effects of Selective Logging on Bat Communities in the Southeastern Amazon. *Conservation Biology*, 20: 1410-1421.
- Piggott, M.P., Banks, S.C., Stone, N., Banffy, C. e Taylor, A.C. 2006. Estimating population size of endangered brush-tailed rockwallaby (*Petrogale penicillata*) colonies using faecal DNA. *Molecular Ecology*, 15: 81–91.
- Prugh, L.R., Ritland, C.E., Arthur, S.M. e Krebs, C.J. 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, 14: 1585–1596.
- Read, D.S., Sheppard, S.K., Bruford, M.W., Glen, D.M. e Symondson, W.O.C. 2006. Molecular detection of predation by soil micro-arthropods on nematodes. *Molecular Ecology*, 15: 1963–1972.
- Reed, J.Z., Tollit, D.J., Thompson, P.M. e Amos, W. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology*, 6: 225–234.

- Riddle, A.E., Pilgrim, K.L., Mills, L.S., McKelvey, K. e Ruggiero, L.F. 2003. Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conservation Genetics*, 4: 241–243.
- Röhe, F. 2007. Mamíferos de médio e grande porte. In: Rapp Py-Daniel, L., Deus, C.P., Henriques, A.L., Pimpão, D.M. e Ribeiro, O.M. (Eds.). *Biodiversidade do médio Madeira: bases científicas para propostas de conservação*. INPA, Manaus. p. 195-209.
- Rosa, E.S.T. da, Kotait, I., Barbosa, T. F.S., Carrier, M.L., Brandão, P.E., Pinheiro, A.S., Begot, A.L., Wada, M.Y., Oliveira, R.C. de, Grisard, E.C., Ferreira, M., Silva Lima, R.J. da, Montebello, L., Medeiros, D.B.A., Sousa, R.C.M., Bensabath, G., Carmo, E.H. e Vasconcelos, P.F.C. 2006. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 1197-1202.
- Russell, V.J., Hold, G.L., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Sotelo, C.G., Pérez-Martin, R.I., Santos, A.T. e Rosa, C. 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2184-2188.
- Sazima, I. 1978. Aspectos do comportamento alimentar do morcego hematófago, *Desmodus rotundus*. *Boletim Zoológico da Universidade de São Paulo*, 3: 97-119.
- Sazima, I. e Uieda, W. 1980. Feeding behavior of the white-winged vampire bat, *Diaemus youngi*. *Journal of Mammalogy*, 61: 102-104.
- Schmidt, U. e Greenhall, A.M. 1972. Preliminary studies on the interaction between feeding vampire bats, *Desmodus rotundus*, under natural and laboratory conditions. *Mammalia*, 36: 241-246.
- Schneider, M.C. 1995. Reflexión sobre los modelos para el estudio de los brotes de rabia humana por murciélago: comments on models for studying human rabies outbreaks from bats. *Cadernos de Saúde Pública*, 11: 291-304.
- Schneider, M.C., Aron, J., Santos-Burgoa, C., Uieda, W. e Velasco, S. 2001. Common vampire bat attacks in a village of the Amazon region of Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 17: 1531-1536.
- Schneider, M.C., Santos-Burgoa, C., Aron, J., Munoz, B., Velasco, S. e Uieda, W. 1996. Potencial force of infection of human rabies transmitted by vampire bats in the amazonian region of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55: 680-684.
- Schutt, W.A. 1998. Chiropteran hindlimb morphology and the origin of blood feeding in bats. In: Kunz, T.H. e Racey, P.A. (Eds.). *Bat biology and conservation*. Smithsonian Institution Press, Washington. P. 157-168.
- Schutt, W.A. e Simmons, N.B. 2006. Quadrupedal bats: form, function, and evolution. In: Zubaid, A., McCracken, G.F. e Kunz, T.H. (Eds.). *Functional and evolutionary ecology of bats*. Oxford University Press. New York. p. 145-159.
- Scribner, K.T. e Bowman, T.D. (1998) Microsatellites identify depredated waterfowl remains from glaucous gull stomachs. *Molecular Ecology*, 7: 1401–1405.
- Sheppard, S.K., Henneman, M.L., Memmott, J. e Symondson, W.O.C. 2004. Infiltration by alien predators into invertebrate food webs in Hawaii: a molecular approach. *Molecular Ecology*, 13: 2077–2088.
- Sheppard, S.K. e Harwood, J.D. 2005. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator–prey food-webs. *Functional Ecology*, 19: 751-762.
- Silva, I.M.M.S., Honda, J., Van Kan, F.J.P.M., Hu, J., Neto, L., Pintureau, B. e Stouthamer, R. 1999. Molecular differentiation of five *Trichogramma* species occurring in Portugal. *Biological Control*, 16: 177–184.

- Steuber, S., Abdel-Rady, A. e Clausen, P.H. 2005. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitology Research*, 97: 247-254.
- Stowasser, G., Pierce, G.J., Moffat, C.F., Collins, M.A. e Forsythe, J.W. 2006. Experimental study on the effect of diet on fatty acid and stable isotope profiles of the squid *Lolliguncula brevis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 333: 97-114.
- Sun, Y-L. e Lin, C-S. 2003. Establishment and application of a fluorescent polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identifying porcine, caprine, and bovine meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1771-1776.
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde) 2005. *Raiva Humana transmitida por morcegos no Estado do Pará e Maranhão*. Nota Técnica. p. 3.
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde) 2007. *Raiva humana Brasil, 1986-2007*.
- Symondson, W.O.C. 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11: 627-641.
- Taberlet, P., Camarra, J.J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L.P., DuboisPaganon, C., Burke, T. e Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6: 869-876.
- Taddei, V.A. 1983. *Morcegos: algumas considerações sistemáticas e biológicas*. Boletim Técnico CATI, 172, Campinas.
- Tempelis, C.H. e Lofy, M.F. 1963. A modified precipitin method for identification of mosquitoes bloodmeal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12: 825-831.
- Thomas, D.W. 1988. Analysis of diets of plant-visiting bats. In: Kunz, T.H. (Ed.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. University of Chicago Press, Chicago. p. 211-220.
- Thompson, R.D., Elias, D.J., Shumake, S.A. e Gaddis, S.E. 1982. Taste preferences of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*). *Journal of Chemical Ecology*, 8: 715.
- Torr, S.J., Wilson, P.J., Schofield, S., Mangwiro, T.N.C., Akber, S. e White, B.N. 2001. Application of DNA markers to identify the individual-specific hosts of tsetse feeding on cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, 15: 78-86.
- Turner, D.C. 1975. *The vampire bats*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Uieda, W. 1982. *Aspectos do comportamento alimentar das três espécies de morcegos hematófagos (Chiroptera, Phyllostomidae)*. UNICAMP, Campinas, dissertação de Mestrado. 166p.
- Uieda, W. 1992. Período de atividade Alimentar e tipos de presa dos morcegos hematófagos (Phyllostomidae), no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 52: 563-573.
- Uieda, W. 1993. Comportamento alimentar do morcego Hematófago, *Diaemus youngi*, em aves domésticas. *Revista Brasileira de Biologia*, 53: 529-538.
- Uieda, W. 1994. *Comportamento alimentar de morcegos hematófagos ao atacar aves, caprinos e suínos em condições de cativeiro*. UNICAMP, Campinas, tese de Doutorado. 178p.
- Uieda, W., Paleari, L.M., Lima, R.J.S., Begot, A.L., Ribeiro, J.R., Campos, A.C.R. e Santos, M.A. 2002. Aspectos ecológicos das agrassões humanas por morcegos hematófagos na região norte do Brasil. In: *Relatório Final de Pesquisa*, FAPESP. Botucatu. p. 132.
- Vincze, T., Posfai, J. e Roberts, R.J. 2003. NEB Cutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31: 3688-3691.

- Voigt, C.C. e Kelm, D.H. 2006. Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*; Chiroptera) assessed by stable isotopes. *Journal of Mammalogy*, 87: 1–6.
- Wagener, B., Reineke, A., Lohr, B. e Zebitz, C.P.W. 2004. A PCR-based approach to distinguish important *Diadegma* species (Hymenoptera: Ichneumonidae) associated with diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bulletin of Entomological Research*, 94: 465–471.
- Warner, C.K., Zaki, S.R., Shieh, W.-J., Whitfield, S.G., Smith, J.S., Orciari, L.A., Shaddock, J.H., Niezgodá, M., Wright, C.W., Goldsmith, C.S., Sanderlin, D.W., Yager, P.A. e Rupprecht, C.E. 1999. Laboratory investigation of human deaths from vampire bat rabies in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 502-507.
- Whitaker, J.O. 1988. Food habits of insectivorous bats. In: Kunz, T.H. (Ed.). *Ecological and behavioral methods for the study of bats*. University of Chicago Press, Chicago. p. 171–189.
- Wilkinson, G.S. 1984. Reciprocal food sharing in the vampire bat. *Nature*, 309: 181–184.
- Wilkinson, G.S. 1985. The social organization of the common vampire bat. I. Pattern and cause of association. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 17: 111-121.
- Wilkinson, G.S. 1988. Social organization and behavior. In: Greenhall, A. M. and Schmidt, U. (Eds.). *Natural history of vampire bats*. CRC Press, Florida. p. 85–97.
- Wimsatt, W.A. 1969. Transient behavior nocturnal activity patterns and feeding efficiency of vampire bats (*Desmodus rotundus*) under natural conditions. *Journal of Mammalogy*, 50 (2): 233.
- Young, A.M. 1971. Foraging of vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Atlantic wet lowlands Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 18: 73-88.
- Zaidi, R.H., Jaal, Z., Hawkes, N.J., Hemingway, J. e Symondson, W.O.C. 1999. Can the detection of prey DNA amongst the gut contents of invertebrate predators provide a new technique for quantifying predation in the field? *Molecular Ecology*, 8: 2081–2088.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Upper Saddle River.
- Zehner, R., Zimmermann, S. e Mebs, D. 1998. RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine*, 111: 323–327.
- Zhang, G-F., Lü, Z-C. e Wan, F-H. 2007. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123: 81–90.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)