

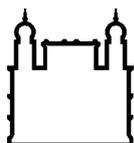
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**IMPORTÂNCIA DE CHIROPTERA NA MANUTENÇÃO DE ESPÉCIES
DE *TRYPANOSOMA* (TRYPANOSOMATIDA, TRYPANOSOMATIDAE)
NO ESTADO DO ACRE.**

FRANCISCO CHARLES BEZERRA DOS SANTOS

Rio de Janeiro
Outubro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

FRANCISCO CHARLES BEZERRA DOS SANTOS

Importância de Chiroptera na manutenção de espécies de *Trypanosoma* (Trypanosomatida, Trypanosomatidae) no Estado do Acre.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientadores: Prof^a. Dr^a Ana Maria Jansen-Franken
Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2017

SANTOS, FRANCISCO CHARLES BEZERRA DOS.

IMPORTÂNCIA DE CHIROPTERA NA MANUTENÇÃO DE ESPÉCIES DE TRYPANOSOMA (TRYPANOSOMATIDA, TRYPANOSOMATIDAE) NO ESTADO DO ACRE. / FRANCISCO CHARLES BEZERRA DOS SANTOS. - Rio de Janeiro, 2017.

145 f.

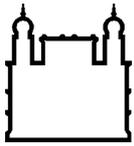
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Co-orientador: Ana Maria Jansen-Franken.

Bibliografia: f. 71-92

1. Trypanosoma spp.. 2. Morcegos. 3. Bacia amazônica. 4. Trypanosoma cruzi. 5. doença de Chagas. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Francisco Charles Bezerra dos Santos

IMPORTÂNCIA DE CHIROPTERA NA MANUTENÇÃO DE ESPÉCIES DE TRYPANOSOMA (TRYPANOSOMATIDA, TRYPANOSOMATIDAE) NO ESTADO DO ACRE.

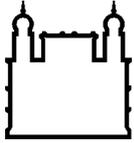
ORIENTADORES: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Jansen-Franken
Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Aprovada em: 11/10/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rafael Marciel de Freitas (IOC/FIOCRUZ) – Presidente e revisor
Prof. Dr. Paulo Sérgio D’Andrea (IOC/FIOCRUZ) – Membro interno
Prof. Dr. Soraia Figueiredo de Souza (UFAC) – Membro externo
Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil (IOC/FIOCRUZ) – Suplente Interno
Prof. Dr. Marcelo Salabert Gonzalez (UFF) – Suplente Externo

Rio de Janeiro, 11 de outubro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico

Ao meu amado pai Francisco das Chagas (*in memoriam*), ao meu querido irmão Eudes Costa (*in memoriam*), minha mãe guerreira Maria Machado, minha esposa Kamilla Gonçalves e aos meus filhos, Alexandro, Anne e Arthur.

AGRADECIMENTOS

A caminhada para chegar até aqui não foi fácil, mas graças a Deus e aos muitos que de alguma forma contribuíram, estou aqui para contar essa história. Sobrevivi.

Ao IFAC/IOC pela celebração do convênio que proporcionou a realização de um sonho que agora se torna realidade.

A minha Orientadora, Professora Dr^a Ana Maria Jansen-Franken, pela oportunidade, carinho, paciência e sabedoria que sempre me deixa com “olhos rasos” e, claro, pelos puxões de orelha. Agradeço a cada questionamento feito pela Senhora, por ter acreditado em mim. Meu sincero MUITO OBRIGADO.

Ao meu Orientador, Professor Dr. André Luiz Rodrigues Roque, pela paciência, ensinamentos, sempre me incentivando a pensar. Sempre terei muita gratidão pelo Senhor. Meu sincero MUITO OBRIGADO.

A Diretora do Parque Zoobotânico, Cristina Boaventura e ao colaborador José Cláudio (Bé) por estarem sempre à disposição.

Ao Professor Dr. Paulo Sérgio D’Andrea, pela parceria, colaboração nas atividades de campo e contribuição intelectual.

Aos colaboradores da UFAC da equipe de campo na captura dos quirópteros, Mestrando Rair Verde (Mestre na arte da captura e identificação, obrigado Amigo), Mestre Sérgio Augusto por sua disposição, Mestre Richarly, Raiton Verde e Sidnei, valeu cada esforço de vocês.

Aos colaboradores do IOC nas atividades de campo, Artur, Adilson, Carlos, Vitor Araújo, e André Pereira, pela intensa contribuição.

Aos Laboratoristas Marcos Antônio dos Santos Lima e Carlos Ardé, pela boa amizade, respeito e sempre quando precisei estavam à disposição para contribuir. Obrigado.

A Professora Dr^a Alena Mayo Iñiguez pela parceria e contribuição nas análises.

A Professora Dr^a Samanta Xavier por ajudar sempre que precisei, pelas conversas de incentivos e pela forma paciente de me ensinar. Obrigado.

A Pesquisadora Dr^a Cristiane Varella pela disposição e ajuda nas atividades laboratoriais.

Ao Senhor Nilson Mendes e Dona Naza do Seringal Cachoeira que sempre nos acolheram bem em sua residência, como também cederam a área para realizarmos o trabalho de pesquisa no campo.

A minha mãe, aos meus irmãos, filhos e sobrinhos que são o alicerce da minha vida, devo o sucesso a vocês.

A minha esposa, companheira e amiga Kamilla Gonçalves pela paciência, por acreditar em mim e de estar ao meu lado nesta etapa tão importante. Te amo.

Aos colegas do LABTRIP, Alessandra, Bruno, Camila, Diana, Dani, Elena, Elida, Fábio, Isabel, Juliana, Karina, Lucélia, Maria Augusta, Marina (sempre disposta a contribuir, obrigado), Renata, Tainan e aos alunos de Iniciação Científica pela amizade, acolhimento, companheirismo, empenho e dedicação.

Ao Professor Dr. Armando Calouro do Laboratório de Ecologia de Mamíferos (UFAC) pela colaboração e ajuda, principalmente com a indicação da equipe de campo. Obrigado.

Aos amigos Carlos Alberto (pelos mapas), Andréa Alechandre, João Dantas, Jocimar, Lauro Saraiva, Tadário pelas conversas, incentivos e ensinamentos.

A Carmelinda Gonçalves, da SESACRE, pela parceria e por estar sempre disposta a ajudar.

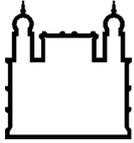
Aos amigos do doutorado (convênio IFAC/IOC) Alcilene, Cesar, Charle (obrigado pela parceria nas coletas e convívio no Rio de Janeiro), Cleilton, Darueck (obrigado nobre pela ajuda na reta final), Irineide, Italva, Josina, Juliana (*in memorian*), Liliane (valeu cada momento de estudo com você), Luis, Márcia, Maralina, Marlos, Paulo, Pedro, Renata, Ricardo e Williane pelo incentivo ajuda mútua e amizade adquirida no decorrer desta jornada.

Aos Laboratórios de Fitopatologia (Professora Dr^a Sandra Ribeiro) e Microbiologia (Professor Dr. Frederico Henrique - Fred), por cederem material e equipamentos para o desenvolvimento da pesquisa.

A todas as pessoas que participaram, diretamente ou indiretamente, para esta conquista.

MUITO OBRIGADO!

“Sem recuar, sem cair, sem temer”.
(Hino Acreano)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Importância de Chiroptera na manutenção de espécies de *Trypanosoma* (Trypanosomatida, Trypanosomatidae) no Estado do Acre.

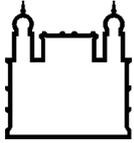
RESUMO

Francisco Charles Bezerra dos Santos

Os morcegos são hospedeiros antigos de *Trypanosoma* spp. e sua capacidade de voar, longevidade e adaptabilidade a ambientes distintos indicam que eles são dispersores eficientes de parasitas. Apesar da reconhecida abundância e dispersão dos quirópteros na Amazônia, estudos sobre a diversidade destes são escassos. Considerando que a Amazônia abrange aproximadamente 50% do território nacional e que tem a maior parte da biodiversidade do planeta, é de se esperar o encontro de uma grande diversidade de espécies descritas e/ou novas de *Trypanosoma* circulando entre sua quiropterofauna. O estado do Acre, embora não considerado área endêmica de doença de Chagas, vem apresentando crescente número de casos. O objetivo deste trabalho foi descrever a quiropterofauna e seus tripanossomas associados em áreas com diferentes paisagens ecológicas e graus de perturbação em um município urbanizado e outro rural do estado do Acre. Os morcegos foram coletados em quatro expedições realizadas em uma floresta urbana (PZ) e uma área mais preservada (SC) nos municípios de Rio Branco e Xapuri, respectivamente. A infecção *Trypanosoma* spp. foi detectada por hemocultura e exame à fresco. Espécies isoladas de parasitas foram identificadas por similaridade da sequência de DNA obtida a partir da PCR 18S rDNA com isolados de referência. No total, foram examinados 367 morcegos de 23 gêneros e 32 espécies, sem diferença significativa entre o número de quirópteros capturados nas duas áreas. A composição da quiropterofauna foi específica para cada município, embora *Artibeus* spp. e *Carollia* spp. tenham prevalecido em ambas as áreas. Houve diferença significativa em relação à diversidade de espécies de morcegos, sendo SC superior ao PZ. As espécies *Artibeus obscurus*, *Carollia benkeithi* e os gêneros *Vampyrum*, *Vampyressa*, *Stunira*, *Sarcopteryx*, *Rhinophylla*, *Lophostema*, *Lasiurus* e *Desmodus* foram encontrados exclusivamente no SC. Os gêneros *Mimon* e *Micronycteris* foram

encontrados exclusivamente no PZ. Dentre os gradientes estudados, a área intermediária de ambos os municípios teve a maior abundância relativa, riqueza de espécies e taxas de infecção. De modo geral, a infecção foi detectada em 85 morcegos (23,2%). No SC observamos maior número de morcegos infectados e maior diversidade de espécies de morcegos em todas as áreas coletadas. Os genótipos mais distribuídos e prevalentes foram (em ordem): *T. cruzi* TcI, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. cruzi* TcIV e *T. rangeli*. Dois isolados do mesmo morcego apresentaram identidade para diferentes espécies em comparação com as sequências de GenBank, sendo que uma agrupou-se no mesmo ramo que os tripanossomas descritos em morcegos neotropicais, entre *T. wauwau* e *Trypanosoma* spp RNMO56 e 63 (possível nova espécie). Observamos pelo menos 6 espécies diferentes e/ou DTUs de *T. cruzi* e duas infecções mistas em morcegos do Acre. *T. cruzi* TcIV foi detectado apenas nas áreas mais preservadas do PZ (A1 e A2) e no SC, e este último co-infecção com *T. c. marinkellei*. A detecção de *T. cruzi* TcI e TcIV (associadas à doença de Chagas no bioma amazônico) sugere a importância desses hospedeiros mamíferos na epidemiologia da doença no estado do Acre.

Palavras-chave: *Trypanosoma* spp.; Morcegos; Bacia amazônica; *Trypanosoma cruzi*; doença de Chagas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

The importance of Chiroptera in the maintenance of *Trypanosoma* species (Trypanosomatida, Trypanosomatidae) in Acre state.

ABSTRACT

Francisco Charles Bezerra dos Santos

Bats are ancient hosts of *Trypanosoma* spp. and their ability to fly, longevity and adaptability to distinct environments indicate that they are efficient parasite dispersers. Despite the recognized abundance and dispersion of bats in the Amazon, studies on their diversity are scarce. Considering that Amazon covers approximately 50% of the national territory and that it has the greater biodiversity of the planet, it is expected the encounter of a great diversity of described and/or new species of *Trypanosoma* infecting the chiropterofauna. The state of Acre, although not considered an endemic area of Chagas' disease, has presented an increasing number of cases. The aim of this work was to describe the chiropterofauna and its associated trypanosomes in areas with different ecological landscapes and degrees of disturbance in one urbanized and one rural municipality in the state of Acre. Bats were collected in four expeditions carried out in an urban forest (PZ) and a more preserved area (SC) in the municipalities of Rio Branco and Xapuri, respectively. *Trypanosoma* spp. was detected by blood culture and fresh blood examination. Isolated parasites were identified by the similarity of the DNA sequence obtained from the 18S rDNA PCR with reference isolates. Overall, 367 bats from 23 genera and 32 species were examined, with no significant difference between the number of bats captured in the two municipalities. The chiropterofauna composition was specific for each municipality, although *Artibeus* spp. and *Carollia* spp. prevailed throughout. The diversity of bat species in SC was significantly higher than PZ. The species *Artibeus obscurus*, *Carollia benkeithi* and the genera *Vampyrum*, *Vampyressa*, *Stunira*, *Sarcopteryx*, *Rhinophylla*, *Lophostema*, *Lasiurus* and *Desmodus* were found exclusively in SC. The genera *Mimon* and *Micronycteris* were found exclusively in PZ. Among the studied disturbance gradients, the intermediate areas of both

municipalities presented the highest relative abundance, species richness and infection rates. Overall, infection was detected in 85 bats (23.2%), and SC was the area in which greater number of infected bats and greater diversity of bats species was recorded. The most distributed and prevalent genotypes were (in order): *T. cruzi* TcI, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. cruzi* TcIV and *T. rangeli*. Two isolates from the same bat showed identity for different species when compared to GenBank sequences, one that were grouped in the same branch as the trypanosomes described in neotropical bats between *T. wauwau* and *Trypanosoma* spp RNMO56 and 63 (possible new species). We observed at least 6 different species and/or *T. cruzi* and two mixed DTUs infecting bats from Acre. *T. cruzi* TcIV was detected only in the most preserved areas of PZ (A1 and A2) and SC, and the latter co-infection with *T. c. marinkellei*. The detection of *T. cruzi* TcI and TcIV (associated with Chagas' disease in the Amazonian biome) demonstrates the putative importance of these mammalian hosts in the epidemiology of the disease in the State of Acre.

Keywords: *Trypanosoma* spp.; bats; Amazon Basin; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Morcegos (Mammalia: Chiroptera)	1
1.1.1 Fisiologia dos morcegos	4
1.1.2 Hábitos alimentares dos morcegos.....	5
1.1.3 Outras características e gêneros mais comuns	7
1.2 TRIPANOSOMATÍDEOS	10
1.2.1 <i>Trypanosoma</i> spp.	10
1.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas no Acre	12
1.2.3 Espécies de <i>Trypanosoma</i> que infectam morcegos	16
1.3 Justificativa	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Áreas de estudo e Pontos de Coleta	23
3.2 Captura dos morcegos	28
3.3 Taxonomia dos quirópteros capturados	29
3.4 Contenção dos animais	30
3.5 Coleta de sangue para análise de infecção por tripanosomatídeos	31
3.6 Acompanhamento das hemoculturas e preparo das massas de parasitos	32
3.7 Extração do DNA genômico de <i>Trypanosoma</i> spp. pela técnica fenol/clorofórmio	33
3.8 Caracterização molecular dos isolados	34
3.9 Purificação e Sequenciamento	36
3.10 Análise dos Resultados	36
3.10.1 Análise das sequências nucleotídicas	36
3.10.2 Análises estatísticas	37

3.11 Aspectos Éticos.....	37
4 RESULTADOS	38
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	70
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
8 APÊNDICES E/OU ANEXOS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação do ciclo biológico de *T. cruzi* e de uma espécie exclusiva de morcegos: *T. c. marinkellei* Fonte: Modificado de Molyneux, 1991 e <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>.
- Figura 2:** Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* Fonte: Tavares, 2016.
- Figura 3:** Formas evolutivas replicativa e não replicativa dos tripanosomas. Fonte: Tavares, 2016.
- Figura 4:** Localização dos pontos de captura dos morcegos no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre no município de Rio Branco – Acre.
- Figura 5:** Vista diurna e noturna das áreas de amostragem de morcegos no Parque Zoobotânico no município de Rio Branco: Terra Firme (A e B); Baixio (C e D); Área Aberta/Granja (E e F).
- Figura 6:** Localização dos pontos de captura dos morcegos no Seringal Cachoeira no município de Xapuri - Acre.
- Figura 7:** Vista diurna e noturna das áreas de amostragem de morcegos no Seringal Cachoeira no município de Xapuri - Acre: A e B - Terra Firme/Restinga; C e D – Baixio/Baixio com palmeira; E e F - Área Aberta/Área aberta com pastagem.
- Figura 8:** A) Abertura das redes de neblina para captura dos morcegos; B) Retirada dos morcegos das redes de neblina para levar ao laboratório de campo; C e D) Biometria, pesagem e etiquetagem dos animais.
- Figura 9:** A) Sedação dos morcegos para procedimento de coleta de sangue; B) Coleta de sangue dos morcegos no campo.
- Figura 10:** A) Acompanhamento do material que teve resultado positivo para *Trypanosoma* spp. B) Obtenção material genômico. C) Homogeneização e transferência do material D) Extração de DNA na cabine de segurança com luz UV. E) Centrifugação das amostras para a separação do DNA.
- Figura 11:** Diversidade de gêneros da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.
- Figura 12:** Riqueza de espécies da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.
- Figura 13:** Distribuição de *Trypanosoma* spp. por características dos gradientes do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Figura 14: Distribuição de *Trypanosoma* spp. por características das áreas de estudo do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Figura 15: Inferência filogenética do isolado LBT 7063 detectado em *Carollia perspicillata* do município de Rio Branco, estado do Acre, no Brasil, no clado *T. cruzi*. A construção da árvore do gene 18S (SSU rRNA) seguiu o método de máxima verossimilhança (ML) sob o modelo de Kimura 2-parâmetros e distribuição gama com sítios invariáveis (K2 + G + I). Os números nos nós indicam apoio estatístico pela análise de *bootstrap* com 1000 repetições. O isolado agrupou-se no clado *T. cruzi* associado a tripanosomas descritos em morcegos neotropicais (Lima et al., 2015).

Figura 16: Distribuição de *Trypanosoma* spp. por espécies da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Diagrama de classificação das espécies de tripanossomas de mamíferos (Hoare, 1972).

Quadro 2: Caracterização das tipologias florestais e urbana dos locais de captura dos morcegos do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre no município de Rio Branco.

Quadro 3: Caracterização das tipologias florestais dos locais de captura dos morcegos no Seringal Cachoeira no município de Xapuri – Acre.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na reação de PCR 18S SSU.

Tabela 2: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na técnica de PCR do gene 18S SSU.

Tabela 3: Distribuição e abundância das espécies da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Tabela 4: Abundância e riqueza da quiroptefau na por habitats do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Tabela 5: Meios de cultivos utilizados para amplificação dos parasitos encontrados em quirópteros capturados do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Tabela 6: Distribuição de *Trypanosoma* spp. encontrados infectando quirópteros do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Tabela 7: Distribuição e diversidade de *Trypanosoma* spp. em Chiroptera do estado do Acre, Bioma Amazônia de acordo com áreas de estudo e habitats distintos. A caracterização foi realizada utilizando iniciadores SSU 18S que foram descritos por Noyes *et al.* (1999).

Tabela 8: Diversidade de *Trypanosoma* spp. em morcegos do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Tabela 9: Números de identificação, espécies de morcegos, localidade e caracterização molecular dos tripanosomatidos usando SSUrDNA. A última coluna inclui o número de acesso ao GenBank de cada sequência depositada.

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1:** A chave dicotômica utilizada para o diagnóstico taxonômico inicial no campo.
- Anexo 2:** Licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO.
- Anexo 3:** Licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO.
- Anexo 4:** Artigo: First record of *Lasiurus blossevillii* Lesson & Garnot, 1826 (Chiroptera: Vespertilionidae) in the state of Acre, Southwest of the Amazon, Brazil. Autores: Rair de Sousa Verde, Francisco Chagas Bezerra dos Santos, Richally Costa da Silva e Armando Muniz Calouro. Nota técnica do primeiro achado da espécie (*Lasiurus blossevillii*) no Estado do Acre. *Oecologia Australis* 21 (2): 191-196.
- Anexo 5:** Artigo: *Trypanosoma* spp. diversity in amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre state, Brazil. Autores: Francisco C. B. dos Santos, Cristiane V. Lisboa, Samanta C. C. Xavier, Maria A. Dario, Rair de S. Verde, Armando M. Calouro, André Luiz R. Roque e Ana M. Jansen. Revista: *Parasitology*, in press.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- *Beast** - Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees em inglês, análise Bayesiana por amostragem de árvores
- Blastn** – algoritmo matemático usado para busca por similaridade de sequências nos bancos de dados de sequências disponíveis
- COLTRYP** - Coleção de Trypanosoma de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores
- DCh** – doença de Chagas
- DNA** – Desoxirribonucleic acid em inglês, ácido desoxirribonucleico
- DNase** – enzima degradante de DNA
- dNTP** – desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DTU** – Discrete Typing Unit em inglês, unidades discretas de tipagem
- EDTA** - Ethylenediamine tetraacetic acid em inglês, ácido etilendiamino tetraacético
- F** – Forward em inglês, senso
- ICMBio** - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- IM** – Intramuscular
- LABTRIP** – Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos
- LIT** – Liver Tryptose Infusion em inglês, infusão de triptose de fígado
- mRNA** – Messenger Ribonucleic acid em inglês, ácido ribonucleico mensageiro
- MV** - Máxima Verossimilhança
- Nested-PCR** - reação em cadeia da polimerase com duas etapas
- NJ** - Neighbor-Joining
- NNN** - Neal, Novy, Nicolle
- P** – Probabilidade de hipótese
- Pb** – pares de base
- PBS** – Tampão fosfato salino
- PCR** – Polymerase chain reaction em inglês, reação em cadeia da polimerase
- PZ** – Parque Zoobotânico
- R** - Reverse em inglês, anti-senso
- RNA** – Ribonucleic acid em inglês, ácido ribonucleico
- RPM** – Rotação por minuto
- rRNA** – Ribossomal Ribonucleic acid em inglês, ácido ribonucleico ribossomal
- SC** – Seringal Cachoeira

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SSU – small subunit em inglês, subunidade menor

TBE – Tampão Tris-EDTA

UV – Ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

1.1 Morcegos (Mammalia: Chiroptera)

A ordem Chiroptera é umas das maiores ordens de mamíferos e seus indivíduos apresentam características comuns da classe Mammalia tais como corpo coberto por pelos, capacidade de amamentar e endotermia. Essa ordem possui a segunda maior riqueza dentre os mamíferos, sendo composta por 18 famílias, 202 gêneros e cerca de 1.300 espécies encontradas em todos os continentes, exceto nas regiões polares e algumas ilhas oceânicas isoladas. Em número de espécies é superada apenas pela ordem Rodentia, representando aproximadamente 20% das espécies de mamíferos reconhecidas no mundo (Nowak, 1994; Simmons, 2005; Fenton e Simmons, 2015).

Estudos sobre o conhecimento da diversidade de mamíferos apontam os roedores e morcegos como tendo suas riquezas ainda subestimadas (Reeder et al. 2007) sendo rotineiras as descrições de novas espécies e mesmo de novos gêneros. Alguns táxons são raros e ainda pouco representados em coleções científicas, dificultando ainda mais a delimitação morfológica, morfométrica, distribucional e taxonômica do próprio táxon (Simmons e Voss, 1998; Velazco et al., 2011). As dificuldades na identificação de um grupo taxonômico, como a Ordem Chiroptera, aliado a histórias taxonômicas complexas e uma considerável dinâmica nomenclatural, tornam-se os maiores problemas enfrentados ao se iniciar um estudo quiropterológico (Simmons e Voss, 1998).

No Brasil, os morcegos representam 25% do total de mamíferos – cerca de 179 espécies distribuídas em 68 gêneros e nove famílias (Emballonuridae, Noctilionidae, Mormoopidae, Thyropteridae, Furipteridae, Natalidae, Vespertilionidae, Molossidae e Phyllostomidae) (Nogueira et al., 2014; Moratelli e Dias, 2015). Para a Amazônia Brasileira Bernard et al. (2011) verificaram a ocorrência de pelo menos 146 espécies, distribuídas em 64 gêneros em nove famílias. A família Phyllostomidae é a mais representativa, com 80 espécies, e tem papel chave na estruturação e na dinâmica florestal, uma vez que ela é a mais diversa no que diz respeito a hábitos alimentares (Kalko, 1997; Schnitzler e Kalko, 1998). Esta família é endêmica do continente americano, destacando-se como o grupo mais versátil na exploração de alimentos entre os Chiroptera, podendo explorar frutos, néctar, pólen,

folhas, insetos, vertebrados e sangue (Leite et al., 2010). Atualmente é composta por 10 subfamílias, sendo elas: Macrotinae, Micronycterinae, Desmodontinae, Phyllostominae, Lonchophyllinae, Rhinophyllinae, Stenodermatinae, Carollinae, Glyphonycterinae, Glossophaginae (Datzmann et al., 2010). As demais famílias da ordem Chiroptera são Molossidae (24 espécies), Vespertilionidae (16), Emballonuridae (16), Mormoopidae (3), Thyropteridae (3), Noctilionidae (2), Natalidae e Furipteridae, estas últimas representadas apenas por uma espécie cada.

A Amazônia é um dos biomas mais ricos em diversidade de espécies de plantas e de animais do mundo, com uma diversidade genética muito rica e pouco conhecida (Marcon et al., 2012). Com toda amplitude e a possível diversidade de espécies ainda não conhecida, a Amazônia é uma enorme lacuna de conhecimento para a fauna de morcegos do Brasil. Cerca de 2/3 do território brasileiro são cobertos pelo bioma Amazônico, e, assim como para outros táxons, a Amazônia contribui com a maior parte da diversidade de espécies de morcegos do país. Existem registros formais de espécies de morcegos em menos de 24% do bioma Amazônia, contra cerca de 80% na Mata Atlântica, por exemplo (Bernard et al., 2011). Os morcegos apresentam as maiores riquezas entre as comunidades de mamíferos da Amazônia servindo como bons modelos para estudos sobre a diversidade e a biogeografia (Voss e Emmons, 1996; Moratelli et al., 2010).

Em relação ao estado do Acre, localizado no bioma amazônico, há poucos estudos sobre morcegos. Nogueira et al. (1999) estimaram a ocorrência de 57 espécies de morcegos no Vale do Juruá (Parque Nacional da Serra do Divisor), em áreas localizadas na parte oeste do estado. Bernard et al. (2011) realizaram um levantamento, no qual documentaram 59 espécies também da região do vale do Juruá. Vale ressaltar que o território Vale do Juruá, abrange uma área de 29.686,20 Km² e é composto por cinco municípios: Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, Marechal Thaumaturgo, Porto Walter e Rodrigues Alves, sendo que o estado do Acre tem uma área territorial de 164.123,040 Km² e 22 municípios. Em estudo realizado por Calouro et al. (2010) sobre a fauna de quirópteros em um fragmento no município de Rio Branco (Parque Zoobotânico da UFAC), foram identificadas 15 espécies. Nesta mesma área Santos *et al.* capturaram 11 espécies no ano de 2012. Por estes estudos, é possível perceber que ainda falta realizar o levantamento da quiropterofauna na maioria dos municípios do estado do Acre.

Estes mamíferos voadores exibem longos períodos de vida e podem ocupar diversos e numerosos habitats em ambientes naturais e urbanos. Essas

características resultam em sua alta capacidade como dispersores de sementes e parasitas, tornando esses animais importantes contribuintes para a biodiversidade (Luis et al., 2013).

Os morcegos são as únicas espécies de mamíferos que realizam voos e, além dos pássaros, os únicos animais que realizam migração sazonal, uma característica que é sugerida ter evoluído várias vezes e de forma independente em linhagens de morcegos distintos. Estas espécies de mamíferos noturnos são capazes de executar voo verdadeiro, uma característica que provavelmente foi herdada de seus antepassados e que aparentemente também evoluiu em várias e distintas vezes dentro das linhagens deste táxon. Apesar de sua alta diversidade, atualmente morcegos são considerados como um grupo monofilético (Jones e Telling, 2006; Bishop, 2008; Bisson et al., 2009).

Morcegos podem se deslocar através de diferentes matrizes usando diversas paisagens e explorar uma longa distância, o que está ligado diretamente a sua persistência nos ambientes (Estrada et al., 2004). Eles constituem um dos grupos de organismos de extrema importância ecológica, por serem excelentes polinizadores de várias espécies vegetais e dispersores das diversas sementes na natureza. Cientistas sugerem que cerca de 25% das espécies de árvores de florestas tropicais são dispersas por eles, corroborando a informação de que eles são os principais responsáveis pela regeneração de florestas neotropicais (Bredt e Vieda, 1996).

Desse modo, em regiões de florestas alteradas e ou fragmentadas, o papel dos morcegos como dispersores de sementes é de fundamental importância. Na economia, em consequência do seu hábito alimentar, consomem várias espécies de insetos, reduzindo-os nas plantações e fazendo com que os agricultores não necessitem dispor de recursos para comprar agrotóxicos. Estima-se que os serviços ecológicos desempenhados por estes animais representem uma redução entre 3,7 e 53 bilhões de dólares por ano em custos com inseticidas (Boyles et al., 2011).

Já no meio médico-sanitário estão associados a zoonoses causadas por vários tipos de agentes etiológicos como protozoários, vírus, bactérias e fungos (Ministério da Saúde, 1998). Diversos estudos apontam doenças associadas aos morcegos como, a síndrome de acuidade respiratória severa (SARS) (Menachery et al. 2015), a hantavirose (Oliveira et al. 2014), a henipavirose (Guyatt et al. 2003; Halpin et al. 2000), o ebola (Leroy et al. 2005), e a raiva (de Thoisy et al., 2016). Cerca de 41 espécies de morcegos, por exemplo, já foram encontradas com evidências de infecção pelo vírus da raiva no país (Sodre et al., 2010). Morcegos

também albergam diversas espécies de tripanosomatídeos, como é o caso do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (Hamilton et al., 2012; Roque e Jansen, 2014b).

Do ponto de vista parasitológico, os morcegos são bons modelos de estudo uma vez que sua capacidade de voo permite grande mobilidade, habita vários tipos de abrigo, além do comportamento social, no qual várias espécies vivem em um mesmo local interagindo entre si. Todos estes aspectos favorecem a dispersão e disseminação de parasitos entre congêneres. No caso do *T. cruzi*, estes mamíferos podem ser importantes reservatórios do parasito, visto que em determinadas áreas são abundantes, adaptam-se bem ao domicílio humano e podem apresentar elevadas prevalências de infecção (Roque e Jansen, 2014a).

1.1.1 Fisiologia dos morcegos

As atividades dos morcegos são influenciadas por uma série de fatores, tanto intrínsecos como extrínsecos. Dentre estes fatores temos a intensidade da luminosidade lunar que causa fobia em algumas espécies de morcegos, dificultando assim o forrageio (Thies et al., 2006); a velocidade dos ventos, pois ventos fortes diminuem a capacidade de detecção das presas por dificultar no processo de ecolocalização, principalmente das espécies insetívoras (Ayuso-Oliva, 2005), e a disponibilidade de alimentos, havendo competição e a estrutura física dos ambientes (Erkert, 1982; Korine et al., 2000; Jaberg e Guisan, 2001).

Os morcegos apresentam hábitos noturnos e, mesmo tendo boa visão durante a noite, a maior parte das espécies possui um sistema de ecolocalização elaborado emitindo sons de alta frequência, inaudíveis ao homem, que ao esbarrar em algum objeto, retornam sob a forma de eco (Bordignon, 2005). Esse mecanismo de navegação permite localizar presas, detectar obstáculos e se comunicar. Também usam o som para acasalamento e agressão (Reis et al., 2007). Nos representantes da família Phyllostomidae, a folha nasal, estrutura membranosa localizada junto às narinas, também está relacionada à ecolocalização, participando no direcionamento dos ultrassons que saem pelas narinas (Neuweiler, 2000).

Sua reprodução pode ser tão variável quanto os hábitos que apresentam, pois conforme o tipo de habitat, localização geográfica, abrigos e disponibilidade de alimentos, as espécies apresentam as mais diferentes estratégias reprodutivas (Pirlot, 1967; Dweyr, 1970). Estes animais tem um filhote por ano, no entanto podem ter gestações de dois ou três filhos. O tempo de gestação dura entre 44 dias

(frugívoros) a 11 meses (hematófagos) e o nascimento geralmente ocorre na época de maior oferta de alimento. Frequentemente formam colônias-berçário, com muitas fêmeas dando à luz na mesma área, seja uma caverna, oco de árvore ou em cavidade numa construção.

Diversos fatores influenciam a dinâmica e a estrutura das comunidades de morcegos, e a distribuição das espécies nas paisagens também tem relação com as respostas específicas destas espécies (Estrada et al., 1993; Willig et al., 2007).

1.1.2 Hábitos alimentares dos morcegos

Os morcegos constituem um dos grupos de mamíferos mais diversificados quanto aos hábitos alimentares, o que não é surpreendente se considerada a diversidade de espécies (Reis et. al., 2006). Esses animais podem ser divididos em guildas, que são grupos de espécies que consomem alimentos similares através de técnicas de forrageamento semelhantes. Muitas espécies compartilham da mesma guilda alimentar. Este conceito foi proposto originalmente por Root (1967) e definido como um grupo de espécies, independente da afiliação taxonômica, que exploram a mesma classe de recursos alimentares, de maneira similar. Podem alimentar-se de insetos, outros artrópodes, frutos, sementes, folhas, flores, pólen, néctar, pequenos vertebrados e sangue, não sendo encontrada tal variedade em outro táxon de mamíferos (Wetterer et al., 2000; Peracchi et al., 2011).

Kalko, (1997) e Schnitzler e Kalko, (1998) descrevem três guildas que utilizam sub-bosques densos para forragear e congregam espécies de morcegos representativas nos estudos realizados no Bioma Amazônia. Dentre estas guildas, *Carollia perspicillata* e *Artibeus lituratus*, por exemplo, espécies muito comuns, são classificadas como frugívoras, *Glossophaga soricina* é nectarívora, enquanto *Phyllostomus hastatus* e *Phyllostomus elongatus* são espécies onívoras. De acordo com Kalko et al. (1996) todas estas espécies são consideradas como espécies que utilizam ambientes com um grau de obstrução espacial elevado.

Os morcegos insetívoros ocorrem em quase todo mundo e compreendem cerca de 70% das espécies, atuando no controle de populações de insetos, sendo algumas pragas na agricultura ou vetores de zoonoses (Cleveland et al., 2006). Já os fitófagos (frugívoros e nectarívoros) ocorrem em áreas antropizadas (construções urbanas) e ambientes de florestas conservadas ou áreas rurais, explorando frutas das árvores ou pomares e flores de arborização urbana em ruas e praças. Para a

América Latina são citadas 83 espécies de morcegos consumindo frutos de 460 espécies de plantas (Bredt et al., 2012).

Vegetações mais complexas oferecem maior disponibilidade de alimentos e abrigos (Tews et al., 2004; Bobrowiec e Gribel, 2010), o que promove aumento na diversidade de espécies animais no local (Moreno e Halffter, 2001; Williams et al., 2002). A variação temporal e espacial dos recursos alimentares em paisagem fragmentada e os diferentes requerimentos energéticos existentes entre as espécies de morcegos influenciam diretamente a percepção e uso das manchas de habitats por estes e, conseqüentemente, a abundância de cada espécie (Law e Lean, 1999, Saldaña-Vázquez et al., 2010).

De acordo com Aguiar et al. (2004) a oferta de alimento, a disponibilidade de abrigo e a estrutura da vegetação são os principais fatores abióticos que podem afetar diretamente a ocorrência e abundância de morcegos neotropicais em um determinado tipo de habitat. Dessa forma, fatores abióticos espaciais influenciam fortemente a estruturação de comunidades animais: por exemplo, a distância que um fragmento se encontra de outras áreas florestais e o tipo de matriz circundante são fatores que podem limitar a riqueza de espécies.

Ainda segundo Presley et al. (2009) mudanças na disponibilidade de recursos podem alterar o padrão de atividade de espécies. A forma com que as espécies animais estão distribuídas no ambiente é determinada por estes fatores, que agem em diferentes escalas e exercem influência em escala regional e local (Tews et al., 2004). Quanto maior a abundância de um determinado recurso alimentar, espera-se maior abundância de indivíduos de determinadas espécies que dele se alimentam, e quanto maior a diversidade de recursos alimentares, espera-se maior riqueza de espécies (Saldaña-Vazquez et al. 2010; Castro-Luna e Galindo-González, 2011).

Partindo desse pressuposto, a carência de locais adequados para abrigos e alimentação pode ser responsável pela ausência de algumas espécies de morcegos em determinados habitats (Clarke et al., 2005). A sazonalidade (períodos de seca e chuvas) é outro fator ambiental que possui forte influência sobre a Ordem Chiroptera, alterando o seu comportamento devido às variações na disponibilidade de alimento (Gobbe e Barrella, 2000; Martins et. al. 2006). Entretanto, a maioria dos estudos não consegue abordar todas as variáveis envolvidas, focando na abundância encontrada e usando esses resultados para demonstrar os aspectos da vegetação e efeito do clima na assembleia de morcegos.

Morcegos possuem alta tolerância à modificação da paisagem, devido à sua capacidade de voar e da facilidade com que podem cruzar áreas abertas. Conseqüentemente, a maioria dos estudos se concentra em fragmentos de vegetação original imersos em matrizes altamente perturbadas (Brosset et al., 1996; Schulze, et al., 2000). Embora a riqueza e diversidade de espécies de morcegos sejam reduzidas em áreas urbanas, algumas espécies se tornam abundantes em regiões antropizadas (Kurta e Teramino, 1992; Sazima et al. 1994; Johnson et al. 2008; Loeb et al., 2009). Mesmo assim, os estudos demonstram que, devido às diferenças na morfologia e ecologia das espécies, os morcegos podem responder a perturbações do habitat de várias maneiras. Várias destas espécies adentram as áreas abertas e são capazes de voar em diversos fragmentos florestais, evitando o isolamento e ampliando a área de forrageio.

1.1.3 Outras características e gêneros mais comuns

Os morcegos possuem comportamento social diversificado, variando de acordo com a espécie. No geral, possuem grande interação social, se organizando em colônias simples ou mistas (Neuweiler, 2000; Serra-Cobo et al., 2002). Morcegos utilizam abrigos durante o dia que lhes propiciam área de repouso, proteção, locais favoráveis para a criação dos filhotes e também, constituem locais que permitem o desenvolvimento de interações sociais. No entanto, fatores relacionados ao habitat estão diretamente ligados à influência do clima, ambiente e latitude onde vivem estes animais (Von Zuben, 1997; Lindenfors et al., 2007; Bordes e Morand, 2008).

Sobre a importância ecológica, os morcegos contemplam quase todos os tipos de interações tróficas (Kunz, 1982), sendo um grupo chave na dispersão de sementes (Giannini e Kalko, 2004; Lobo et al., 2009), na polinização e na predação, controlando uma ampla diversidade de presas (Kunz e Fenton, 2003). Algumas espécies de morcegos são atuantes na polinização e dispersão de sementes de várias plantas pioneiras e espécies de plantas do sub-bosque (Fleming e Heithaus, 1981).

Morcegos exibem uma variedade de adaptações comportamentais, morfológicas e fisiológicas para o forrageamento que são expressas por seus hábitos e influenciam nos padrões de atividade temporal e espacial (Fenton et al., 1992; Schnitzler e Kalko, 2001). Isso fica evidente quando se compara a morfologia de morcegos que possuem nichos alimentares diferentes, que, por consequência, possuem comportamentos de forrageamento relativamente distintos (Schnitzler e

Kalko, 2001; Kalka e Kalko, 2006). Assim, disponibilidade e a distribuição espaço-temporal dos recursos, aliadas ao tipo de forrageamento e característica morfofisiológica, podem agir como fatores que determinam a distribuição, abundância, riqueza e diversidade de morcegos em um habitat, área e local limitado. O processo de fragmentação de habitats é um aspecto crucial a ser considerado em relação à preservação da vida selvagem, uma vez que a redução dos ambientes resulta em menores áreas e na limitação de recursos essenciais para a manutenção de espécies como alimento, parceiros reprodutivos e abrigo (Pires et al., 2006). Além disso, a alteração no microclima dessas áreas originados pela atividade antrópica tem provocado mudanças de temperatura, luminosidade e umidade (Odum e Barrett, 2005), condições que influenciam as atividades dos morcegos (Thies et al., 2006). Ainda assim, segundo Kalko e Handley (2001) devido a sua mobilidade, os morcegos são menos sensíveis a fragmentação do que espécies com dificuldade de dispersão, em ambientes que exigem maior capacidade de locomoção (e.g. pastagens, capoeiras e estradas). Além disso, quaisquer alterações no forrageamento em resposta às perturbações, sazonalidade ou fisionomia do habitat, podem modificar o nicho temporal das espécies (Presley et al., 2009) o que pode causar o aumento no nível de competição entre espécies que antes não competiam.

Os aspectos ecológicos ligados ao parasitismo podem depender da filogenia, imunidade ou adaptação comportamental, além do hábito alimentar e estratégia de forrageamento (Poulin e Morand, 2000; Bordes e Morand, 2008). O tipo de agregação e interação social entre os hospedeiros são fatores importantes na disseminação de doenças e parasitas, podendo ocorrer o aumento da incidência em função do tipo de comportamento do animal (Christe et al., 2003). Assim, as espécies de morcegos que compartilham abrigos e/ou formam grupos com número elevado de indivíduos são, provavelmente, mais propensas a partilhar parasitos.

1.1.3.1 Gênero *Carollia*

O gênero *Carollia* está distribuído do México ao norte da Argentina (Gardner, 2007). É um filostomídeo da subfamília Carollinae de tamanho pequeno. Segundo Simmons (2005) há quatro espécies identificadas no Brasil (*C. benkeithi*, *C. brevicauda*, *C. castanea* e *C. perspicillata*). Em relação ao hábito alimentar, mais de 50% da dieta é composta por frutos e, por este motivo, são considerados frugívoros, com preferência por frutos da família Piperaceae (Mello, 2003). Estes frutos possuem alta qualidade energética possibilitando que os indivíduos que se

alimentam deles não precisam buscar outras fontes alimentares (Fleming, 1988). Essa espécie é fundamental na dispersão de sementes de diversas plantas pioneiras, auxiliando na restauração natural de áreas degradadas (de Carvalho-Ricardo et al., 2014). Outro aspecto observado em animais do gênero *Carollia* são as adaptações bem sucedidas em ambientes perturbados (Faria, 2006; Bernard, 2001, 2002). Segundo Reis et al. (2007) espécies deste gênero costumam se refugiar em abrigos como buracos de árvores, sob as raízes das árvores e ocasionalmente, em troncos ocos e construções humanas. Estes locais podem abrigar grande número de indivíduos durante o dia, e esses se dispersam para longe do abrigo para se alimentar durante a noite, retornando após o forrageio (Hamilton e Watt, 1970).

1.1.3.2 Gênero *Artibeus*

O gênero *Artibeus* é encontrado desde a região central do México até a Argentina (Gardner, 2007). No Brasil foram descritas nove espécies: *A. cinereus*, *A. anderseni*, *A. concolor*, *A. fimbriatus*, *A. glaucus*, *A. gnomus*, *A. lituratus*, *A. obscurus* e *A. planirostris*. Os morcegos desse gênero possuem uma variedade de tamanhos, sendo os grandes morcegos os mais comuns e abundantes. O hábito alimentar é considerado frugívoro e possuem dieta diversificada. Sua dieta inclui frutos de piperáceas, embora apresente preferência por Cecropiaceae e Moraceae (Fabían, 2008; Mello et al. 2008), mas outros recursos alimentares como insetos, folhas e néctar também são consumidos (Zortéa e Mendes, 1993), o que permite alta capacidade adaptativa, favorecendo a sobrevivência e permanência em locais com características distintas (Passos et al., 2003). Costuma abrigar-se nas copas das árvores, principalmente sob as folhas de palmeiras e outras plantas, embora esteja bem adaptado a ambientes urbanos e seja encontrada também se abrigando em edificações humanas (Zortéa e Chiarello, 1994; Bredt e Uieda, 1996; Reis et al., 2002).

1.1.3.3 Gênero *Phyllostomus*

O gênero *Phyllostomus* é exclusivamente neotropical e conta atualmente com quatro espécies reconhecidas no Brasil: *Phyllostomus discolor*, *P. elongatus*, *P. hastatus* e *P. latifolius* (Simmons, 2005; Gardner, 2007; Reis et al., 2011). Animais deste gênero variam de médio a grande porte no tamanho e com peso em torno de 30 a 100g. Apresenta dieta generalista (onívora), de fato a mais diversificada já

conhecida, ingerindo partes florais, frutos, artrópodes e vertebrados (Gardner, 1977; Simmons e Voss, 1998, Santos et al., 2003; Oprea et al., 2006).

1.1.3.4 Gênero *Trachops*

O gênero *Trachops* tem sua distribuição geográfica ampla, conhecida desde o sul do México, Costa Rica, Nicarágua, Guianas, Trinidad, Equador, Bolívia, até o sul do Brasil (Jones e Carter, 1976; Koopman, 1993; Nogueira et al., 2007). No Brasil foi descrita somente uma espécie: *Trachops cirrhosus*. Gardner (1977) encontrou evidências de que *T. cirrhosus* se alimenta de insetos e pequenos vertebrados, como lagartos e morcegos e o classificou como carnívoro. A predação de anuros foi documentada para o Panamá e os estudos sugerem que a predação por *T. cirrhosus* provavelmente influenciou a evolução da vocalização de anuros nos trópicos (Tuttle e Ryan, 1981). Este gênero é comumente associado a ambientes de floresta e ambientes ribeirinhos, mas também já foi encontrado em área de savana e de agricultura. Estes morcegos utilizam cavernas, buracos em árvores e galerias como abrigos diurnos (Goodwin e Greenhall, 1961; Tuttle, 1970; Handley, 1976; Kalko et al., 1998).

1.2 TRIPANOSOMATÍDEOS

1.2.1 *Trypanosoma* spp.

Tripanossomatídeos pertencem ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e formam um grupo monofilético que corresponde à família Trypanosomatidae (Cavalier-Smith, 1993). Há poucos anos, um estudo multigênico com mais de 50 genes corroborou, mais uma vez, com a monofilia dos tripanossomas (Leonard et al., 2011).

Estes protozoários são caracterizados pela presença de cinetoplasto, uma organela formada por DNA de estrutura circular extranuclear formando redes concatenadas conhecido por DNA do cinetoplasto ou Kdna. (Ruppert, Fox e Barnes, 2005; Araújo et al., 2009; Rassi; Marin-Neto, 2010; Teixeira et al., 2011; Pereira e Navarro, 2013). São parasitas obrigatórios de invertebrados, plantas e de, virtualmente, todas as ordens de vertebrados (Vickerman, 1976; Simpson et al., 2006, Stevens, 2008).

De acordo com vários estudos, os tripanossomatídeos estão atualmente distribuídos em 18 gêneros, conforme parâmetros clássicos (morfológicos, hospedeiro de origem e ciclo de vida e filogenéticos (monofilia e suporte). Quatorze gêneros compreendem protozoários monoxênicos de insetos: *Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Wallaceina*. Quatro gêneros albergam espécies heteroxênicas em cujos ciclos há uma alternância entre hospedeiros invertebrados (artrópodes hematófagos) e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*) ou entre insetos fitófagos e plantas (*Phytomonas*) (Wallace, 1966, 1979; Wallace et al., 1983; Hoare, 1972; Vickerman, 1976; Camargo, 1998; Merzlyak et al., 2001; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011, Leonard et al., 2011, Lima, 2011, Maslov et al., 2013, Lukes et al., 2014, Porcel et al., 2014).

Durante os ciclos de vida com alternância entre vertebrados e invertebrados hematófagos, os tripanossomas apresentam várias formas presentes em diferentes combinações no sangue e outros tecidos dos seus hospedeiros. Foram descritas mais de 150 espécies de *Trypanosoma* parasitando todas as classes de vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos). Hoje já se sabe que *T. cruzi*, pela sua habilidade de explorar diferentes tipos de recursos e sua manutenção em diversos reservatórios, pode ser considerado como parasito generalista de espécies, sendo que cada espécie hospedeira atua como um filtro biológico diferente, possivelmente selecionando subpopulações diversas do parasito (Jansen et al., 2015). Entender as relações entre parasito e hospedeiro e sua distribuição complexa é fundamental na compreensão do controle médico-sanitário.

De acordo com o desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e, conseqüentemente, com a via de eliminação das formas infectantes pelo vetor, as espécies parasitas de mamíferos do gênero *Trypanosoma* foram divididas nas Seções Salivaria e Stercoraria (Hoare, 1964, 1972) (Quadro 1).

Quadro 1. Diagrama de classificação das espécies de tripanossomas de mamíferos (Hoare,1972).

Gênero <i>Trypanosoma</i>	
Seção Stercoraria (transmissão contaminativa)	Seção Salivaria (transmissão inoculativa)
Subgêneros (espécie-referência)	Subgêneros (espécie-referência)
<i>Megatrypanum</i> (<i>T. theileri</i>)	<i>Duttonella</i> (<i>T. vivax</i>)
<i>Schizotrypanum</i> (<i>T. cruzi</i>)	<i>Nannomonas</i> (<i>T. congolense</i>)
<i>Herpetosoma</i> (<i>T. lewisi</i>)	<i>Trypanozoon</i> (<i>T. brucei</i>)
<i>Tejeraia</i> (<i>T. rangeli</i>)	
	<i>Pycnomonas</i> (<i>T. suis</i>)

1.2.2 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas no Acre

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (DCh) ou tripanossomíase americana, que tem ampla distribuição no continente americano (Coura e Viñas, 2010). É uma das mais importantes infecções parasitárias na América Latina, sendo superada apenas pela malária, e estima-se que no mundo existam 8-11 milhões de pessoas infectadas pelo protozoário, e que 6 a 7 milhões vivam sob-risco de infecção, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica, constituindo assim problema preocupante de saúde pública. Atualmente estima-se que haja cerca de 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* no Brasil (Schofield et al., 2006; Coura e Viñas, 2010; Martins-Melo et al., 2014; Henao-Martínez et al., 2015; Nogueira et al., 2015; WHO, 2016). Até o momento não há vacina nem tratamento antiparasitário efetivo (Coura e Viñas, 2010). *Trypanosoma cruzi* já foi encontrado em mais de 150 espécies de mamíferos de oito ordens, incluindo Chiroptera (Jansen et al. 2015). Estes tripanossomas circulam no ambiente silvestre infectando diversas ordens de mamíferos e podendo infectar o homem (Marcili, 2008).

A doença é uma zoonose complexa, com mamíferos como reservatórios (Miles, Feliciangeli e Arias, 2003). Este hemoflagelado possui ciclo de vida envolvendo hospedeiros vertebrados mamíferos e invertebrados hemípteros reduvídeos da subfamília Triatominae, assumindo diferentes estágios evolutivos com distinções morfológicas e físico-químicas (Maya et al., 2007, Gurgel-Gonçalves et al.,

2012) (Figura 1 e 2). Neste sentido, podemos identificar três formas evolutivas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota.

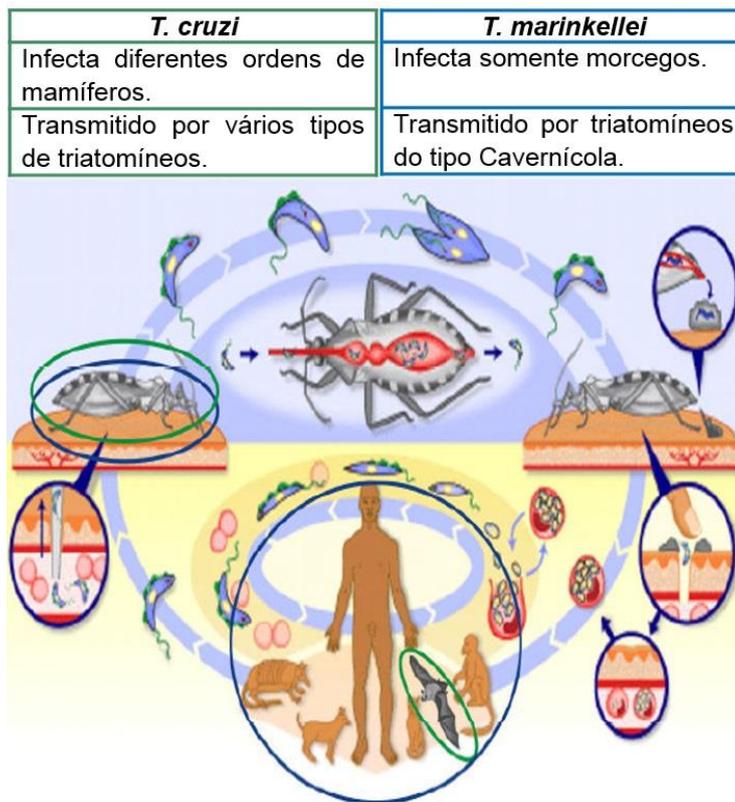


Figura 1. Representação do ciclo biológico de *T. cruzi* e de uma espécie exclusiva de morcegos: *T. c. marinkellei* Fonte: Modificado de Molyneux, 1991 e <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>.

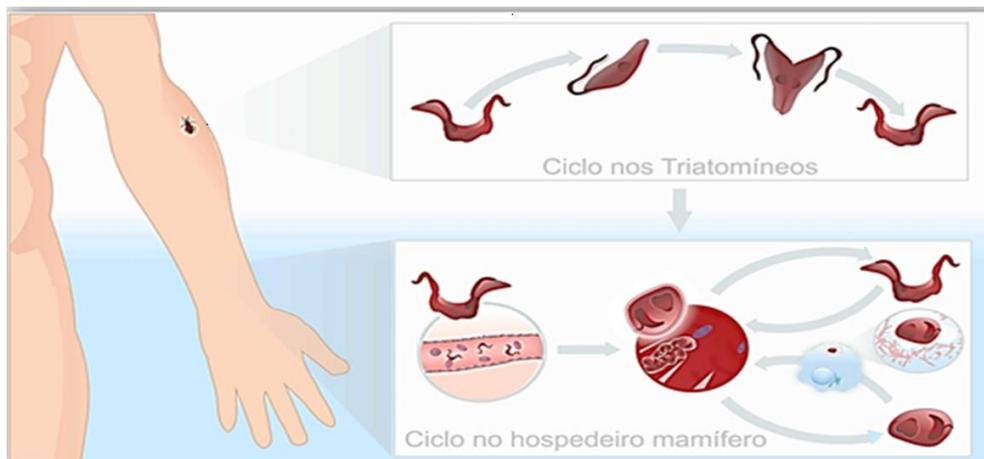


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* Fonte: Tavares, 2016.

As formas evolutivas são classificadas com base em parâmetros morfológicos, tais como, posição relativa do flagelo, núcleo e cinetoplasto, e possuem variações quanto à infectividade e patogenicidade durante seu ciclo de vida (Tavares, 2016). A forma replicativa no hospedeiro invertebrado é a epimastigota, com aproximadamente 20 µm de comprimento, se caracteriza por sua

forma alongada (fusiforme), cinetoplasto discóide disposto anteriormente ao núcleo e com o flagelo livre surgindo da região anterior. A amastigota é uma forma replicativa (intracelular) e infectiva (extracelular) no hospedeiro vertebrado. São células com aproximadamente 2 a 5 μm de diâmetro, com formato arredondado e flagelo bem curto não exteriorizado. As formas tripomastigotas são formas infectantes, tanto para o hospedeiro vertebrado como para o invertebrado. Esta forma evolutiva é não replicativa, medindo aproximadamente 25 μm de comprimento, alongada com cinetoplasto arredondado, posterior ao núcleo e flagelo, que percorre externamente toda extensão de seu corpo (Brener, 1973; De Souza, 1984; Teixeira et al., 2011) (Figura 3).



Figura 3. Formas evolutivas replicativa e não replicativa dos tripanosomas. Fonte: Tavares, 2016.

A estrutura populacional do parasito é predominantemente clonal, somando-se a eventos de recombinação gênica (Tibayrenc et al., 1993; Gaunt et al., 2003). Atualmente, com a utilização de marcadores moleculares em estudos de filogenia e taxonomia, os isolados de *T. cruzi* são agrupados em seis unidades discretas de tipagem (DTUs), denominadas TcI a TcVI, além de uma sétima DTU denominada de Tcbat (Marcili et al., 2009, Zingales et al., 2009, Lima, 2011, Ramírez et al., 2014).

A infecção por *T. cruzi* em morcegos ocorre por diferentes maneiras, mas a transmissão oral devido à ingestão de insetos infectados certamente desempenha papel importante. Morcegos dos gêneros *Carollia*, *Artibeus* e *Molossus* foram infectados após a alimentação experimental com *Rhodnius prolixus* infectado (Thomas et al., 2007). Além disso, indivíduos da espécie onívora *Phyllostomus hastatus* se infectaram após predarem camundongos infectados (Thomas et al., 2007). Mesmo morcegos predominantemente frugívoros como *Artibeus* sp., *Carollia* sp. e *Glossophaga* sp. muitas vezes se alimentam de insetos e podem ser

infectados desta maneira (Gardner, 1977). Embora se alimentando de sangue de mamíferos que podem conter formas infectantes do parasito, infecção por *T. cruzi* em morcegos hematófagos é raramente documentada. Esta característica pode ser explicada pelo fato que estes morcegos alimentam-se preferencialmente em bovinos e equinos, dois grupos de mamíferos raramente associados com a infecção por *T. cruzi*.

Infecções mistas podem ocorrer quando o hospedeiro é infectado por mais de uma espécie de tripanossoma ou mesmo por DTUs diferentes de *T. cruzi*. Segundo Zingales et al. (2012) existem diversos marcadores moleculares disponíveis para a caracterização das populações de *T. cruzi* e a escolha de tais marcadores ou alvos ainda não é consenso, mas, geralmente, a resolução segura dos isolados do parasito em seus seis subgrupos requer a combinação de diferentes metodologias devido à existência dos grupos híbridos em *T. cruzi*. Portanto, os estudos moleculares contribuem para evidenciar a variabilidade de cepas de *T. cruzi* em determinada área e vem sendo utilizados no intuito de integrar os aspectos clínicos e epidemiológicos da doença de modo a orientar o prognóstico, diagnóstico ou mesmo o tratamento da doença de Chagas (Oliveira et al., 2012).

O parasita pode ser transmitido vetorialmente, congenitamente, em acidentes laboratoriais, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e, num mecanismo que vem ganhando importância epidemiológica nos últimos anos, por via oral (Cevallos e Hernández, 2014; Martins-Melo et al., 2014).

O estado do Acre está na bacia amazônica, o bioma que contém a maior biodiversidade do mundo (Hoorn et al., 2010). Essa região, anteriormente considerada livre de infecção, é atualmente responsável pela grande maioria dos casos de doença de Chagas no Brasil e a maioria está associada à infecção oral (Coura e Junqueira, 2015).

Os primeiros casos de DCh notificados ocorreram no município de Plácido de Castro (Região do Baixo Acre) em 1988. Este caso envolveu uma criança, mas não se concluiu sobre a via de infecção nem se fez o acompanhamento desta, uma vez que a família se evadiu. Entre 2004 e 2007 foi realizado inquérito sorológico, que detectou dois casos, respectivamente um em Taracá (Região do Envira) e outro em Cruzeiro do Sul (Região do Juruá). A via de contágio destes casos não foi determinada e também não foram acompanhados porque se evadiram. Em 2009 houve um caso de DCh de uma mulher jovem (21 anos) moradora do município de Feijó, uma área de intensa produção de açaí e que foi associado a transmissão

vetorial. No ano seguinte, na mesma localidade, foram registrados cinco casos de DCh por via oral (um adulto e 4 crianças). Em 2014 foram registrados dois casos no município de Mâncio Lima. Um dos infectados, uma criança de 11 meses, apresentou sinais neurológicos importantes, mas se recuperou. Em 2015, foram registrados cinco casos, sendo dois em uma aldeia indígena do município de Jordão. Os demais aconteceram em Rodrigues Alves, Tarauacá e Mâncio Lima. Em 2016 aconteceram 25 casos, sendo 10 no município de Rodrigues Alves e 15 no município de Feijó, dos quais nove por via contaminativa e dezesseis por via oral, como informado pela Secretaria de Saúde do estado do Acre em 2016.

Considerando o maior esforço recente de identificação de casos e a dispersão dos municípios que relataram casos em uma vasta área do estado, este histórico de casos pode ser subestimado.

1.2.3 Espécies de *Trypanosoma* que infectam morcegos

Os morcegos são hospedeiros antigos de *Trypanosoma* spp., um gênero parasita transmitido entre várias espécies de vertebrados e vetores invertebrados hematófagos em todo o mundo. De acordo com Hoare, (1972) e Jansen et al. (2015) cerca de 80 espécies de morcegos foram encontradas infectadas por tripanossomas ao redor do mundo. Os tripanossomas de morcego já foram descritos na Ásia, África, Américas e Europa, e todos foram incluídos no clado *T. cruzi* (Lima et al., 2013, 2015; Barbosa et al., 2016). Dentro deste clado, *Trypanosoma cruzi*, um parasita zoonótico responsável pela doença de Chagas, emergiu como importante patologia humana que atualmente é considerada problema mundial (Coura et al., 2014).

No Brasil existem 40 espécies de morcegos que já foram encontradas infectadas e mais de dez espécies de tripanossomas registradas (Marcili et al., 2008). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o desenvolvimento de tripanossomas em quirópteros (Lima, 2011). As infecções mais frequentes são causadas por espécies dos subgêneros *Megatrypanum* e *Schizotrypanum* e os quirópteros insetívoros são os mais frequentemente infectados (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976; Molyneux, 1991).

O subgênero *Schizotrypanum* compreende tripanossomas relativamente pequenos com cinetoplasto volumoso e formato típico em “C”, que infectam o homem e outros mamíferos (Hoare, 1972; Lima, 2011). Apenas após o advento das ferramentas moleculares é que foi possível distinguir com segurança os integrantes do subgênero *Schizotrypanum*, o que significa que vários relatos anteriores podem

estar sub ou super estimando as taxas de infecção, comprometendo também a identificação do agente etiológico envolvido (Hamilton et al., 2012).

T. cruzi ocorre do Sul dos Estados Unidos ao Sul da América do Sul. *T. marinkellei* é encontrado apenas na América Central e do Sul, *T. dionisii* está distribuído no Novo e Velho mundo e *T. erneyi*, até o momento foi descrito somente na África. Com exceção de *T. cruzi*, as demais espécies desse subgênero são restritas aos quirópteros. *T. marinkellei* é a espécie filogeneticamente mais próxima do *T. cruzi* seguida do *T. erneyi* e *T. dionisii* (Cavazzana Jr et al., 2010, Franzén et al., 2012, Lima et al., 2012). Filogeneticamente, algumas espécies de tripanossomas desse subgênero formam o clado *T.cruzi-like* (Cottontail et al. 2014) de tripanossomas geneticamente próximos a *T. cruzi*. À exceção de *T. cruzi* e casos pontuais de infecção de humanos por *T. lewisi*-“like” e *T. rangeli*, além da recente descrição de *T. dionisii* no tecido cardíaco de uma criança, as espécies da seção Stercoraria não infectam o homem (Sarataphan et al., 2007; Dario et al., 2016).

Existem duas hipóteses explicativas acerca da origem de *T. cruzi*.

A primeira hipótese propõe que a origem de *T. cruzi* data de 100-80 milhões de anos atrás, após a separação da África e manutenção do super-continente sul formado pela América do Sul, Antártica e Austrália. Seus primeiros hospedeiros teriam sido mamíferos da ordem Didelfimorfia, endêmica no continente. A transmissão teria ocorrido pela predação de outros mamíferos ou pelo contato com sangue infectado durante encontros agonísticos, ou por contaminação por material de glândula anal de marsupiais didelfídeos infectados, uma vez que essas glândulas podem manter o ciclo de multiplicação extracelular do *T. cruzi* e eliminar as formas metacíclicas infectivas (Deane et al., 1984; Stevens et al., 1999; Schofield, 2000).

Essa hipótese tem sido recentemente contestada com base na ausência de descrições de novas espécies dentro do clado *T.cruzi* e na baixa diversidade de espécies deste clado em mamíferos terrestres da América do Sul. Essa baixa diversidade de espécies *T. cruzi* só foi possível ser demonstrada a partir de estudos moleculares que demonstraram que numerosas espécies descritas com base apenas na morfologia eram na verdade *T. cruzi*. Esta baixa diversidade de espécies não está de acordo com o que poderia ser esperado se o clado *T. cruzi* tivesse sido originado no super continente Sul (Hoare 1972). Finalmente, o encontro de espécies do clado *T. cruzi* em mamíferos na África, a saber, *T. erneyi*, *T. livingstonei* a espécie mais basal do clado *T. cruzi* (Lima et al. 2012; 2013), e dois isolados em mamíferos terrestres africanos, sugere movimentos naturais de morcegos carregando

tripanossomas em continentes mais recentemente do que aqueles sugeridos pelos registros fósseis (Hamilton et al., 2012).

Estes achados resultaram na formulação da hipótese segundo a qual os quirópteros são os hospedeiros mamíferos ancestrais de *T. cruzi*. Esta hipótese, conhecida como “*bat seeding hypothesis*” foi proposta por Hamilton et al. (2012) e sugere que tripanossomas de morcegos, provavelmente do velho mundo, deram origem a todas as espécies do clado *T. cruzi*. Dentro desta hipótese, tripanossomas de morcegos foram se adaptando a mamíferos terrestres em cinco ou seis eventos distintos.

T. c. marinkellei é subespécie de *T. cruzi* associada a morcegos, principalmente na América Central e do Sul. Este parasito predomina em espécies da família Phyllostomidae (insetívoros, frugívoros, carnívoros e hematófagos), e seu vetor são triatomíneos do gênero *Cavernicola*. No entanto, o ciclo de transmissão desta espécie não está bem caracterizado e pode haver outros vetores e/ou mecanismos de transmissão direta. Dentre todos os tripanossomas conhecidos até o momento, *T. c. marinkellei* é o filogeneticamente mais relacionado com *T. cruzi*. No entanto apesar da semelhança morfológica e do compartilhamento de morcegos hospedeiros, esses tripanossomas diferem em vários aspectos, todos ainda muito pouco estudados (Lima, 2011). A grande proximidade de *T. c. marinkellei* com *T. cruzi* foi recentemente corroborada por estudos proteômicos que não permitiram distinguir essas duas espécies (Telleria et al., 2010).

T. dionisii é um tripanosomatídeo de morcegos filogeneticamente muito próximo ao *T. cruzi*, e essa proximidade filogenética sugere que estes parasitas podem explorar estratégias semelhantes para completar seus ciclos de vida. É tido como um tripanossoma de morcego não-patogênico e seu ciclo é semelhante ao de *T. cruzi*, alternando entre hospedeiro vertebrado e invertebrado. É transmitido pelas fezes ou ingestão de percevejos do gênero *Cimex* (insetos heterópteros da família Cimicidae que agrupa um conjunto de espécies que são parasitas externos de mamíferos, incluindo humanos) (Molyneaux, 1991).

Estudos sobre caracterização molecular de tripanossomas de morcegos vêm sendo realizados por vários grupos de pesquisa no Brasil, Bolívia, Colômbia Equador e Panamá nos últimos anos (Maia da Silva et al., 2009; Cavazzana Jr et al., 2010; Hamilton et al., 2012b; Cottontail et al., 2014; Lima et al., 2014, 2015). Estes trabalhos revelaram uma grande diversidade de espécies de *Trypanosoma* de morcegos, além de uma variedade de genótipos de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. dionisii* e

T. c. marinkellei e a existência de um número crescente de tripanossomas divergentes por distância genética de qualquer espécie de tripanossoma conhecida (Lima et al., 2015). Mackie et al. (2015) identificaram uma nova espécie de tripanossoma em um quiróptero (*Pteropus scapulatus*) capturado no leste da Austrália e denominaram de *T. teixeirae*. Já Lima et al. (2015) identificaram nova espécie nomeada como *T. wauwau* em morcegos *Pteronotus* spp. nas Américas. Estes últimos são animais comumente encontrados nos biomas Amazônia e Cerrado e foram encontrados recentemente na Mata Atlântica do Nordeste do Brasil (da Rocha et al., 2011). Recentemente, um tripanosomatídeos tido como monoxênico de insetos (*Blastocrithidia* spp.) foi encontrado em morcegos do Texas (EUA) (Hodo et al. 2016) e outro tripanosomatídeos monoxênico, *Crithidia mellificae* foi isolado de um *Anoura caudifer* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro (Rangel, 2017). No Brasil, verificou-se que os morcegos foram infectados por *T. cruzi* (Tcl, TcII e Tcbat), *T. rangeli*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* e *T. wauwau* (Lima et al., 2015, da Costa et al., 2016).

Novas hipóteses poderão ser reforçadas ou poderão surgir, com a inclusão de novas espécies nos estudos filogenéticos assim como com análises combinadas de diversos genes e análises filogenômicas de tripanosomatídeos e outros membros do filo Euglenozoa (Lima, 2011). As recentes novas descrições só reforçam o fato que ainda sabemos pouco sobre a diversidade e a ampla distribuição dos *Trypanosoma* spp. nos diferentes continentes. No Brasil há vários estudos sendo desenvolvidos para gerar dados sobre o tema, e uma região que apenas recentemente vêm sendo estudada é a região amazônica. Considerando que ela abrange aproximadamente 50% do território nacional e que tem a maior parte da biodiversidade do planeta, é de se esperar que aqui encontremos uma grande diversidade de espécies descritas e/ou novas de *Trypanosoma* circulando entre os morcegos, alguns de seus mais antigos hospedeiros, neste ambiente.

1.3 Justificativa

Apesar da reconhecida abundância e dispersão dos quirópteros na Amazônia, os estudos sobre a diversidade destes no Acre são escassos. A maior parte dos registros está concentrada em poucas áreas, geralmente de acesso e logísticas fáceis, próximas aos maiores centros urbanos ou ao longo de alguns dos grandes rios da região. No entanto, quirópteros apresentam expressiva biomassa nas floretas acreanas. Além disso, são longevos, apresentam alta capacidade de dispersão e frequentam os mais variados ambientes que incluem as florestas primárias, bem como os grandes centros urbanos.

Quirópteros de diferentes famílias, espécies e hábitos alimentares têm sido encontrados infectados por espécies de *Trypanosoma* da Seção Stercoraria (subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*) e Salivaria (*Trypanozoon*) na África, Europa, Ásia, Austrália e Américas. Além disso, foram recentemente propostos como hospedeiros ancestrais de *T. cruzi*, parasito frequentemente encontrado infectando morcegos no Brasil. Adicionalmente, quirópteros são hospedeiros de outras espécies do subgênero entre as quais, muitas ainda não descritas e outras cuja distribuição e gama de hospedeiros ainda é subestimada. A diversidade de representantes do subgênero *Schizotrypanum*, tem sido constatada apenas recentemente, a partir do desenvolvimento de ferramentas moleculares com maior poder analítico. Isso significa que ainda há lacunas importantes no conhecimento que precisam ser preenchidas. O presente estudo avalia a diversidade de espécies de *Trypanosoma* em morcegos do Acre.

No Pará, onde são frequentes os casos e surtos de doença de Chagas, foram descritos mamíferos infectados com *T. cruzi*, DTUs TcI e TcIV, que são as mesmas associadas a surtos e casos humanos da doença. O estado do Acre, embora não considerado área endêmica de doença de Chagas até poucos anos, vem apresentando um crescente número de casos e surtos, a maioria deles associada à infecção por via oral, embora também ocorram casos da doença por via contaminativa. De acordo com a Secretaria de Saúde do Estado, no ano de 2016 foram confirmados 25 casos. O presente estudo será o primeiro com o objetivo de esclarecer aspectos do ciclo de transmissão de *T. cruzi* no ambiente silvestre e se morcegos estão ou não incluídos nos ciclos de transmissão deste parasito no Acre.

Apesar da sua abundância e dispersão dentro de um bioma caracterizado pela sua biodiversidade, a diversidade de tripanossomas infectando morcegos do estado de Acre é completamente desconhecida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever a quiróptero fauna e seus tripanossomas associados em áreas com diferentes paisagens ecológicas e graus de influência antrópica em dois municípios do estado do Acre, na Amazônia brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

1) Conhecer a diversidade e riqueza de espécies de morcegos em ambiente de florestas primária no Seringal Cachoeira e secundária no Parque Zoobotânico no estado do Acre;

2) Realizar o diagnóstico da infecção por *Trypanosoma* spp. em morcegos, isolando e caracterizando as populações de parasitos obtidos;

3) Determinar as taxas e perfil de infecção por estes tripanossomatídeos;

4) Associar a distribuição das espécies de morcego, à prevalência da infecção por *Trypanosoma* spp. no Parque Zoobotânico e Seringal Cachoeira e micro habitats onde foram capturados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo e Pontos de Coleta

O município de Rio Branco, capital do Estado do Acre, abrange uma área de 8.835,541 Km² e está localizado na região do baixo Acre a 09° 58' 29" S e 67° 48' 36" W. Em 2017, apresentava uma população de 383.443 habitantes, sendo 31.548 na zona urbana e 351.895 mil na zona rural (IBGE, 2017). O município de Rio Branco enquadra-se de acordo com a classificação de Köppen no subtipo Tropical de Monções (Am) e apresenta elevado índice pluviométrico (quantidade média acumulada anual superior a 1.935 mm) (Duarte, 2006). O clima é equatorial quente e úmido, com bastante chuvas, e elevados índices de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (Abud, 2010).

O município de Xapuri, está distante da capital acreana cerca de 175 km e destaca-se na história da sustentabilidade ambiental como berço do socioambientalismo (Abud et al. 2015) após os “empates” (movimento de resistência dos seringueiros, castanheiros, índios e ribeirinhos para impedir as derrubadas das florestas) que teve como seu principal líder Francisco Alves Mendes Filho (Chico Mendes). Localizado na região do alto Acre a 10°10'57,95" S e 68°30'16" W, abrange uma área de 5.347,446 Km², e em 2017 apresentava uma população de 18.174 habitantes, sendo 11.240 na zona urbana e 6.934 na zona rural (IBGE, 2017). O município de Xapuri enquadra-se na classificação de Köppen no subtipo Tropical de Monções (Am) e apresenta elevado índice pluviométrico (quantidade média acumulada anual superior a 2.000 mm) (Mesquita e Duarte, 2005). O clima equatorial quente e úmido da Amazônia caracteriza-se por temperaturas elevadas durante todo o ano, com elevados índices de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (Abud, 2010).

Nos dois municípios foram selecionadas seis áreas de acordo com características locais e obedecendo um gradiente de preservação ambiental. Os pontos A1 e A4 (Terra Firme) correspondem aos locais mais preservados, sendo A1 em Rio Branco, em uma mata secundária e A4 em Xapuri, composto por mata primária. Já os pontos A2 e A5 (Baixio), além das características de mata primária e secundária são áreas de várzea e que em determinadas épocas do ano são submersas por água. Correspondem aos pontos de influência antrópica

intermediária dos municípios de Rio Branco e Xapuri, respectivamente. Já os pontos A3 (Rio Branco) e A6 (Xapuri) correspondem a áreas com maior influência antrópica nos dois municípios (Área aberta). O ponto A3 é um plantio de seringueiras, próximo a granja, na área experimental da UFAC, adjacente aos bairros Ipê e Universitário. Já o ponto A6 é próximo a residência na sede da colocação (Conjunto de unidade produtiva que compõe um Seringal). As descrições completas das seis áreas de coleta estão contidas nos quadros 2 e 3.

As capturas no município de Rio Branco foram realizadas dentro do limite do Parque Zoobotânico (PZ). O PZ pertence à Universidade Federal do Acre e foi criado em 1980, com uma área de aproximadamente 150 ha (Calouro, et al., 2010). Caracteriza-se por ser uma área de vegetação secundária em diferentes estágios de regeneração. Segundo Meneses-Filho et al. (1995) os tipos florestais existentes no PZ, podem se apresentar em mosaicos com transições pouco perceptíveis na estrutura da vegetação e composição florística, formando contínuos vegetacionais com sub-bosque denso. Atualmente é a maior área verde no perímetro urbano da cidade de Rio Branco e tem como objetivo servir de campo experimental para estudos em três principais áreas de ensino: biodiversidade, ecologia e manejo de ecossistemas. O PZ está situado a oeste do Campus Universitário em Rio Branco – AC, tendo como limites o igarapé Dias Martins, a estrada vicinal Dias Martins e a BR-364 (9° 57' 26" S; 67° 52' 25.54" O). Segundo a classificação de Köppen, o local apresenta clima tropical úmido, com a estação seca compreendendo o período de maio a outubro, sendo junho o mês menos chuvoso. O relevo é suave a ondulado. A localização e as características dos três pontos de coleta do PZ estão dispostas nas Figuras 4 e 5, e Quadro 2.

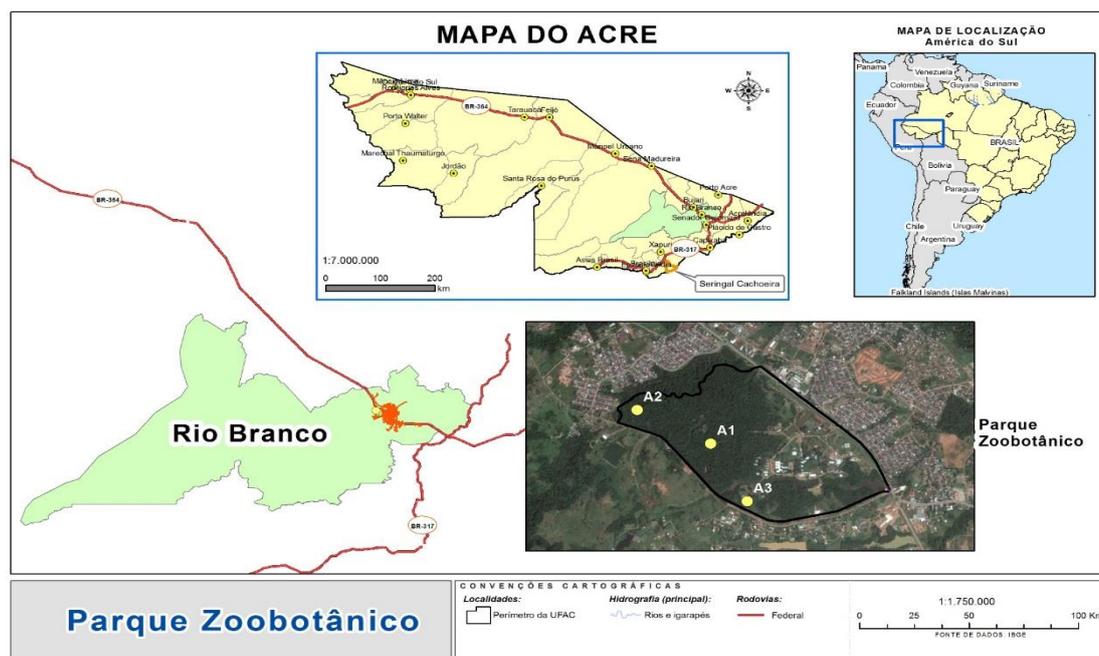


Figura 4. Localização dos pontos de captura dos morcegos no Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre no município de Rio Branco - Acre.

Quadro 2: Caracterização das tipologias florestais e urbana dos locais de captura dos morcegos do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre no município de Rio Branco.

Terra Firme (A1)	Floresta Densa e Floresta Aberta com Palmeiras	É uma floresta que apresenta três estratos definidos: i) o dossel apresentando indivíduos com altura aproximada de 35 a 40 metros e aspecto aberto, ii) o estrato médio com predominância da espécie breu-vermelho (<i>Protium heptaphyllum</i>) apresentando estrutura fechada e iii) o estrato inferior com aspecto aberto ou limpo (Figura 5 A e B).
Baixio (A2)	Floresta Aberta com Palmeiras	É geralmente encontrada em áreas próximas a planícies aluviais de rios com grande vazão na época das cheias. Essa fisionomia se caracteriza por uma floresta de dossel aberto com presença de palmeiras. (Acre, 2006) (Figura 5 C e D).
Área aberta (A3)	Granja da UFAC	Faz parte da área experimental da Universidade Federal do Acre, ao lado do Residencial Ipê, próximo a um aviário, dentro de um plantio de seringueira (Figura 5 E e F).



Figuras 5. Vista diurna e noturna das áreas de amostragem de morcegos no Parque Zoobotânico no município de Rio Branco: Terra Firme (A e B); Baixio (C e D); Área Aberta/Granja (E e F).

As capturas no município de Xapuri foram realizadas dentro do Projeto de Assentamento Agroextrativista Chico Mendes, criado através da Portaria nº 158 do Ministério da Agricultura de 08.03.1989, contemplando 68 famílias, com área de 24.098 ha (Rosas e Drumond, 2007). Esta área é também conhecida como antigo Seringal Cachoeira (SC). O SC está localizado a 30 km do centro do município de Xapuri, sudeste do Estado do Acre, na região ocidental da Amazônia brasileira. (10° 54' 33.43" S; 68° 21' 47.19" O). Seu acesso se dá pela BR 317 na altura do Km 143, lado esquerdo, sentido Rio Branco – Brasília, através do ramal do Cachoeira. O clima da região é o equatorial quente e úmido caracterizado por altas temperaturas, elevados índices de precipitação e alta umidade relativa do ar (ACRE, 2006). A localização e as características dos três pontos de coleta do SC estão dispostas nas Figuras 6 e 7, e quadro 3.

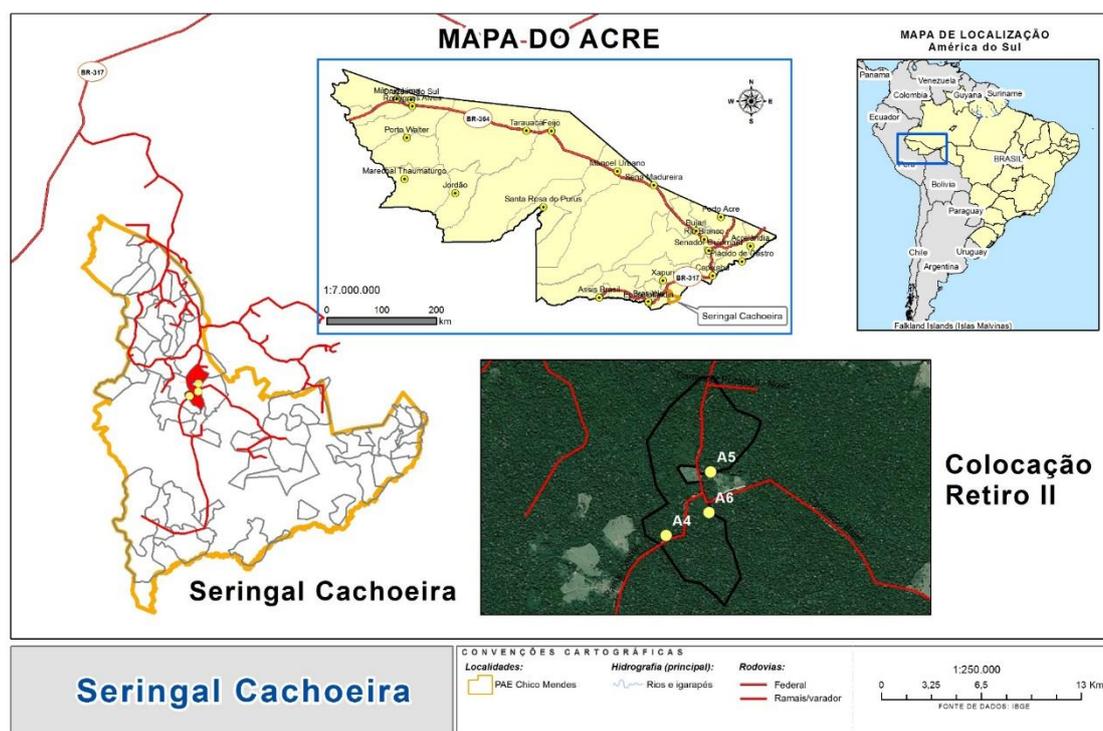


Figura 6. Localização dos pontos de captura dos morcegos no Seringal Cachoeira no município de Xapuri - Acre.

Quadro 3: Caracterização das tipologias florestais dos locais de captura dos morcegos no Seringal Cachoeira no município de Xapuri - Acre.

Terra Firme (A4)	Floresta Densa e Floresta Aberta com Palmeiras	Área com cobertura vegetal original/floresta primária, composta por floresta aberta ou densa, com palmeiras e bambu com estrato inferior com aspecto aberto ou limpo. (Figura 7 A e B).
Baixio (A5)	Floresta Aberta com Palmeiras	Caracterizada pela presença de espécies de plantas adaptadas ao excesso de água na época chuvosa, com dominância de ciperáceas, espécies lenhosas xeromórficas e palmáceas. Essa floresta pode ocorrer associada a manchas de Floresta Densa com árvores emergentes e em outras áreas associada a manchas de Floresta Densa com dossel uniforme (Figura 7 C e D).
Área aberta (A6)	Área aberta	Essa área é um plantio de seringueiras consociadas com banana e diversas espécies madeireiras (Figura 7 E e F).



Figuras 7. Vista diurna e noturna das áreas de amostragem de morcegos no Seringal Cachoeira no município de Xapuri - Acre: A e B - Terra Firme/Restinga; C e D – Baixo/Baixo com palmeira; E e F - Área Aberta/Área aberta com pastagem.

3.2 Captura dos morcegos

Foram realizadas quatro expedições nos anos de 2014 e 2015, sendo duas no período chuvoso e duas no período seco, com seis noites de capturas em cada um dos municípios. Os morcegos foram capturados com o auxílio de redes de neblina (modelo mist net) de malha de 35 mm e tamanho de 3 m x 12 m. Foram utilizadas 10 redes por noite, alocadas nos locais de captura durante seis horas por noite e verificadas a cada 1 hora. Estas foram dispostas cerca de 50 cm de altura do solo, abertas depois do pôr-do-sol no início da noite, das 18:00 - 24:00 horas (Kunz et al., 1996). O esforço de captura foi calculado da seguinte forma: n° de redes x tamanho da rede x n° de noites amostrais x horas de exposição das redes por noites, na qual os dados são expressos em m²/hora rede. O esforço de captura foi o mesmo para as seis áreas. Para cada noite em um determinado ponto de amostragem foram utilizadas 10 redes x (3 x 12 tamanho da rede) x 1 noite x 6 horas = 2.160 m²/hora rede. Para cada ponto de amostragem, por expedição, o esforço

amostral foi de 2×10 redes $\times 2.160$ (esforço de uma noite) = $4.320 \text{ m}^2/\text{hora rede}$. Por município (três áreas) este esforço foi de $3 \times 4.320 = 12.960 \text{ m}^2/\text{hora rede}$. Ao final das quatro expedições o esforço total foi $51.840 \text{ m}^2/\text{hora rede}$ em cada um dos municípios (Figura 8).

Os animais capturados foram manuseados com luva de couro e soltos da rede. Os mesmos foram colocados individualmente em sacos de pano e transportados ao laboratório de campo onde permaneceram até a manhã do dia seguinte, quando foram realizados todos os procedimentos de coleta de dados e etiquetagem. As fêmeas identificadas como grávidas e/ou lactantes foram soltas da rede e imediatamente liberadas.



Figuras 8 A) Abertura das redes de neblina para captura dos morcegos; B) Retirada dos morcegos das redes de neblina para levar ao laboratório de campo; C e D) Biometria, pesagem e etiquetagem dos animais.

A partir da captura dos animais calculamos a abundância relativa e a riqueza das espécies. A abundância define a proporção que cada espécie representa do total de indivíduos da comunidade. A riqueza das espécies é verificada a partir do número de espécies presente em uma amostragem ou comunidade.

3.3 Taxonomia dos quirópteros capturados

A chave dicotômica utilizada para o diagnóstico taxonômico inicial no campo foi construída com base em chaves pré-existentes (Lim e Engstron, 2001; Gregorin e

Taddei, 2002; Gardner, 2007; Díaz et al. 2011) aproveitando-se em parte os passos empregados na diferenciação das espécies. Nessas chaves foram utilizados caracteres morfológicos (qualitativos) e morfométricos (quantitativos). Os caracteres morfológicos empregados foram baseados nas descrições e diagnoses apresentadas na literatura (Lim e Engstrom, 2001; Gregorin e Taddei, 2002; Gardner, 2007). A chave utilizada está apresentada no Anexo 1.

A faixa etária de cada animal foi definida de acordo com as seguintes características: (i) jovens, presença de uma placa cartilaginosa nas epífises e diáfises dos metacarpos e falanges, indicando que não estão fusionados; (ii) subadultos, ainda com, ou praticamente sem presença de placa cartilaginosa; e (iii) adulto, com as epífises e diáfises dos metacarpos e falanges completamente preenchidos.

Num segundo momento, a identificação de todos os animais foi revisada no laboratório utilizando-se de chaves específicas e mais completas (Emmons e Feer, 1997; Simmons e Voss, 1998; Eisenberg e Redford, 1999, Lim e Engstrom, 2001; Gardner, 2007; Díaz, 2011), a partir de características dos espécimes analisados, respeitando os critérios de cada grupo. Para a confirmação das espécies aqui listadas, as características cranianas e dentárias foram as mais utilizadas para definir espécimes com nível de identificação crítica.

3.4 Contenção dos animais

Os animais foram contidos mecanicamente com as mãos em luvas de couro segurando firmemente as asas, usando o polegar e o dedo médio, comprimindo-o em direção ao corpo tendo cuidado para não machucá-lo, e imobilizando a cabeça com o dedo indicador para evitar mordedura. Para a contenção química, foi administrado 100 mg/kg de cloridrato de quetamina em combinação com acepromazina 1%, na proporção de 9:1, via intramuscular (IM). A dosagem foi determinada de acordo com o peso do animal em questão, sendo 0,1 ml desta associação para cada 100 gramas de peso corpóreo dos animais (Figura 9).



Figuras 9. A) Sedação dos morcegos para procedimento de coleta de sangue; B) Coleta de sangue dos morcegos no campo.

3.5 Coleta de sangue para análise de infecção por tripanossomatídeos

Uma vez o animal anestesiado iniciou-se a coleta de sangue, após a devida antisepsia e tricotomia do local de retirada do sangue. Conduziu-se a retirada através de punção cardíaca, sendo o material de coleta aberto próximo à chama do fogareiro para evitar contaminação. Foi coletado de cada animal até o volume máximo de 1 ml. Após estes procedimentos os animais foram eutanasiados e retirado um fragmento do baço. As carcaças foram depositadas na coleção do Laboratório de Ecologia de Mamíferos da Universidade Federal do Acre para pesquisas e estudos didáticos.

Com o sangue coletado, foram realizados os seguintes procedimentos:

- Exame à fresco (observação direta): foi colocada uma gota de sangue em uma lâmina identificada com o número de registro do animal, coberta com lamínula e depositada numa câmara úmida para observação direta ao microscópio. O critério para diagnóstico positivo foi a presença de pelo menos um parasito e/ou movimento de flagelados entre as hemácias observado durante o exame das lâminas.

- Hemocultivo: O sangue foi cultivado em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) que é um meio de cultura artificial axênico elaborado com a finalidade de obter crescimento de parasitos a partir de um determinado inóculo, utilizado com frequência para o isolamento de tripanossomatídeos. A esta fase sólida eram adicionados: (i) LIT (Liver Triptose Infusion), é um meio de cultura líquido monofásico baseado em infusão de fígado (Madeira et al. 2009) ou (ii) meio Schneider (Schneider's Insect Medium – SIGMA-ALDRICH®). As culturas foram realizadas de forma asséptica (próxima à chama de um fogareiro), através da semeadura de 0,3 a 0,5 ml de sangue por tubo (dois por animal, um com meio líquido LIT e outro com

Schneider). Os tubos foram posteriormente identificados com o número de registro individual do animal, data, espécie, ponto de captura e município.

3.6 Acompanhamento das hemoculturas e preparo das massas de parasitos

As culturas de sangue foram mantidas em temperatura ambiente e transportadas ao LABTRIP - Fiocruz. No laboratório, foram conferidos os tubos e feita uma planilha de controle. Os tubos foram examinados, sendo a primeira leitura aos dez dias e, a partir da segunda, quinzenalmente por até quatro meses, verificando se havia a ocorrência de hemoparasitas. Os casos negativos também foram observados até ao menos três meses após a coleta.

Os tubos identificados com parasitos foram ampliados através de repiques para outro tubo com meio NNN e mesmo meio líquido onde o parasito foi isolado (LIT ou Schneider). As ampliações foram realizadas até um volume final de aproximadamente 50 ml, com concentração de parasitos em torno de 10^7 - 10^8 parasitos. Deste volume, parte foi criopreservado e depositado na Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores – COLTRYP. Da maior parte foi preparada a massa parasitária para a extração de DNA.

Para o preparo da massa parasitária, a cultura foi centrifugada a 4.000 RPM por 15 minutos, desprezando-se o sobrenadante e retendo-se somente o *pellet*. Foi adicionado 20 mL de PBS (Tampão fosfato salino), homogeneizado e utilizado para lavar os parasitos por três vezes. Na última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o tubo disposto de maneira investida para secar em papel toalha. A massa de parasito obtida foi mantida em freezer até sua utilização.

Nos hemocultivos que foram identificados com algum parasito, no entanto a cultura não foi estabelecida, foi feita somente uma lavagem e a massa celular foi armazenada em freezer.

As culturas positivas e/ou a massa da cultura foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas com proteinase K (100 µg / ml) e 0,5% de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 56°C durante duas horas.

3.7 Extração do DNA genômico de *Trypanosoma* spp. pela técnica fenol/clorofórmio

Para ressuspender o *pellet* das amostras que foram armazenadas, utilizamos 1mL de TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), homogeneizamos com cuidado e transferimos 500 µL para cada eppendorf (duplicata). A cada tubo foi adicionado 10 µL de proteinase e as amostras foram colocadas em banho-maria a 56°C por duas horas ou overnight a 37°C. Após esse procedimento, a cada amostra foram adicionados 500 µL de fenol/clorifórmio, homogeneizando-os com cuidado até a mistura ficar opaca/leitosa (Vallejo et al., 1999). Este material foi centrifugado por três minutos a 16.000g, retirado o sobrenadante e o material transferido para um novo eppendorf. No novo tubo, foi adicionado 500 µL de fenol/clorofórmio, homogeneizado e novamente centrifugado (processo realizado por duas vezes) (Figura 10). Realizada a última centrifugação por fenol/clorofórmio, o sobrenadante de DNA foi retirado e colocado em um novo eppendorf com 500 µL de clorofórmio. Após nova homogeneização, as amostras foram centrifugadas novamente por três minutos a 16.000g. Após a centrifugação, em um novo eppendorf, foi adicionado 450 µL da amostra, 900 µL de etanol absoluto e 45 µL de acetato de sódio para ocorrer a precipitação do DNA. Após nova centrifugação por 15 minutos a 16.000g, o sobrenadante foi desprezado e o eppendorf deixado para secar no papel filtro. Após este período, a amostra era ressuspendida com 150 µL de TE, e depois transferida para o freezer a -20°C devidamente identificada.

Ao final do processo, depois quantificado em um Espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®), a concentração final de DNA foi ajustada para 50 ng/µL.



Figuras 10. A) Acompanhamento do material que teve resultado positivo para *Trypanosoma* spp. B) Obtenção do *pellet* com material genômico. C) Homogeneização e transferência do material D) Extração de DNA na cabine de segurança com luz UV. E) Centrifugação das amostras para a separação do DNA.

3.8 Caracterização molecular dos isolados

A caracterização molecular dos isolados foi realizada utilizando o gene ribossômico (18S) uma vez que este possui um grande número de sequências depositadas, facilitando a comparação com outros isolados (Noyes et al., 1999; Maslov, Podlipaev e Lukes, 2001; Smith et al., 2008; Mc Innes, 2009 e 2011; Madeira et al., 2014). A caracterização foi realizada através de uma *Nested-PCR* que consiste numa reação em duas etapas. Na primeira etapa amplifica-se uma região maior do alvo estudado (iniciadores externos), enquanto a segunda etapa utiliza como substrato de reação o produto amplificado da primeira e amplifica uma menor região dentro desta (iniciadores internos). Essa técnica foi realizada conforme descrito por Smith et al. (2008). As especificações dos iniciadores e reagentes utilizados encontram-se nas tabelas 1 e 2.

Tabela1: Iniciadores utilizados na reação de PCR do gene 18S SSU:

Etapa	Iniciador	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do Fragmento
Iniciadores	TRY927F	5' GAAACAAGAAACACGGGAG3'	900 pb
Internos	TRY927R	5'CTACTGGGCAGCTTGGGA 3'	
Iniciadores	SSU561F	5' TGGGATAACAAAGGAGCA3'	600 a 700 pb*
Externos	SSU561R	5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3'	

pb – Pares de base

Tabela 2: Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR do gene 18S SSU:

Reagente	Concentração	Volume
Água para PCR estéril		29,72µL
Tampão 10xPCR	10x	5µL
MgCl ₂ (estoque 25 mM)	3 mM	6µL
dNTP (estoque 10 mM)	2 mM	5µL
Oligo Try R	16 pmol	1µL
Oligo Try F	16 pmol	1µL
<i>AmpliTaqGold</i>	1,4 U	0,28µL
DNA	100 ng	2µL

dNTP Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DNA Ácido desoxirribonucleico

A reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador Swift Max Pro Thermal Cycler com um ciclo inicial de 95°C por 15 min, 34 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 60 seg e 72°C por 90 seg, além de ciclo final de 72°C por 10 min. Para a segunda etapa, usamos o mesmo protocolo de reação acima e a mesma ciclagem. A diferença consistiu no substrato da reação. Ao invés do DNA, usamos 2 µL do produto amplificado da reação diluído na proporção de 1:10 (45 µL de água para PCR e 5 µL do produto amplificado). O produto amplificado foi aplicado (10 µL) em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris base 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) em cuba de eletroforese horizontal a 100 Volts de corrente durante uma hora. Após a corrida o gel foi corado com Brometo de Etídeo e as bandas visualizadas no fotodocumentador Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MI SE. Em apenas seis isolados, a identificação foi obtida através de outro par de primers (V7V8) da mesma região 18S SSU, conforme Borghesan et al. (2013).

3.9 Purificação e Sequenciamento

A reação de purificação foi realizada utilizando-se o GE® Healthcare Life Sciences (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit), seguindo as instruções dos fabricantes. Brevemente, as amostras do tubo de PCR foram transferidas para os tubos de 1,5 ml estéreis, identificados e colocados na coluna de purificação. Adicionamos tampão tipo 3 (tampão de captura) para produto amplificado, homogenizamos e transferimos para a coluna de purificação em um tubo estéril livre de DNA. Centrifugamos duas vezes por 30 seg a 14000g, adicionamos 500 µL de tampão tipo 1 (tampão de lavagem) e centrifugamos por 30 seg a 14000g. Em seguida, transferimos a coluna para novo tubo estéril livre de DNA e adicionamos 30 µL de tampão de eluição, que deixamos agir por um minuto antes de centrifugar por 30 seg a 14000g. O produto purificado foi armazenado em tubo estéril livre de DNA a -20°C até a realização do sequenciamento.

O sequenciamento de ambas as fitas, senso e antisenso, foi realizado com o kit BigDye Terminator v3. 1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) em sequenciador ABI 3730 na Plataforma de sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

3.10 Análise dos Resultados

3.10.1 Análise das sequências nucleotídicas

As sequências nucleotídicas obtidas a partir de rRNA 18S foram manualmente editadas pelo Software de Análise de Sequências SeqMan versão 7.0 (Lasergene – DNASTAR) (Burland, 2000). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de nucleótidos depositadas em GenBank utilizando o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) NCBI para identificar espécies de *Trypanosoma* e/ou DTUs de *T. cruzi*. A identificação foi confirmada quando a sequência obtida tinha comprimento mínimo de 400 pb, um *e-value* igual a zero, 98% de cobertura e um mínimo de 97% de identidade com sequências de referência do GenBank. As sequências foram alinhadas utilizando CLUSTALW (Thompson et al., 1994). As histórias evolutivas no gene rRNA 18S foram inferidas em Mega 7 (Kumar et al., 2016) pela Máxima Verossimilhança (ML) usando o modelo de Kimura de dois parâmetros de substituição de nucleotídeos com locais distribuídos gamma-distribuídos (K2 + G + I) Bootstrapping a 1000 repetições para suporte nodal.

Utilizamos na análise as linhagens de referência do clado *T. cruzi* e *Herpetomonas zitiplika* como *outgroup*.

3.10.2 Análises estatísticas

A riqueza e prevalência de espécies de *Trypanosoma* (e DTU de *T. cruzi*) foram comparadas entre espécies e micro-habitats, utilizando-se a análise estatística Qui-quadrado. O teste foi realizado utilizando o software R (Versão 2.11.1, R Development Core Team, 2010), considerando o nível de significância ($p < 0,05$).

3.11 Aspectos Éticos

As capturas e coleta de materiais dos morcegos foram autorizadas junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (números 44089-1 e 47377-1) (anexos 2 e 3). Os procedimentos com os animais seguiram protocolos aprovados pelo Conselho de Ética do Uso de animais da Fiocruz (LW81-12). As carcaças dos animais eutanasiados foram depositadas na coleção do Laboratório de Ecologia de Mamíferos da Universidade Federal do Acre para pesquisas e estudos didáticos.

4 RESULTADOS

Diversidade e abundância da fauna de quirópteros

As quatro excursões de campo resultaram na captura de 367 espécimes de quirópteros, incluídos em três famílias (Phyllostomidae, Emballonuridae e Vespertilionidae), pertencentes a 23 gêneros e 32 espécies. A família Phyllostomidae predominou em grande parte porque incluiu 21 gêneros, enquanto Emballonuridae e Vespertilionidae incluíram um gênero cada (Figuras 11 e 12).

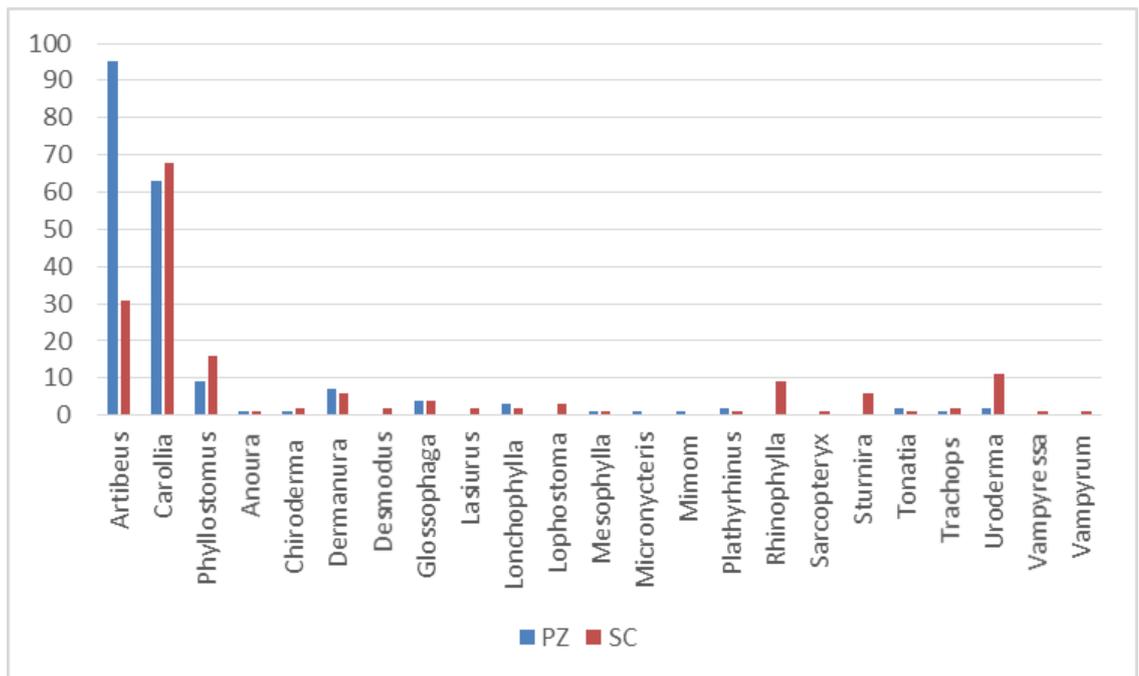


Figura 11: Diversidade de gêneros da quiróptero-fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

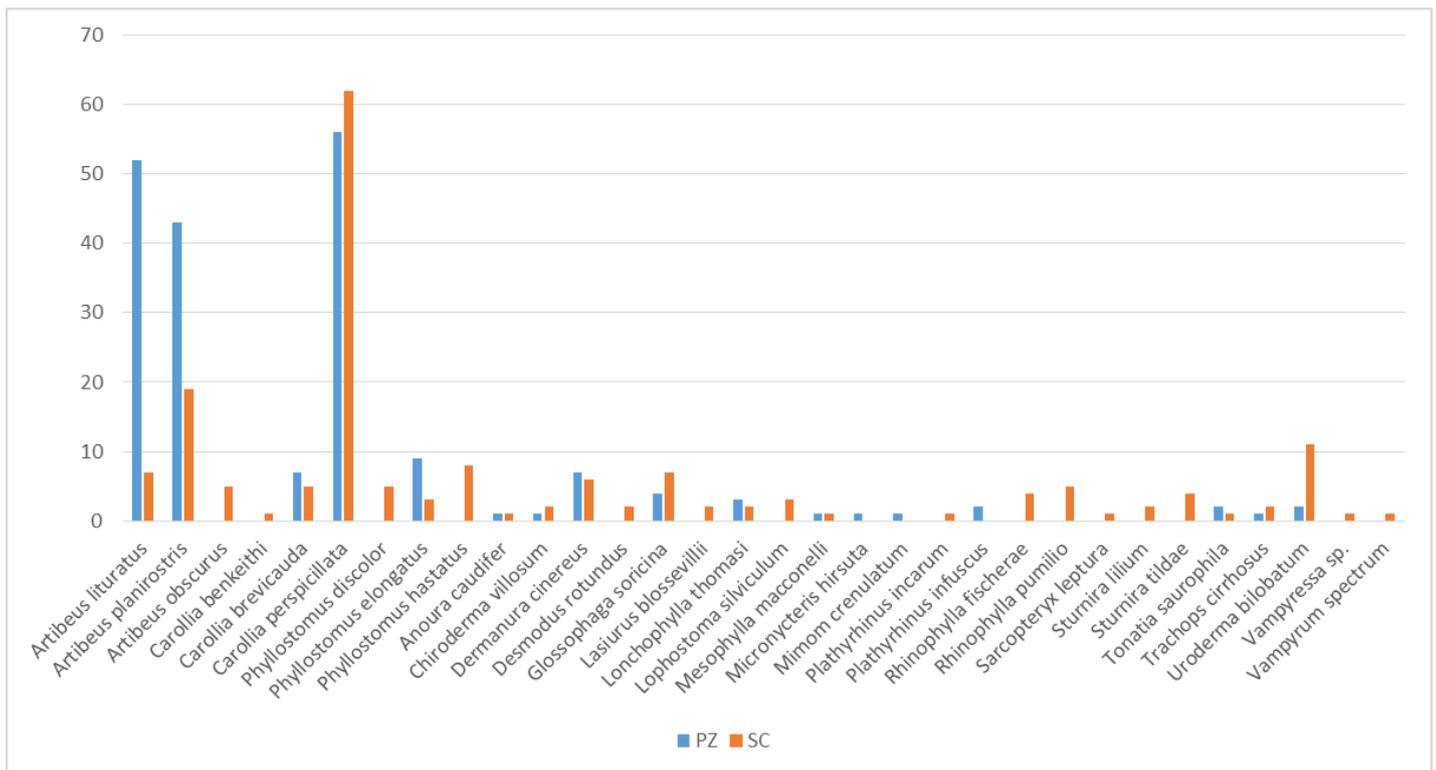


Figura 12: Riqueza de espécies da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

O número de espécimes de morcegos capturados nas duas áreas de estudo, respectivamente PZ (193 indivíduos) e SC (174 indivíduos), não diferiu significativamente ($P=0,08$). A composição das espécies da fauna de quiropteros, no entanto, foi específica a cada uma das duas áreas (tabela 3).

Tabela 3: Distribuição e abundância das espécies da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Espécies	(N) Espécimes	(N) Espécimes	Total Espécimes
	PZ	SC	
<i>Artibeus lituratus</i>	52	7	59
<i>Artibeus planirostris</i>	43	19	62
<i>Artibeus obscurus</i>		5	5
<i>Carollia benkeithi</i>		1	1
<i>Carollia brevicauda</i>	7	5	12
<i>Carollia perspicillata</i>	56	62	118
<i>Phyllostomus discolor</i>		5	5
<i>Phyllostomus elongatus</i>	9	3	12
<i>Phyllostomus hastatus</i>		8	8
<i>Anoura caudifer</i>	1	1	2
<i>Chiroderma villosum</i>	1	2	3
<i>Dermanura cinereus</i>	7	6	13

(continuação)

Espécies	(N) Espécimes	(N) Espécimes	Total Espécimes
	PZ	SC	
<i>Desmodus rotundus</i>		2	2
<i>Glossophaga soricina</i>	4	7	11
<i>Lasiurus blossevillii</i>		2	2
<i>Lonchophylla thomasi</i>	3	2	5
<i>Lophostoma silviculum</i>		3	3
<i>Mesophylla macconelli</i>	1	1	2
<i>Micronycteris megalotis</i>	1		1
<i>Mimom crenulatum</i>	1		1
<i>Plathyrhinus incarum</i>		1	1
<i>Plathyrhinus infuscus</i>	2		2
<i>Rhinophylla fischeriae</i>		4	4
<i>Rhinophylla pumilio</i>		5	5
<i>Sarcopteryx leptura</i>		1	1
<i>Sturnira lilium</i>		2	2
<i>Sturnira tildae</i>		4	4
<i>Tonatia saurophila</i>	2	1	3
<i>Trachops cirrhosus</i>	1	2	3
<i>Uroderma bilobatum</i>	2	11	13
<i>Vampyressa sp.</i>		1	1
<i>Vampyrum spectrum</i>		1	1
(N) de Espécies / (N) Espécimes	17/193	29/174	32/367

O número de espécies de morcegos nas duas áreas foi significativamente maior em SC (n = 29) em comparação com PZ (n = 17) (p = 0,016). As espécies *Artibeus* spp. e *Carollia* spp. predominaram em ambas as áreas, sendo a primeira ligeiramente mais abundante (n=131; 35,9% e n= 126; 34,3%, respectivamente). A abundância relativa de espécies do gênero *Artibeus* spp. foi significativamente maior no PZ (49,2%) em relação ao SC (18,1%) (p<0,0001). Em contraste, a abundância relativa de morcegos do gênero *Carollia* spp. foi comparável nas duas localidades: 32,6% no PZ e 39,7% no SC (p=0,10).

Das três espécies coletadas de *Artibeus* spp., *A. lituratus* e *A. planirostris* predominaram em ambas as localidades. Além disso, alguns espécimes (n=5) de uma terceira espécie, *A. obscurus*, foram coletados apenas no SC. Também foram detectadas três espécies do gênero *Carollia*: um espécime de *C. beinkeith* na área A5 (SC); nove espécimes de *C. brevicauda* tanto no PZ (n=4) quanto no SC (n=5) e 118 espécimes da espécie mais generalista do gênero, *C. perspiscillata*. Esta espécie foi detectada em todas as áreas dos dois municípios estudados.

Além de 14 gêneros de morcegos comuns a ambas as áreas de estudo, espécies de morcegos pertencentes a outros oito gêneros (*Vampyrum*, *Vampyressa*, *Stunira*, *Sarcopteryx*, *Rhinophylla*, *Lophostema*, *Lasiurus* e o hematófago *Desmodus* sp.) foram encontrados exclusivamente no SC enquanto espécies dos gêneros *Mimon* e *Micronycteris* foram encontrados exclusivamente no PZ. Os dados referentes à abundância de cada espécie de morcegos por área de ambos os municípios estão listados na tabela 4.

Considerando os três habitats estudados (Terra firme, Baixio e Área Aberta), observamos que as capturas no PZ ocorreram nas seguintes proporções: Terra firme (25,9%), Baixio (44,5%) e Área Aberta (29,6%), com uma riqueza de espécies de 7, 12 e 8, respectivamente. No SC, as capturas de morcegos ocorreram nas seguintes proporções: Terra Firme (38%), Baixio (38%) e Área Aberta (24%), com uma riqueza de espécies de 19, 19 e 12, respectivamente.

Dentre os habitats, em ambas as áreas (PZ e SC) o Baixio, área intermediária de preservação, teve a maior abundância relativa (44,1%) e riqueza de espécies (40,3%). As espécies com maior número de indivíduos capturados nestes habitats foram o *C. perspicillata* (n=61), *A. planirostris* (n= 23) e *A. lituratus* (n=19) (tabela 4). Estas espécies foram encontradas em todos os ambientes e nas duas localidades PZ e SC, sendo *C. perspicillata* sempre em número superior às demais.

Tabela 4: Abundância e riqueza da quiroptofauna por habitats do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

HABITATS	TERRA FIRME		BAIXIO		AREA ABERTA	
	PZ	SC	PZ	SC	PZ	SC
AREAS DE ESTUDO	A1	A4	A2	A5	A3	A6
ESPECIES						
<i>Anoura caudifer</i>					1	1
<i>Artibeus lituratus</i>	17	3	13	3	22	1
<i>Artibeus planirostris</i>	21	11	16	7	6	1
<i>Artibeus obscurus</i>	3	2		3		
<i>Carollia benkeithi</i>				1		
<i>Carollia brevicauda</i>		3	4	2		
<i>Carollia perspicillata</i>	16	26	33	28	7	8
<i>Chiroderma villosum</i>		1			1	1
<i>Dermanura cinereus</i>		1	6	5	1	

(continuação)

HABITATS	TERRA FIRME		BAIXIO		AREA ABERTA	
	PZ	SC	PZ	SC	PZ	SC
AREAS DE ESTUDO	A1	A4	A2	A5	A3	A6
<i>Desmodus rotundus</i>				2		
<i>Glossophaga soricina</i>	1	1	3			6
<i>Lasiurus blossevillii</i>				2		
<i>Lonchophylla thomasi</i>		1	3			1
<i>Lophostoma silviculum</i>				3		
<i>Mesophylla macconelli</i>			1	1		
<i>Micronycteris hirsuta</i>			1			
<i>Mimom crenulatum</i>					1	
<i>Phyllostomus discolor</i>						5
<i>Phyllostomus elongatus</i>	6	1	3	2		
<i>Phyllostomus hastatus</i>		2		2		4
<i>Plathyrrhinus incarum</i>		1				
<i>Plathyrrhinus infuscus</i>			2			
<i>Rhinophylla fischeriae</i>						4
<i>Rhinophylla pumilio</i>		1		1		3
<i>Sarcopteryx leptura</i>		1				
<i>Sturnira lilium</i>				2		
<i>Sturnira tildae</i>		2		2		
<i>Tonatia saurophila</i>	2			1		
<i>Trachops cirrhosus</i>		1	1	1		
<i>Uroderma bilobatum</i>		2		8	2	1
<i>Vampyressa sp.</i>		1				
<i>Vampyrum spectrum</i>		1				
ABUNDÂNCIA	66	62	86	76	41	36
TOTAL	128		162		77	
RIQUEZA DE ESPÉCIES	7	19	12	19	8	12
TOTAL	16		31		20	

Distribuição da infecção por *Trypanosoma* spp. em quirópteros do Parque Zoobotânico e Seringal Cachoeira no estado do Acre, Bioma Amazônia

A infecção por *Trypanosoma* spp. foi observada em 85 morcegos (23,2%), sendo quatro deles observados apenas por exame de sangue fresco, enquanto 81 (22%) de 15 gêneros e 22 espécies apresentaram-se positivos nas hemoculturas. Destes 81, 12 (14,8%) também apresentaram exame de sangue fresco positivo.

Na comparação de sucesso entre os diferentes meios de cultura, verificamos que o sucesso de isolamento foi superior utilizando o meio LIT (n=62; 76,5%) em comparação com a positividade nos dois meios de cultura LIT e Schneider (n=17; 21%) e apenas no meio Schneider (n=2; 2,5%) (tabela 5).

Tabela 5: Meios de cultivos utilizados para amplificação dos parasitos encontrados em quirópteros capturados do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

LBT	ESPÉCIES	LIT	Schnneider®	LIT + Schneider®
5004	<i>Glossophaga soricina</i>	+		
5009	<i>Artibeus lituratus</i>	+		
5026	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5037	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5040	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5041	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5042	<i>Trachops cirrhosus</i>	+		
5043	<i>Sturnira tildae</i>	+		
5047	<i>Phyllostomus elongatus</i>	+		
5060	<i>Phyllostomus hastatus</i>			+
5338	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
5340	<i>Artibeus lituratus</i>	+		
5348	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
5389	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
5408	<i>Artibeus planirostris</i>			+
5409	<i>Artibeus planirostris</i>		+	
5416	<i>Phyllostomus hastatus</i>			+
5423	<i>Phyllostomus hastatus</i>			+
5425	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
5427	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5428	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
5431	<i>Artibeus lituratus</i>			+
5434	<i>Lophostoma silviculum</i>			+
5435	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5439	<i>Uroderma bilobatum</i>	+		
5441	<i>Phyllostomus elongatus</i>			+
5444	<i>Sturnira lilium</i>			+
5450	<i>Lophostoma silviculum</i>			+
5451	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
5466	<i>Phyllostomus hastatus</i>			+
5467	<i>Phyllostomus hastatus</i>			+
5469	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5471	<i>Phyllostomus discolor</i>			+
5472	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
5473	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
6568	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
7056	<i>Carollia brevicauda</i>	+		

(continuação)

LBT	ESPÉCIES	LIT	Schnneider®	LIT + Schnneider®
7057	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7058	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7059	<i>Carollia brevicauda</i>	+		
7060	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
7061	<i>Artibeus planirostris</i>	+		
7062	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7063	<i>Carollia perspicillata</i>			+
7064	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7065	<i>Trachops cirrhosus</i>	+		
7066	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7067	<i>Plathyrhinus infuscus</i>	+		
7068	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7074	<i>Artibeus lituratus</i>	+		
7078	<i>Carollia brevicauda</i>	+		
7079	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7080	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7081	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7082	<i>Carollia perspicillata</i>			+
7083	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7084	<i>Vampyressa sp.</i>	+		
7085	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7086	<i>Trachops cirrhosus</i>	+		
7087	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7088	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7089	<i>Carollia beinkeith c.f.</i>	+		
7090	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7091	<i>Tonatia saurophila</i>	+		
7092	<i>Artibeus lituratus</i>	+		
7093	<i>Artibeus obscurus</i>	+		
7094	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7095	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7096	<i>Glossophaga soricina</i>	+		
7097	<i>Phyllostomus discolor</i>			+
7098	<i>Lonchophylla thomasi</i>	+		
7099	<i>Anoura caudifer</i>	+		
7100	<i>Phyllostomus discolor</i>	+		
7101	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7102	<i>Artibeus lituratus</i>			+
7104	<i>Carollia perspicillata</i>	+		
7105	<i>Dermanura cinereus</i>	+		
7106	<i>Phyllostomus hastatus</i>			+
7108	<i>Artibeus planirostris</i>	+		

(continuação)

LBT	ESPÉCIES	LIT	Schnneider®	LIT + Schnneider®
7110	<i>Lasiurus blossevillii</i>		+	
7113	<i>Phyllostomus discolor</i>	+		
TOTAL	81	62	2	17

A distribuição de morcegos infectados com *Trypanosoma* spp. foi diferente de acordo com os dois municípios de estudo e de acordo com o habitat. Entre os 23 gêneros de quirópteros examinados, 15 apresentaram infecção por *Trypanosoma* spp. Já dentre as 32 espécies examinadas, 22 foram positivas para *Trypanosoma* spp. A infecção por *Trypanosoma* spp. foi três vezes maior em chiroptera do SC (n= 60; 34,5%) em comparação com morcegos do PZ (n = 21; 10,9%) ($p < 0,0001$).

No PZ, o potencial de infectividade para vetores, expresso por hemoculturas positivas dos morcegos examinados, foi restrito a espécies dos dois gêneros mais abundantes, *Artibeus* e *Carollia* (85,7%). Observou-se um quadro enzoótico distinto no SC, onde foi observado maior número de morcegos infectados e maior diversidade de espécies de morcegos em todas as áreas coletadas. O potencial de infectiosidade foi distribuído entre 14 gêneros de morcegos, embora 56,6% das infecções foram observadas em espécies de *Carollia* e *Artibeus*. Em geral, as espécies de morcego infectadas com *Trypanosoma* sp. mais comuns foram a espécie *C. perspicillata*, em que 16,3% foram infectadas.

Dos 131 indivíduos do gênero *Carollia* capturados, foram encontrados infectados por *Trypanosoma* spp. 9/63 no PZ (14,3%) e 24/68 no SC (35,3%). No gênero *Artibeus* dos 126 indivíduos capturados, foram encontrados infectados por *Trypanosoma* spp. 9/95 no (PZ), (9,5%) e 10/31 no (SC), (32,3%). Já no gênero *Phyllostomus* dos 25 indivíduos, 0/9 no (PZ) e 12/16 no (SC), (75%). Exemplares do gênero *Lophostoma* somente foram capturados no SC (n=3) e 2 estavam infectados (tabela 6).

Tabela 6: Distribuição de *Trypanosoma* spp. encontrado infectando quirópteros do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Gêneros	Município de Rio Branco (PZ) Positivos/total (%)	Município de Xapuri (SC) Positivos/total (%)
<i>Artibeus</i>	9/95 (9,5)	10/31 (32,3)
<i>Carollia</i>	9/63 (14,3)	24/68 (35,3)
<i>Phyllostomus</i>	0/9	12/16 (75)
<i>Anoura</i>	0/1	1/1 (100)
<i>Dermanura</i>	0/7	1/6 (16,7)
<i>Glossophaga</i>	1/4 (25)	1/6 (16,7)
<i>Lasiurus</i>	-	1/2 (50)
<i>Lonchophylla</i>	0/3	1/2 (50)
<i>Lophostoma</i>	-	2/3 (66,6)
<i>Plathyrrhinus</i>	1/2 (50)	0/1
<i>Sturnira</i>	-	2/6 (33,3)
<i>Tonatia</i>	0/2	1/1 (100)
<i>Trachops</i>	1/1 (100)	2/2 (100)
<i>Uroderma</i>	0/2	1/11 (9,1)
<i>Vampyressa</i>	-	1/1 (100)
Total	21/193 (10,9)	60/174 (34,5)

A diversidade de espécies de morcegos no PZ foi maior na área A2, onde 12 espécies distintas puderam ser distinguidas entre os 86 indivíduos coletados. Além disso, a prevalência de infecção por *Trypanosoma* spp. foi maior nesta área (16,3%), em comparação com A1 (7,6%) e A3 (4,9%), embora tenha havido apenas diferença significativa entre A2 e A3 ($p = 0,035$). No SC, não foram observadas diferenças na infecção por *Trypanosoma* spp. entre as áreas distintas ($p = 0,305$).

Dos 81 morcegos que foram positivos na hemocultura, foram obtidos 68 isolados de 67 morcegos (dois isolados foram obtidos de um mesmo *C. perspicillata* de PZ - LBT 7063). Três massas de cultura também foram caracterizadas com sucesso. As infecções dos outros 11 morcegos foram diagnosticadas apenas pelas características morfológicas dos parasitas observados em culturas positivas.

Diversidade de *Trypanosoma* spp. infectando morcegos no Acre

Foram observadas pelo menos seis espécies diferentes e/ou DTUs de *T. cruzi* infectando morcegos do Acre. Além disso, foram também detectadas duas infecções mistas. Um foi identificado na mesma hemocultura (LBT 5060) e o outro foi identificado em duas hemoculturas diferentes do mesmo morcego (LBT 7063). No

PZ e SC, a maioria dos morcegos infectados foram coletados, respectivamente, nas áreas A2 (14/86; 16,3%) e A5 (25/76; 32,9%), onde há abundância de palmeiras e foram caracterizadas como florestas abertas de dossel apresentando manchas de floresta densa com árvores emergentes (área de baixio). Em seguida vieram os ambientes A1 (5/66; 7,6%) e A4 (21/62; 33,9%), que são áreas com florestas similar, no entanto a primeira é de floresta secundária e a segunda floresta primária (Terra firme) (Tabela 7). O ambiente com menor taxa de infecção por animais capturados foi A3 (2/41; 4,9%) e A6 (14/36; 38,9%), que são áreas próximas a residências (Figura 13). As diferenças observadas entre as áreas, no entanto, não foram estatisticamente significantes.

Tabela 7: Distribuição e diversidade de *Trypanosoma* spp. em Chiroptera do Estado do Acre, Bioma Amazônia de acordo com áreas de estudo e habitats distintos. A caracterização foi realizada utilizando iniciadores SSU 18S que foram descritos por Noyes *et al.* (1999).

<i>Trypanosoma</i>	Município de Rio Branco			Município de Xapuri			Total
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	
<i>Trypanosoma cruzi</i> TcI	1	10	2	9	16	7	45
<i>Trypanosoma cruzi</i> TcIV	2	1	-	-	-	-	3
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	-	1	-	3	4	4	12
<i>Trypanosoma dionisii</i>	-	1	-	3	-	2	6
<i>Trypanosoma rangeli</i>	-	-	-	1		1	2
<i>T. cruzi</i> TcIV + <i>T. cruzi marinkellei</i>	-	-	-	-	1	-	1
<i>Trypanosoma</i> sp. + <i>T. cruzi</i> TcI		1					1
<i>Trypanosoma</i> sp. [§]	2	-	-	5	4	-	11
Total	5	14	2	21	25	14	81

[§] Identificação Morfológica

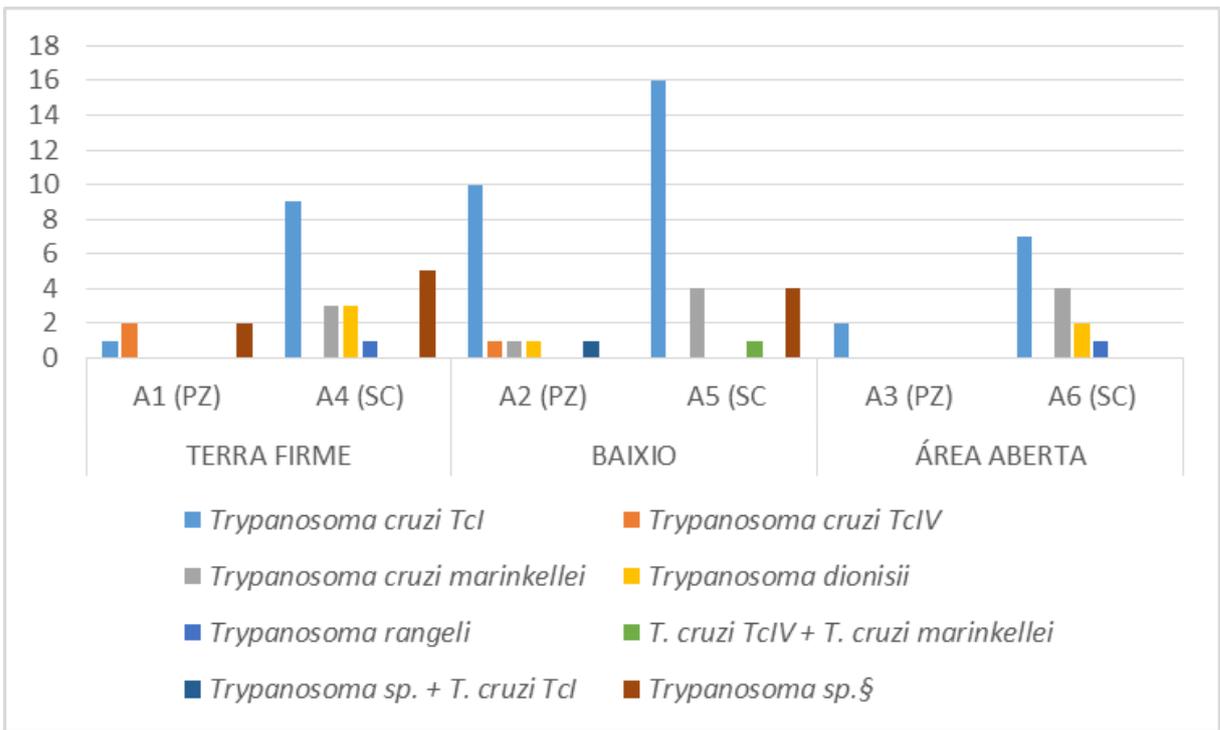


Figura 13: Distribuição de *Trypanosoma* spp. por características dos gradientes do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

T. cruzi TcI seguido por *T. c. marinkellei* foram as espécies de tripanossomatídeos mais distribuídas e com maior prevalência (tabela 8). No entanto, enquanto *T. cruzi* TcI foi encontrado infectando morcegos em todas as áreas, 11 dos 12 *T. c. marinkellei* foram identificados em morcegos coletados nas três áreas do SC. Foi observada uma característica semelhante para *T. dionisii* em que 5 dos 6 morcegos infectados eram do mesmo município. *T. cruzi* TcIV foi detectado apenas nas áreas mais preservadas do PZ (A1 e A2) e no SC, e este último co-infecção com *T. c. marinkellei* (Figura 14). Os dois isolados que foram caracterizados como *T. rangeli* pertencem ao genótipo A e foram derivados de morcegos do SC (*C. perspicillata* e *A. planirostris*). Uma espécie de *Trypanosoma* ainda não descrita foi isolada em co-infecção com *T. cruzi* TcI num morcego de PZ. Obtiveram-se dois isolados do mesmo morcego, e cada um apresentou identidade para diferentes espécies em comparação com as sequências de GenBank (tabela 9). Uma dessas amostras agrupou-se no mesmo ramo que os tripanossomas descritos em morcegos neotropicais, entre *T. wauwau* e *Trypanosoma* sp. RNMO56 e 63 (Figura 15). Embora parasitas tenham sido observados em outras 11 hemoculturas positivas, essas culturas não foram estabelecidas e os parasitas foram caracterizados apenas como *Trypanosoma* sp. com base na sua morfologia em culturas axênicas.

Tabela 8: Diversidade de *Trypanosoma* spp. em morcegos do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Gêneros	<i>T. cruzi</i> TcI	<i>T. cruzi</i> TcIV	<i>T. c.</i> <i>marinkellei</i>	<i>T.</i> <i>dionisii</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. + <i>T. cruzi</i> DTU I	<i>T. cruzi</i> TcIV + <i>T. c.</i> <i>marinkellei</i>	<i>T.</i> <i>rangeli</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.
<i>Carollia</i>	24			3	1		1	4
<i>Artibeus</i>	8	2	2	1			1	5
<i>Phyllostomus</i>	2		8			1		1
<i>Anoura</i>	1							
<i>Dermanura</i>	1							
<i>Glossophaga</i>	1	1						
<i>Lasiurus</i>	1							
<i>Lonchophylla</i>	1							
<i>Lophostoma</i>			2					

(continuação)

Gêneros	<i>T. cruzi</i> TcI	<i>T. cruzi</i> TcIV	<i>T. c.</i> <i>marinkellei</i>	<i>T.</i> <i>dionisii</i>	<i>Trypanosoma</i> spp. + <i>T. cruzi</i> DTU I	<i>T. cruzi</i> + <i>T. c.</i> <i>marinkellei</i>	<i>T. cruzi</i> TcIV <i>rangeli</i>	<i>Trypanosoma</i> spp.
<i>Plathyrhinus</i>	1							
<i>Sturnira</i>				1				1
<i>Tonatia</i>	1							
<i>Trachops</i>	2			1				
<i>Uroderma</i>	1							
<i>Vampyressa</i>	1							
Total	45	3	12	6	1	1	2	11

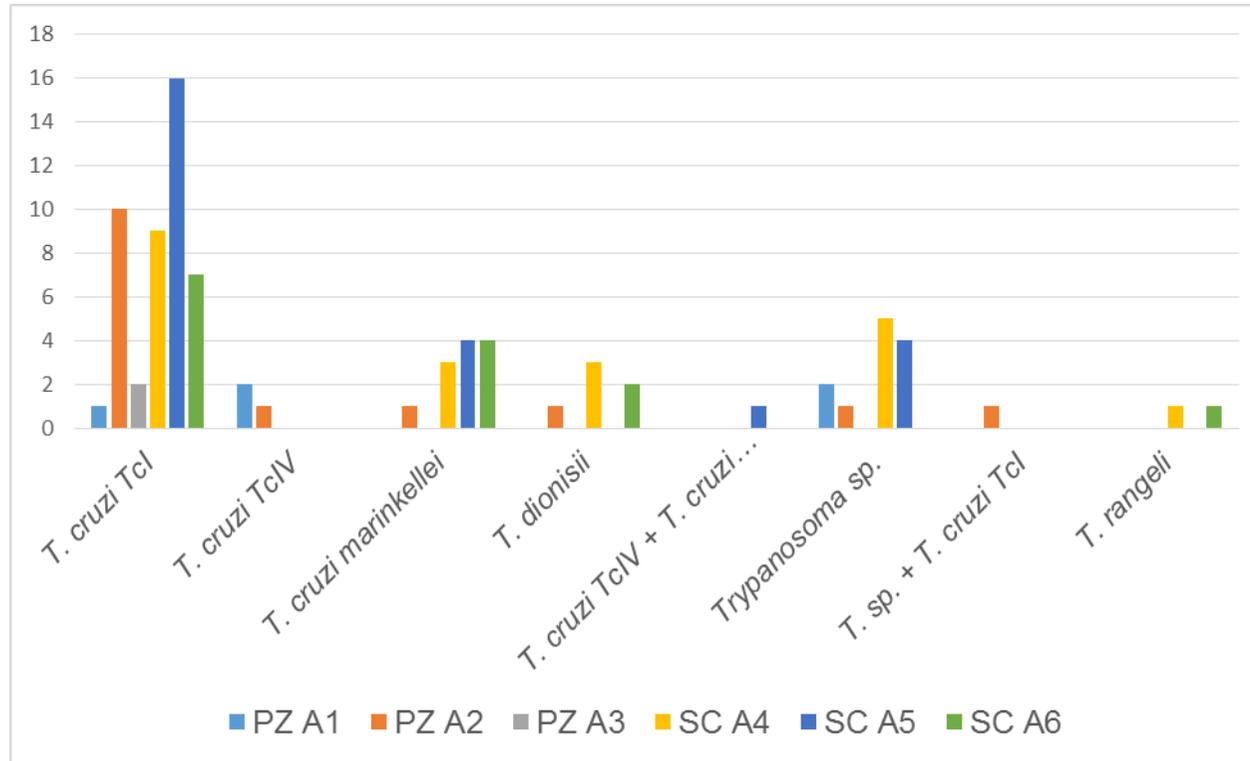


Figura 14: Distribuição de *Trypanosoma* spp. por características das áreas de estudo do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

Tabela 9: Números de identificação, espécies de morcegos, localidade e caracterização molecular dos tripanosomatídeos usando SSUrDNA. A última coluna inclui o número de acesso ao GenBank de cada sequência depositada.

Nº Coltryp [‡]	Isolados	Espécies Hospedeiras	Área	18S SSU	Nº de acesso ao GenBank
549	LBT 5060	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcIV* + <i>T. c. marinkellei</i> *	KY748354 KY824655
550	LBT 5004	<i>Glossophaga soricina</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcIV*	KY748355
555	LBT 5009	<i>Artibeus lituratus</i>	A1	<i>T. cruzi</i> TcIV*	KY748356
558	LBT 5040	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. dionisii</i> *	KY689928
567	LBT 5043	<i>Sturnira tidae</i>	A4	<i>T. dionisii</i> *	KY689929
568	LBT 5042	<i>Trachops cirrhosus</i>	A4	<i>T. dionisii</i> *	KY689930
574	LBT 5469	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. dionisii</i>	KY649111
579	LBT 5340	<i>Artibeus lituratus</i>	A1	<i>T. cruzi</i> TcIV	KY649112
584	LBT 5473	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. dionisii</i>	KY649113
589	LBT 5408	<i>Artibeus planirostris</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649114
587	LBT 5472	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. rangeli</i> A	KY649115
590	LBT 5439	<i>Uroderma bilobatum</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649116
592	LBT 5427	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649117
634	LBT 6568	<i>Artibeus planirostris</i>	A3	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649118
640	LBT 7060	<i>Artibeus planirostris</i>	A2	<i>T. dionisii</i>	KY649119

(continuação)

Nº Coltryp ‡	Isolados	Espécies Hospedeiras	Área	18S SSU	Nº de acesso ao GenBank
647S	LBT 7063	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>Trypanosoma</i> spp. +	KY649120
647L				<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649121
648	LBT 7065	<i>Trachops cirrhosus</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649122
650	LBT 7068	<i>Carollia perspicillata</i>	A1	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649123
-	LBT 7058	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	N.D.
651	LBT 7074	<i>Artibeus lituratus</i>	A3	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649124
652	LBT 7064	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649125
653	LBT 7056	<i>Carollia brevicauda</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649126
654	LBT 7057	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	N.D.
655B	LBT 7066	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl [#]	KY649127
656	LBT 7059	<i>Carollia brevicauda</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649128
657	LBT 7080	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649129
658	LBT 7081	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649130
659	LBT 7083	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	N.D.
660	LBT 7084	<i>Vampyressa</i> sp.	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	N.D.
661	LBT 7085	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649131
662	LBT 7088	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	N.D.

(continuação)

Nº Coltryp ‡	Isolados	Espécies Hospedeiras	Área	18S SSU	Nº de acesso ao GenBank
663	LBT 7089	<i>Carollia benkeithi</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649132
664	LBT 7090	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649133
665	LBT 7092	<i>Artibeus lituratus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649134
666	LBT 7094	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649135
667	LBT 7095	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649136
668	LBT 7100	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649137
669	LBT 7102	<i>Artibeus lituratus</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649138
670	LBT 7078	<i>Carollia brevicauda</i>	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649139
671	LBT 7097	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649140
672	LBT 7098	<i>Lonchophylla thomasi</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649141
674	LBT 7104	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649142
676	LBT 7087	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	N.D.
677	LBT 7086	<i>Trachops cirrhosus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649143
678	LBT 7105	<i>Dermanura cinereus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649144
680	LBT 7110	<i>Lasiurus blossevillii</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649145
682	LBT 7067	<i>Plathyrrhinus infuscus</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649146
684	LBT 7061	<i>Artibeus planirostris</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649147

(continuação)

Nº Coltryp ‡	Isolados	Espécies Hospedeiras	Área	18S SSU	Nº de acesso ao GenBank
686	LBT 7091	<i>Tonatia saurophilla</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649148
687	LBT 7099	<i>Anoura caudifer</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649149
689	LBT 7108	<i>Artibeus planirostris</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649150
690	LBT 7101	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649151
691	LBT 7093	<i>Artibeus obscurus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY753877
695B	LBT 7062	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> Tcl [#]	KY649152
696	LBT 7079	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649153
697	LBT 7082	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649154
-	LBT 5428	<i>Artibeus planirostris</i>	A4	<i>T. rangeli</i> A	KY649155
-	LBT 7096	<i>Glossophaga soricina</i>	A6	<i>T. cruzi</i> Tcl	KY649156
575	LBT 5416	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A4	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649157
576	LBT 5423	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A4	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649158
577	LBT 5467	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649159
578	LBT 5466	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649160
580	LBT 5434	<i>Lophostoma silviculum</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689835
581	LBT 5471	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689836

(continuação)

Nº Coltryp ‡	Isolados	Espécies Hospedeiras	Área	18S SSU	Nº de acesso ao GenBank
582	LBT 5441	<i>Phyllostomus elongatus</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689837
585	LBT 5425	<i>Artibeus planirostis</i>	A4	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689838
586	LBT 5389	<i>Artibeus planirostis</i>	A2	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689839
591	LBT 5450	<i>Lophostoma silviculum</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689840
673	LBT 7113	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689841
679	LBT 7106	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689842

N.D. Não depositado no GenBank devido à presença de sítios ambíguos

‡ COLTRYP Número de códigos de culturas depositadas e criopreservadas na Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores - COLTRYP (www.coltryp.fiocruz.br) do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ / RJ / Brasil.

* Caracterizado por pares de iniciadores V7V8 (Borghesan et al., 2013).

Parasitas isolados da cultura do baço

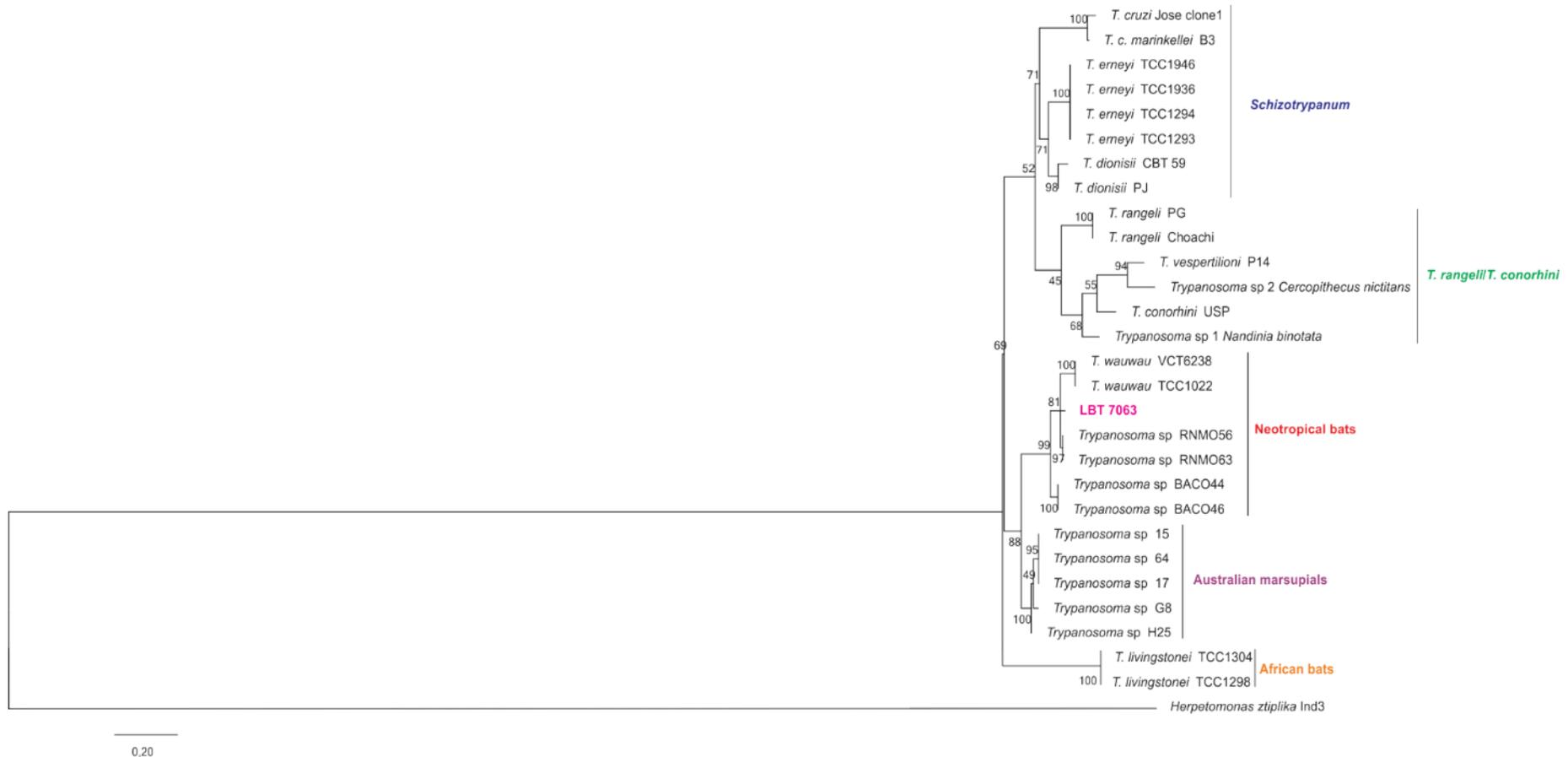


Figura 15: Inferência filogenética do isolado LBT 7063 detectado em *Carollia perspicillata* do município de Rio Branco/AC, no clado *T. cruzi*. A construção da árvore do gene 18S (SSU rRNA) seguiu o método de máxima verossimilhança (ML) sob o modelo de Kimura 2-parâmetros e distribuição gama com sítios invariáveis (K2 + G + I). Os números nos nós indicam apoio estatístico pela análise de *bootstrap* com 1000 repetições. O isolado agrupou-se no clado *T. cruzi* associado a tripanosomas descritos em morcegos neotropicais (Lima et al., 2015).

Os gêneros de morcegos mais abundantes foram *Carollia* spp. e *Artibeus* spp., mas *Phyllostomus* spp. também apresentou infecções com a maior diversidade de espécies de *Trypanosoma*. *T. cruzi* DTU TcI foi a espécie e DTU de *Trypanosoma* mais dispersa. Apenas dois dos 15 gêneros de morcegos infectados (*Lophostoma* e *Sturnira*) não foram encontrados infectados pelo *T. cruzi* TcI. Foram encontrados *T. dionisii* infectando morcegos de quatro gêneros, incluindo o gênero de morcego mais abundante, *Carollia* spp. *T. c. marinkellei* foi observado principalmente em *Phyllostomus* spp. (incluindo uma infecção mista com *T. cruzi* TcIV), bem como em *Lophostoma* sp. e *Artibeus* spp. *Artibeus* spp. foi o taxon com maior diversidade de espécies de *Trypanosoma* spp., seguido pelos mais abundantes gêneros de morcegos *Carollia* spp. e *Phyllostomus* spp. (Figura 16). Outros 11 isolados obtidos de espécimes de *Carollia*, *Artibeus*, *Phyllostomus* e *Sturnira* não puderam ser identificados em análise molecular e foram descritos como *Trypanosoma* sp.

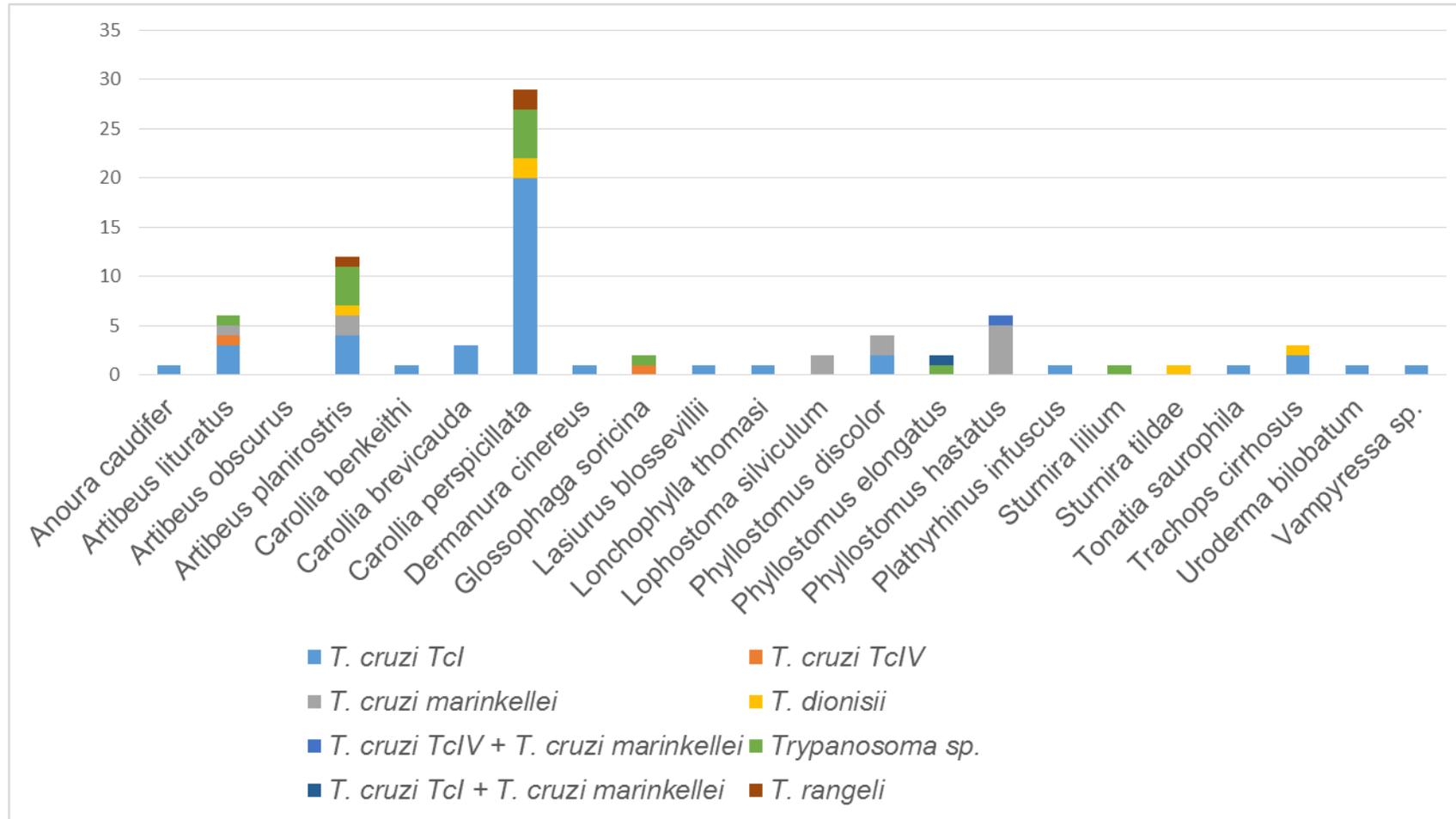


Figura 16: Distribuição de *Trypanosoma* spp. por espécies da quiróptero fauna do Parque Zoobotânico e do Seringal Cachoeira.

DISCUSSÃO

Pouco se sabe sobre a diversidade de morcegos no Acre, um estado da região amazônica que ainda mantém áreas florestais bem conservadas. Sabe-se ainda menos sobre a diversidade de *Trypanosoma* spp. e seus hospedeiros que circulam neste ambiente. Atualmente uma ameaça à saúde na região amazônica e no Estado do Acre é a doença de Chagas, onde casos e surtos estão se tornando frequentes. Foram relatados 13 casos autóctones entre 1988 e 2015, contrastando com outros 25 casos relatados no ano de 2016 (dados da Secretaria de Saúde do Estado do Acre). Na região Amazônica, apesar de se encontrar uma grande quantidade de vetores e de espécies de mamíferos (incluindo morcegos), a distribuição dos parasitos e DTUs de *T. cruzi* ainda é pouco conhecida. Em relação a *T. cruzi*, apesar da grande quantidade de animais que são reservatórios potenciais do parasita na região, foi apenas recentemente que os casos autóctones foram encontrados e um aumento notável deles pode ser observado (Coura et al., 2002, Junqueira et al., 2005). Esse crescente número de casos, provavelmente está ligado a exposição humana em ambientes silvestres e o aumento do desmatamento, ocorrendo assim a aproximação de inúmeros hospedeiros. Estudar os reservatórios destes *Trypanosoma* spp. é fundamental para entender a dinâmica de seu ciclo de transmissão. Um dos mamíferos envolvidos neste cenário é o morcego, considerado como hospedeiro ancestral de *T. cruzi* (Hamilton et al., 2012).

Os morcegos são mamíferos longevos e sua expectativa de vida pode chegar facilmente a mais de duas ou até três décadas (Wilkinson e South, 2002). A abundância e a riqueza das espécies de morcegos estão diretamente ligadas a abundância e riqueza da fauna e da flora destes ambientes. Esta elevada abundância está relacionada ao fato destas espécies poderem ocupar diferentes habitats e se deslocarem por grande distância (Menezes Jr. et al., 2008). No Brasil, 15% da diversidade de morcegos pode ser encontrada na Amazônia, o bioma que exibe a maior diversidade de espécies de morcegos no país. Neste bioma foram relatadas nove famílias de morcegos que incluem 64 gêneros e pelo menos 146 espécies (Bernard et al., 2011). É importante ressaltar que o bioma amazônico está longe de ser homogêneo. Na verdade, esse bioma constitui uma paisagem e mosaico faunístico. Isto também se reflete na composição distinta da fauna de morcego e riqueza de espécies. O Estado amazônico que apresenta a maior

diversidade de espécies de morcegos é o Pará, onde foram descritas 120 espécies. Um número muito menor de espécies de morcegos (n = 59) foi relatado no Acre (Bernard et al., 2011).

Durante as quatro excursões de campo, coletamos um número expressivo e similar de morcegos nas duas áreas de estudo, mas a composição da quiropterofauna diferiu entre as áreas, assim como a abundância relativa de algumas das espécies de morcegos. Estas espécies de morcegos foram distribuídas em apenas três famílias; sendo que duas tinham apenas uma espécie representativa de dois gêneros, *Lasiurus blossevillii* (Vespertilionidae) e *Saccoteryx leptura* (Emballonuridae), ambos na área de estudo do SC. Os demais 364 morcegos capturados foram incluídos em 21 gêneros de Phyllostomidae, a família de morcegos chamados de "nariz de folha".

A diversificação da dieta de Phyllostomidae, que se propõe ter ocorrido 23-26 milhões de anos atrás (Rojas et al., 2011) faz com que este taxon use vários habitats distintos; conseqüentemente, estes morcegos estão expostos aos vários parasitas que infectam os animais que também utilizam estes locais. Mesmo na área altamente preservada do SC, coletamos 29 espécies de morcegos, o que é menor do que as 59 espécies de morcegos descritas no estado do Acre por Bernard et al. (2011). Uma possível razão pode ser que, embora esteja bem preservada, o SC não oferecer locais de refúgio adequados para algumas espécies de morcegos. Também a associação entre a amplitude do nicho alimentar e maior porcentagem de floresta em uma paisagem pode representar dependência dos morcegos por diversos recursos florestais (Duchamp e Swithart, 2008). Além disso, coletamos apenas na altura do sub-bosque; portanto, não capturamos morcegos que voam a uma altitude maior. As espécies de morcegos aqui enumeradas constituem as espécies mais representativas da fauna local de morcego do sub-bosque. Não podemos descartar que o tempo de coleta mais longo e redes colocadas simultaneamente em alturas diferentes resultariam em maior riqueza de espécies de morcegos.

A área do PZ, como esperado, exibiu um número significativamente menor de espécies de morcegos (n = 17). De fato, embora seja uma área de floresta urbana que não é frequentada por turistas, sofre ação antrópica porque existe um instituto de pesquisa nesta área onde circulam pessoas e veículos. Espécies do gênero *Carollia* sp parecem estar bem adaptadas a ambientes alterados, como mostra o número semelhante de taxons coletados em ambas as áreas de estudo. Por contraste, *Phyllostomus* spp. foi principalmente coletado em SC enquanto no PZ a

maior taxa de sucesso de captura foi de morcegos do gênero *Artibeus*. Uma hipótese é que a maior diversidade de fauna de morcegos no SC resultou em maior pressão seletiva, o que resultou em maior competição por abrigos pelas diferentes populações dos gêneros de morcegos e menor expansão do generalista *Artibeus* spp.. As espécies mais capturadas no PZ também são comuns em outras regiões urbanas do Brasil (Perini et al., 2003, Knecht et al., 2005, Silva et al., 2005, Lima, 2008). Isto pode estar relacionado ao fato de apresentarem natureza generalista, o que permite a utilização de uma gama de recursos alimentares e abrigos encontrados nas cidades (Bredt e Uieda 1996, Bredt e Silva 1998).

Morcegos são caracterizados pela sua plasticidade ecológica e adaptabilidade a ambientes perturbados por ações antrópicas, incluindo agrossistemas (Estrada et al., 1993; Faria e Baumgarten, 2007; Luz, 2012). Bobrowiec e Gribel (2010) verificaram que diferenças no ambiente influenciam na diversidade de morcegos em diferentes locais e que áreas com maior complexidade na composição de plantas abrigam maior número de morcegos frugívoros. Este resultado corrobora alguns estudos que mostram redução na riqueza de espécies de quirópteros em áreas altamente urbanizadas (Bredt e Uieda, 1996, Ávila-Flores e Fenton, 2005, Hourigan et al., 2006, Johnson et al., 2008).

Nos dois municípios *Artibeus* e *Carollia* foram os mais abundantes. Esta predominância de filostomídeos poderia ser esperada devido ao uso de redes decaptura, pelo fato desta família ser a mais rica na região Neotropical e ter o hábito de forragear em sub-bosque na busca por frutos (Simmons e Voss, 1998; Fenton et al. 1992; Nogueira et al., 2014) corroborando com a literatura que as reportam como dominantes em termos de riqueza e abundância nas comunidades de mamíferos em inventários de várias localidades (Gardner, 1977; Fenton et al., 1992; Dias et al., 2002; Passos et al., 2003; e.g.; Esbérard et al., 2014). Além disso, os morcegos apresentam alta capacidade de deslocamento, o que significa que eles são altamente capazes de dispersar parasitas por um longo tempo. Chiroptera podem associar-se em colônias estáveis que incluem milhares de espécimes, bem como de modo solitário (Wilkison et al., 2016).

Dentre os locais de coleta, tanto no PZ quanto no SC, nas quatro expedições, o Baixo foi onde tivemos o maior sucesso de captura, fato este que está provavelmente relacionado à grande concentração de palmeiras que são reconhecidamente habitats de morcegos e fontes de água. A predominância dos gêneros *Carollia* spp. e *Artibeus* spp., já foi reportada em outros estudos no Acre

(Calouro et al. 2010) e a sua abundância está diretamente ligada à sua dieta preferencial por plantas do gênero *Piper* (Mello et al. 2004), planta que há em grande quantidade no bioma amazônico.

A riqueza e abundância de espécies da quiropterofauna no Estado do Acre ainda é pouco conhecida, prova disto, foi que em uma das expedições, capturamos a espécie insetívora *Lasiurus blossevillii*. Esta espécie ocorre em Trinidad e Tobago, Equador (incluindo as Ilhas Galápagos), Bolívia, Chile, norte da Argentina, Uruguai e Brasil (Reid, 1997; Simmons, 2005), no entanto não havia sido registrada no estado. Este encontro foi publicado na revista *Oecologia Australis* (Anexo 4).

Somente no SC foi capturada a espécie *Lophostoma silvicolum* (família Phyllostomidae) corroborando com Fenton et al. (1992) e Medellín et al. (2000) que nos seus estudos afirmam que estes animais são sensíveis às alterações e servem como referências importantes de qualidade ambiental de áreas florestais, pois, suas presenças representam a integridade do ambiente.

Os morcegos podem alojar-se em vários habitats naturais e artificiais e podem modificar a vegetação para formar locais apropriados para moradias que são construídas por alguns gêneros de morcegos. Estas moradias resultam de morcegos mastigando ou sugando grandes vasos de seiva de uma árvore de folha grande. Como resultado, a seiva é impedida de circular, o que provoca o murchamento dessa parte da folha e resulta num excelente refúgio (Stoner, 2000). Vale ressaltar que as folhas de palmeiras são freqüentemente utilizadas pelos morcegos e são um habitat clássico de espécimes de *Rhodnius*, um gênero de triatomíneo, vetor muito eficiente de *T. cruzi*, e comum na Amazônia (Coura e Junqueira, 2015). Considerando que os morcegos são predadores vorazes de insetos é muito provável que possam se infectar (pelo menos *T. cruzi* e *T. rangeli*) pela ingestão de vetores infectados. Nossas amostras de morcego incluíram os gêneros de construtor de moradias *Artibeus*, *Vampyressa*, *Uroderma* e *Mesophylla*; com exceção do último destes, todos os demais gêneros foram infectados pelo *T. cruzi*. De fato, a presença de insetos na dieta de morcegos significa que eles podem ser infectados pelo *T. cruzi* e provavelmente também por outros tripanossomatídeos transmitidos por insetos. A via oral, através da ingestão de insetos infectados, é conhecida por ser uma rota de infecção altamente eficiente (Gardner, 1979; Carrillo-Araujo et al., 2015).

A diversidade de espécies de morcegos infectadas por *T. cruzi* nos dois fragmentos florestais, ocorre de diferentes maneiras, mas a transmissão oral devido

à ingestão de insetos infectados certamente desempenha papel importante. Morcegos do gênero *Carollia*, *Artibeus* e *Molossus* foram infectados após alimentação experimental em *Rhodnius prolixus* infectado (Thomas et al., 2007). Além disso, a espécie onívora *Phyllostomus hastatus* tornou-se infectada após a ingestão de camundongos infectados (Thomas et al., 2007). Mesmo predominantemente morcegos frugívoros como *Artibeus* sp., *Carollia* sp. e *Glossophaga* sp. freqüentemente se alimentam de insetos e podem ser infectados dessa maneira (Gardner, 1979). Quando se observa que a maioria das espécies de morcegos infectados inclui insetos em sua dieta, não podemos deixar de considerar a hipótese de ser a via oral a principal rota de infecção por estas espécies de *Trypanosoma*. No entanto, seria necessário confirmar que hemípteros (no caso de *T. cruzi*) também estão incluídos entre os insetos predados. De fato, o odor das glândulas de cheiro tão características dos hemípteros podem representar um empecilho.

Provavelmente a transmissão vetorial de parasitas como é o caso das espécies do gênero *Trypanosoma* spp. é altamente favorecida nas espécies de morcegos que formam grandes colônias. Além disso, os morcegos podem apresentar estrutura social complexa que inclui o comportamento cooperativo, mesmo entre os componentes de grupos distintos. A cooperação inclui a reposição, cuidado da prole, forrageamento e alimentação (Gardner, 2007). A partilha de alimentos de animais adultos com os seus filhotes é um padrão de comportamento bastante comum no mundo animal e também pode favorecer a transmissão dos parasitos. Isto pode ser especialmente o caso de tripanossomatídeos de morcegos presentes nos três gêneros hematófagos (*Desmodus*, *Dyphilla* e *Dyaemus*). Morcegos que conseguem sugar sangue em uma noite compartilham este alimento entre adultos, isto é, indivíduos regurgitam o sangue que obtiveram, não apenas para seus filhotes, mas também para os morcegos adultos que não puderam se alimentar (Wilkinson et al., 2016). Os morcegos também podem cooperar no cuidado da prole, incluindo a alimentação de outros filhotes fêmeas, e manter grupos de jovens como uma creche (Wilkinson et al., 2016).

Os morcegos são excelentes reservatórios de *Trypanosoma* spp. e seus hospedeiros provavelmente mais antigos (Molyneux, 1991, Hamilton et al., 2012). O aumento do poder analítico das ferramentas moleculares resultou em número crescente de novas espécies de *Trypanosoma* spp. descritas em quirópteros nos últimos anos. A diversidade de espécies de morcegos na região amazônica requer

mais estudos porque muito pouco se sabe sobre a infecção por *Trypanosoma* spp. das diversas espécies de morcegos do Estado do Acre. Além disso, a doença de Chagas é atualmente uma ameaça à saúde na região amazônica e no estado do Acre, onde os casos e surtos estão se tornando frequentes.

Vale ressaltar que a infecção encontrada nos morcegos no PZ e SC foi determinada por hemocultivo positivo e destes, 12 (14,8%), apresentaram-se também positivos no exame a fresco. Isso significa que são animais com alta competência infectiva, provavelmente sendo capazes de infectar triatomíneos que neles venham a se alimentar. Outros três morcegos foram positivos no exame a fresco, no entanto os parasitos não se desenvolveram nos meios de cultura no qual foram semeados e os hemocultivos permaneceram negativos durante todo o tempo de acompanhamento, ou seja, tratava-se de espécie ou espécies não cultiváveis em meio axênico. Isso mostra que a diversidade de espécies do gênero *Trypanosoma* na área, mesmo após o presente estudo, ainda está sendo subestimada.

Considerando-se que hemocultivo é um teste pouco sensível, limitado pela presença de parasitas circulando no sangue periférico, dados mostram uma alta taxa de infecção (22%) por *Trypanosoma* spp. na fauna de quirópteros das duas áreas estudadas e que foi significativamente mais alta em Xapuri (16,3%) do que em Rio Branco (5,7%). Isto reflete apenas os morcegos que apresentavam alta carga parasitária no sangue no momento da coleta. Certamente a taxa de infecção nestes animais é bem maior. As taxas mais altas de hemocultivos positivos foram observadas em morcegos capturados nos dois períodos de chuva nos anos de 2014 e 2015. Este é um achado que demandaria um tempo maior de acompanhamento uma vez que variações anuais além de outros fatores abióticos poderiam explicar o fenômeno.

Existem várias características ecológicas de quiroptera que podem favorecer seu encontro com o inseto vetor; e conseqüentemente, a infecção por espécies de *Trypanosoma*. Obviamente, essas distintas peculiaridades ecológicas dos morcegos modulam a transmissão de seus parasitas. Como estes padrões são distintos e variam nas espécies de morcegos, as possibilidades de transmissão do parasita também serão distintas dependendo da espécie de parasita e da ecologia das espécies de morcegos hospedeiros. Os morcegos usam vários tipos de lugares de descanso e sua fidelidade aos refúgios é um fator que favorece o estabelecimento e manutenção de colônias de triatomíneos. A associação de *Cavernicola pilosa* com morcegos que utilizam cavernas é um bom exemplo de transmissão de *T. cruzi* e *T.*

c. marinkellei. Na verdade, o conhecimento de como o comportamento animal pode alterar e modular a ecologia dos parasitas ainda está em seu começo.

Phyllostomidae constitui um grupo diverso que incluem morcegos de hábitos alimentares generalistas como *Phyllostomus* spp., bem como de hábitos alimentares essencialmente especializados como a espécie de morcego hematófago *Desmodus rotundus*, de frugívoros *Carollia perspicillata* e *Artibeus jamaicensis* e de néctarívoros *Glossophaga soricina*. Além disso, insetos são parte da dieta em maior ou menor grau para a maioria dos morcegos (Carrillo-Araujo et al., 2015). *Phyllostomus* spp. estava mais presente no SC do que em PZ. É interessante notar que a infecção por *Trypanosoma* spp. neste gênero de morcegos foi observada apenas no SC e que apresentou alta taxa de infecção (75%) por *T. cruzi* e *T. c. marinkellei*, que foram encontrados em infecções únicas e mistas. Vetores de ambas as espécies de *Trypanosoma* são *C. pilosa*, mas as espécies de *Rhodnius* podem atuar como vetor porque já foram usados com sucesso no xenodiagnóstico de morcegos (Marinkelle, 1976; Garcia et al., 2012).

Em relação à taxa de infecção por *Trypanosoma* spp., o local com as taxas mais altas de infecção de morcegos foi no SC e entre os três gêneros mais capturados, *Phyllostomus* foi quem apresentou maior taxa de infectados por indivíduos. Na espécie *Phyllostomus discolor*, por exemplo, dos cinco indivíduos capturados, quatro apresentaram infecção por alguma espécie de *Trypanosoma*. Essa maior taxa de infecção no Seringal Cachoeira é justificada pela área ter grande diversidade biológica, o que provavelmente se reflete também na diversidade de espécies do gênero *Trypanosoma* que circulam naquela região.

Assim como os outros gêneros da família Phyllostomidae, espécimes de *Carollia* spp., também apresentaram altas taxas de infecção por *Trypanosoma* spp. e são considerados morcegos resilientes em termos de sua dieta (eles se alimentam de frutas e insetos) e locais que albergam, embora também tenham sido descritos como especialistas em sub-bosque (Bernard, 2001). Eles vivem em colônias que podem incluir centenas de indivíduos e que pode ser fixar em árvores ocas, folhagem densa, cavernas e túneis. Estes animais forragiam principalmente durante a noite e é provável que adquiram infecção por *Trypanosoma* spp. em seus locais de repouso por ingestão de triatomíneos ou pela via contaminativa, porque vários de seus lugares de repouso são habitats clássicos de triatomíneos. Este eclecticismo alimentar e de hábito em *Carollia* spp. provavelmente explica a observação de que esse táxon não só apresentou as maiores taxas de infecção por *T. cruzi*, como

demonstrado por hemoculturas positivas, mas também demonstrou grande diversidade de espécies de *Trypanosoma* que incluíram *T. rangeli*, *T. dionisii* e pelo menos uma espécie de *Trypanosoma* ainda não descrita. Importante salientar que não sabemos se todos os tripanossomatídeos que não puderam ser diagnosticados no nível de espécie constituem apenas uma única espécie ou incluem mais de uma espécie.

A diversidade de espécies de *Trypanosoma* que foram encontrados infectando morcegos do estado de Acre foi surpreendente, certamente por oferecerem condições climáticas e ecológicas favoráveis com a grande diversidade de fauna, com abundante variedade de vertebrados silvestres, que constituem os elementos fundamentais para a manutenção desses parasitos no meio ambiente. Esta afirmação é válida para *T. cruzi*, que é um parasito multi-hospedeiro, mas parece ser importante também para *T. dionisii* e *T. marinkellei*. Estudos adicionais podem revelar novos aspectos da ecologia e filogenia de *Trypanosoma*.

Os gêneros de morcegos *Carollia*, *Artibeus* e *Phyllostomus* foram os que também apresentaram altas taxas de infecção por uma grande diversidade de espécies de *Trypanosoma*. Em relação às DTUs de *T. cruzi*, caracterizamos as DTUs de 45 isolados de *T. cruzi* que mostraram perfil DTU TcI (n=45) e DTU TcIV (n=3), exatamente as DTUs relacionados aos surtos de doença de Chagas em outras áreas da Amazônia. Aqui também vale mencionar que o nosso é o primeiro encontro de DTU TcIV em morcegos. Foram encontrados também dois casos de infecção mista de *T. cruzi* DTU TcI + *T. sp.* e *T. cruzi* DTU TcIV + *T. c. marinkellei* no Seringal Cachoeira. Nos morcegos infectados, verificou-se que *T. cruzi* DTU TcI infectou todos os gêneros, exceto dois. Este foi um resultado esperado porque DTU TcI é altamente dispersa no ciclo de transmissão de *T. cruzi* na natureza. *Lophostoma* sp. e *Sturnira* sp., dois gêneros de morcegos que não foram infectados por *T. cruzi*, estavam infectados por *T. c. marinkellei* e *T. dionisii*, respectivamente. O número de indivíduos destes dois gêneros foi muito baixo, com apenas três e dois, respectivamente, e foram coletados apenas no SC - a área de floresta primária. *T. dionisii* foi encontrado infectando cinco indivíduos de três gêneros distintos de morcegos, mas apenas no SC. Este achado é intrigante uma vez que esta espécie de *Trypanosoma* é bastante generalista, já tendo sido encontrada infectando 12 espécies de quatro famílias de morcegos em todos os biomas brasileiros (Cavazzana Jr et al., 2010). Assim como *Sturnira* sp., *Lophostoma silvicolum* é considerada uma espécie de morcego abundante. Esta espécie tem um habitat

único porque é capaz de modificar e se alojar em cavidades de ninhos ativos de cupim (Dechman et al., 2004).

Após a clássica descrição de Marinkelle da infecção por *T. rangeli* em morcegos (Marinkelle, 1976), há apenas alguns relatos de infecção por este táxon em quiropteros. *T. rangeli* infectando morcegos *Artibeus planirostris* e *Platyrrhinus lineatus* foi descrito por Maia da Silva et al. (2009) na região central do Brasil. Além disso, os autores observaram uma nova linhagem de *T. rangeli* em *P. lineatus* que foi denominada linhagem E. Aqui, expandimos a área de ocorrência da linhagem A de *T. rangeli* em morcegos para a região norte do Brasil, ou seja, o bioma amazônico. Esta linhagem é amplamente distribuída e infecta muitas espécies hospedeiras de mamíferos; portanto, seria esperado encontrar-se em morcegos de outros biomas. É interessante notar que os dois isolados de *T. rangeli* foram obtidos de dois morcegos (*C. perspicillata* e *A. planirostris*) da área mais preservada (SC), onde a diversidade de morcegos e tripanossomas foi maior. A análise de sequência agrupou ainda um isolado de *C. perspicillata* (LBT 7063) entre *T. wauwau* e *Trypanosoma* sp. RMNO, descrito em morcegos *Pteronotus* sp. e *Tracops cirrhosus* no norte do Brasil (Lima et al., 2015). Este resultado demonstra que outra espécie de *Trypanosoma* está circulando em morcegos neotropicais de Acre, reforçando o pouco conhecimento sobre a diversidade de tripanossomas que circulam entre os morcegos. Mesmo se tratando de uma floresta urbana aparentemente bem preservada, a área do PZ já mostra uma perda da diversidade de morcegos e de *Trypanosoma* spp., como demonstrado pelo menor número de espécies de morcegos capturadas e menor diversidade de espécies de *Trypanosoma*.

Observamos um número incomum de isolados de *Trypanosoma* (n = 11) que não conseguimos identificar no nível da espécie. Estes isolados não identificados de *Trypanosoma* spp. cresceram ao longo de alguns dias no meio de cultura axênico e depois morreram. Em três desses isolados, a caracterização foi realizada utilizando-se sedimentos de cultura, embora houvesse apenas pequenas quantidades de DNA, dificultando assim a identificação de espécies parasitas. Os tripanossomas que não cresceram em meios de cultura ou que tiveram um crescimento inicial e depois morreram dão uma pista sobre o quanto ainda falta saber sobre a diversidade de tripanossomas de morcegos. De fato, ainda há muito a descobrir sobre o conjunto de espécies de *Trypanosoma* existentes, sua biologia e ecologia.

Estudos revelam que infecções mistas por tripanossomas são bem comuns na ordem Chiroptera, sendo que já foram identificadas infecções em morcegos por

tripanosomas da Seção Stercoraria (subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* e *Megatrypanum*) e Salivaria (*Trypanozoon*) (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976). No entanto, as mais comuns são causadas por espécies de tripanosomas dos subgêneros *Herpetosoma* e *Schizotrypanum*, e os quirópteros insetívoros são os mais infectados (Molyneaux, 1991). Nos nossos resultados, os genótipos mais distribuídos e prevalentes foram (em ordem crescente) *T. cruzi* TcI, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. cruzi* TcIV e *T. rangeli*.

Um fenômeno que já está na hora de ser reavaliado é a relatada especificidade de hospedeiro em tripanosomatídeos. Constatou-se cada vez mais que numerosos genótipos e espécies de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) são muito mais ecléticos em relação aos seus hospedeiros do que anteriormente reportado. Esse é o caso do Tcbat, um genótipo de *T. cruzi* que foi inicialmente associado exclusivamente com morcegos, mas que posteriormente foi observado sendo capaz de infectar humanos (Ramírez et al., 2014), e para *T. dionisii*, uma espécie do subgênero *Schizotrypanum* que é geralmente associada com morcegos e foi detectada no tecido cardíaco de uma criança que morreu de doença de Chagas Dario et al. (2016). Neste trabalho, Dario et al. (2016) observaram ocorrência de quatro DTUs de *T. cruzi* (TcI, TcII, TcIII e TcIV) no tecido cardíaco desta criança que morreu de miocardite na fase aguda da doença de Chagas (infecção por via oral), sendo a primeira vez que foi observado tal diversidade de DTUs em um caso humano. Além disso, também detectaram *T. dionisii*, uma espécie de *Trypanosoma* que só havia sido descrita em morcegos e neste trabalho foi detectado por análises moleculares/filogenéticas. Além dos parasitas de interesse médico ou veterinário, os tripanosomas são um modelo fascinante da interação parasita-hospedeiro que constantemente nos desafia e nos surpreende.

Mesmo após este estudo, a diversidade de tripanosomas de morcegos continua pouco conhecida na Amazônia, um bioma reconhecido por sua amplitude de mata contínua e alta biodiversidade. Do ponto de vista de saúde pública, sabe-se que morcegos podem atuar como reservatórios de *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas que se configura como uma zoonose emergente na Amazônia. Do ponto de vista acadêmico, o estudo de tripanosomas de morcegos vai certamente contribuir muito para o entendimento da origem e evolução dos integrantes do clado *T. cruzi*, um assunto bastante controverso.

4 CONCLUSÕES

O nível de preservação determinou a riqueza de espécies de morcegos e de *Trypanosoma* spp., como demonstrado pela maior diversidade encontrada no SC, mas não no sucesso de captura, que foi o mesmo para ambos os municípios;

A diferença no grau de preservação dos fragmentos determinou a composição da fauna de quirópteros;

Artibeus spp. e *Carollia* spp. foram as espécies mais dispersas, visto que predominaram em ambas as áreas estudadas;

As áreas intermediárias de preservação em ambas as localidades, foram as que apresentaram os maiores sucessos de captura e taxas de infecção por *Trypanosoma* spp.;

A elevada diversidade de tripanosomatídeos em morcegos foi demonstrada pela detecção de ao menos 6 espécies diferentes e/ou DTUs de *T. cruzi* (incluindo duas infecções mistas) infectando morcegos do Acre;

T. cruzi TcI foi a DTU mais prevalente em todas as áreas e no maior número de espécies de morcegos;

Os morcegos estão envolvidos na manutenção das DTUs de *T. cruzi* TcI e TcIV, as mesmas associadas aos casos de doenças de Chagas na Amazônia;

As espécies *T. c. marinkellei*, *T. rangeli* e *T. dionisii* estão mais relacionadas a ambientes mais preservados no Acre, visto que foram detectados quase que exclusivamente no SC;

Trypanosoma cruzi e *T. c. marinkellei* foram as espécies de *Trypanosoma* mais frequentes nos morcegos examinados;

A diversidade de *Trypanosoma* spp. circulando em morcegos é ainda maior que a descrita aqui visto que um dos isolados obtidos agrupou-se no mesmo ramo que os tripanossomas descritos em morcegos neotropicais e provavelmente trata-se de uma nova espécie deste gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abub, EA, Lani, JL, Araújo, EA, Amaral, EF Bardales, NG, Fernandes Filho, EI. Caracterização morfométrica das sub-bacias no município de Xapuri: subsídios à gestão territorial na Amazônia Ocidental. Rev. Ambient. Água vol. 10 n. 2 Taubaté – Apr. / Jun. 2015

Abud, EA. Pedoambientes e aspectos hidrológicos como base para gestão territorial do município de Xapuri, Acre. Viçosa-MG, Universidade Federal de Viçosa, 2010. 177p. (Dissertação de Mestrado).

Acre. Governo do Estado do Acre. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre. Zoneamento Ecológico-Econômico do Acre Fase II: documento Síntese-escala 1: 250.000. Rio Branco: SEMA, 2006. 356p

Aguiar, LMS, Marinho-Filho, J. 2004. Activity patterns of nine phyllostomid bat species in a fragment of Atlantic Forest in southeastern Brazil. Revista Brasileira de Zoologia, 21: 385–390.

Araújo, A, Jansen, AM, Reinhard, K, Ferreira, LF. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 9–16, 2009. Fundação Oswaldo Cruz.

Ávila-Flores, R, Fenton, BM. 2005. Use of spatial features by foraging insectivorous bats in a large urban landscape. J. Mammal. 86:1193–1204.

Ayuso-Oliva, AM. 2005. Uso del hábitat en quirópteros en un área alterada por la construcción por la línea de tren de alta velocidad en el sur de la península Ibérica. Implicaciones para su conservación y estudio de los registros sonoros del género *Pipistrellus*. Tesis, doctorado Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 251 p.

Barbosa, AD, Mackie, JT, Stenner, R, Gillett, A, Irwin, P, Ryan, U. (2016). *Trypanosoma teixeirae*: A new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomiasis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). *Veterinary parasitology* 223, 214-221. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.002.

Bernard, E, Tavares, VC, Sampaio, E. 2011. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotropica*, 11: 35-46.

Bernard, E. 2001. Vertical stratification of bat communities in primary forest of Central Amazon, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 17: 115-126.

Bernard, E. 2002. Diet, activity and reproduction of bats species (Mammalia, Chiroptera) in Central Amazonia, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19 (1): 173-188.

Bishop, KL, 2008. The evolution of flight in bats: narrowing the field of plausible hypotheses. *Q. Rev. Biol.* 83: 153 – 169.

Bisson, IA, Safi K, Holland RA (2009) Evidence for repeated independent evolution of migration in the largest family of bats. *PLoS One* 4(10):e7504.

Bobrowiec, PED, Gribel R. Effects of different secondary vegetation types on bat community composition in Central Amazonia, Brazil. *Animal Conservation*. 13: 204- 216. 2010.

Bordes, F, Morand, S. Helminth species diversity of mammals: parasite species richness is a host species attribute. *Parasitology*, v. 135, p. 1701–1705, 2008.

Bordignon, MO. 2005. Predação de morcegos por *Chrotopterus auritus* (Peters) (Mammalia, Chiroptera) no pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 22 (4): 1207-1208.

Borghesan, TC, Ferreira, RC, Takata, CS, Campaner, M, Borda, CC, Paiva, F, et al. (2013). Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae) a genus of insect parasites associated with flies. *Protist* 164, 129-52. doi: 10.1016/j.protis.2012.06.001.

Boyles, JG, Cryan, PM, Mccracken, GF, Kunz, TH. 2011. Economic Importance of bats in agriculture. *Science* 332:41-42.

Bredt, A, Silva, DM. 1998. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.

Bredt, A, Uieda, W. 1996. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. *Chiropt. Neotrop.* 2:54-57.

Bredt, A, Uieda, W, Pedro, WA. Plantas e morcegos: na recuperação de áreas degradadas e na paisagem urbana. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2012.

Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual review of microbiology*, v. 27, p. 347–82, 1973. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.

Brosset, A, Charles-Dominique, P, Cockle, A, Cosson, JF, Masson, D. 1996. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Canadian Journal of Zoology*, 74: 1974-1982.

Burland, TG: DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software Bioinformatics Methods and Protocols, Volume 132 of the series Methods in Molecular Biology™ 2000. pp 71-91.

Calouro, AM, Santos, FGA, Faustino, CL, Souza, SF, Lague, BM, Marciente, R, et al. 2010. Riqueza e abundância de morcegos capturados na borda e no interior de um fragmento florestal do estado do Acre, Brasil. *Biotemas* 23:109-117.

Camargo, EP. Phytomonas and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasit.* 1998; 42:29-112.

Carrillo-Araujo, M, Taş, N, Alcántara-Hernández, RJ, Gaona, O, Schondube, J. E., Medellín, RA, et al. (2015). Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in microbiology*, 6.

Castro-Luna, AA, J. Galindo-González. 2011. Enriching agroecosystems with fruitproducing tree species favors the abundance and richness of frugivorous and nectarivorous bats in Veracruz, Mexico. *Mammalian Biology* 77(1):32-40.

Cavalier-Smith. 1993. T Kingdom protoza and its 18 phyla. *Microbiology Reviews*, 57(4): 953-994

Cavazzana, Jr M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int J Parasitol.* 2010;40:345–55.

Censo Populacional 2017, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (01 de julho de 2017). Visitado em 20 de outubro de 2017.

Cevallos, AM, Hernández, R. Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. *BioMed research international*, v. 2014, p. 401864, 2014.

Christe, P, Giorgi, MS, Vogel, P, Arlettaz, R. Differential species-specific ectoparasitic mite intensities in two intimately coexisting sibling bat species: resource-mediated host attractiveness or parasite specialization? *Journal of Animal Ecology*, v. 72, n. 5, p. 866-872, 2003.

Clarke, FM, Pio DV, Racey PA. 2005. A comparison of logging systems and bat diversity in the Neotropics. *Conservation Biology*. 19: 1194–1204.

Cleveland, CJ, Betke, M, Federico, P, Frank, JD, Hallan, T.G, Horn, J. et al. 2006. Economic value of the pest control service provided by brasilian free-tailed bats in South-central Texas. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4: 238-243.

Cottontail, VK, Kalko, EKV, Cottontail, I, Wellinghausen, N, Tschapka, M., Perkins, SL, et al. 2014. High Local Diversity of *Trypanosoma cruzi* in a Common Bat

Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the *T. cruzi* clade. *Plos One*, September (9): 1-6.

Coura, JR, Albajar-Viñas, P, Junqueira, ACV. (2014). Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 856–862. doi: 10.1590/0074-0276140236.

Coura, JR, Viñas, PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, p. 6–7, 2010.

Coura, JR, Junqueira, ACV, Fernandes, O, Valente, SAS, Miles, MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology*. 18 (4): 171-176, 2002.

Coura, JR, Junqueira, ACV. (2015). Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon Basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. *Acta tropica* 151, 51-57. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.04.029.

Dario, MA, Rodrigues, MS, da Silva Barros, JH, das Chagas Xavier, SC, D'Andrea, PS, Roque, ALR, et al (2016). Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites & vectors*, 9(1), 477.

da Costa, AP, Nunes, PH, Leite, BHS, Ferreira, JIGDS., Tonhosolo, R, da Rosa, AR, et al. (2016). Diversity of bats trypanosomes in hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. *Acta tropica* 164, 185-193. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.08.033.

da Rocha, PA, Feijó, JA, Mikalauskas, JS, Ferrari, SF. First records of mormoopid bats (Chiroptera, Mormoopidae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Mammalia*. 2011;75:295–9.

Datzmann, T, Von Helversen, O, Mayer, F. 2010. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). *BMC Evolutionary Biology* 10: 165.

Deane, MP, Mangia, R, Pereira, NM, Momen, H, Goncalves, AM, Morel, CM. (1984). *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(4), 495-497.

Dechmann, DKN, Kalko, EKV, Kerth, G. (2004). Ecology of an exceptional roost: energetic benefits could explain why the bat *Lophostoma silvicolum* roosts in active termite nests. *Evolutionary Ecology Research*, 6, 1037–1050.

de Carvalho-Ricardo, MC, Uieda, W, Fonseca, RCB, Rossi, MN. (2014). Frugivory and the effects of ingestion by bats on the seed germination of three pioneering plants. *Acta Oecologica*, 55, 51-57.

De Souza, W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International review of cytology*, 86, 197-283.

de Thoisy, B, Bourhy, H, Delaval, M, Pontier, D, Dacheux, L, Darcissac, E, et al. 2016. Bioecological Drivers of Rabies Virus Circulation in a Neotropical Bat Community. *PLoS Negl Trop Dis*. Jan 25;10(1):e0004378. doi: 10.1371/journal.pntd.0004378.

Dias D, Peracchi, AL, Silva, SSP. 2002. Quirópteros do Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia*, 19 (supl. 2): 113 - 140.

Díaz, MM, Aguirre, LF, Barquez, RM. 2011. Clave de identificación de los murciélagos del cono sur de Sudamérica. Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada, Cochabamba, Bolivia.

Duarte, AFA. Aspectos da climatologia do Acre, Brasil, com base no intervalo 1971-2000. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v. 21, n. 3b, 308-317, 2006.

Duchamp, JE, Swihart, RK (2008) Shifts in bat community structure related to evolved traits and features of human altered landscapes. *Landscape Ecol* 23:849–860

Dweyr, PD. Latitude and breeding season in a polyestrus species of *Myotis*. *Journal of Mammalogy*, v. 51, n. 2, p. 405-410. 1970.

Eisenberg, JF, Redford, KH. 1999. *The Mammals of Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. Chicago, The University of Chicago Press, 609p.

Emmons, LH, Feer, F. 1997. *Neotropical Rainforest Mammals: A field guide*. 2 ed. Chicago, The University of Chicago Press. 307p.

Erkert, HG. 1982. Ecological aspects of bat activity rhythms. In *The ecology of bats*, T. H. Kunz (ed.) Plenum, New York. p. 201-242.

Esbérard, CEL, Luz, JL, Costa, LM, Bergallo, HG. 2014. Bats (Mammalia, Chiroptera) of an urban park in the metropolitan area of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, 104 (1): 59 – 69.

Estrada, A, Coates-Estrada, R, Meritt, Jr D. 1993. Bat species richness and abundance in tropical rain forest fragments and in agricultural habitats at Los Tuxtlas, Mexico. *Ecography* 16: 309 - 318.

Estrada, A, Jiménez, C, Rivera, A, Fuentes, E. 2004. General bat activity measured with and ultrasound detector in a fragmented tropical landscape in Los Tuxtlas, Mexico. *Animal Biodiversity and Conservation* 27 (2): 1 – 9.

Estrada, A, R. Coates-Estrada, e D. Merrit Jr. 1993. Bat species richness and abundance in tropical rain forest fragments and in agricultural habitats at Los Tuxtlas, Mexico. *Ecography* 16:309-318.

Fabián, MH, Rui, AM, Waechter, JL. 2008. Plantas utilizadas como alimento por morcegos (Chiroptera, Phyllostomidae), no Brasil. *In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L. & Santos, G.A.S. (Eds.). Ecologia de Morcegos*. Londrina, Technical Books. p. 51-70.

Faria, D. 2006. Phyllostomid bats of a fragmented landscape in the north-eastern Atlantic forest, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 22: 531-542.

Faria, D, Baumgarten J. 2007. Shade cacao plantations (*Theobroma cacao*) and bat conservation in southern Bahia, Brazil. *Biodiversity and Conservation* 16:291-312.

Fenton, MB, Acharya, LD, Audet, D, Hickey, MBC, Merriman, MK, Obrist, et al. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the neotropics. *Biotropica* 24:440–446.

Fenton, MB, Simmons, NB. 2015. *Bats, a world of science and mystery*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 303 pp.

Fleming, TH, Heithaus, ER. 1981. Frugivorous bats, seed shadows, and the structure of tropical forests. *Biotropica* 13:45–53.

Fleming, TH. 1988. *The short-tailed fruit bat, a study in plant-animal interactions*. London, University of Chicago Press.

Franzén, O, Talavera-López, C, Ochaya, S, Butler, CE, Messenger, LA, Lewis, MD, et al (2012). Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC genomics*, 13(1), 531.

Garcia, L, Ortiz, S, Osorio, G, Torrico, MC, Torrico, Fe Solari, A. (2012). Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome B sequence and minicircle analyses. *PLoS One* 7, e36578. doi: 10.1371/journal.pone.0036578.

Gardner, AL. (1979). Feeding habits. In *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae. Part II*, (ed. Baker, R. J., Jones, J., Knox, J. and Carter, D. C.), pp. 293-350. The Museum Texas Tech University, Lubbock, USA.

Gardner, AL. 2007. Order Chiroptera. In: Gardner, Alfred L., Mammals of South America: Volume 1 Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. Chicago: University of Chicago Press, pp.187-188.

Gardner, AL. 1977. Feeding Habits, p. 293-350. *In*: R.J. BAKER; J. K. Jones & D.C.Carter (Eds) Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae. Part II. Special Publications Museum Texas Tech University, Lubbock, 13: 1-364p.

Gaunt, MW, Yeo, M, Frame, IA, Stothard, JR, Carrasco, HJ, Taylor, MC, Mena, SS, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, London, v. 421, n. 6926, p. 936-939, Feb. 2003.

Giannini, NP, Kalko, EKV. 2004. Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos* 105:209–220. 2004. Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos* 105:209–220.

Gobbe, PRS, Barrela, W. 2000. Estrutura de uma taxocenose de morcegos na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. *PUC-SP, Ciências Biológicas e do Ambiente*, 2: 207-224.

Goodwin, GG, Greenhall, AM. A review of the bats of Trinidad and Tobago. Descriptions, rabies infection and ecology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 122:187–302. 1961.

Gregorin, Re, Taddei, V.A. 2002. Chave artificial para a identificação de Molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). *Mastozoología Neotropical* 9:13-32.

Gurgel-Gonçalves, R, Galvão C, Costa J, Peterson AT. 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med; ID 705326*: 1-15.

Guyatt, KJ, Twin, J, Davis, P, Holmes, EC, Smith, GA, Smith, IL, et al. 2003. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. *Journal of General Virology*, 84: 485-496.

Halpin, K, Young, PL, Field, HE, Mackenzie, JS. 2000. Isolation of Hedra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra Virus. *Journal of General Virology*, 81: 1927-1932.

Hamilton, PB, Cruickshank, C, Stevens, JR, Teixeira, MMG, Mathews, F. Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. *Mol Phylogenet Evol.* 2012;63:521–6.

Hamilton, PB, Gibson, WC, Stevens, JR. 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44 (1): 15-25.

- Hamilton, PB, Texeira, MMG, Stevens, JR. 2012. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends in Parasitology*, 28: 136-141.
- Hamilton, WJ, Watt, KEF. Refuging. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1:263-286. 1970.
- Handley, CO. Jr. 1976. Mammals of the Smithsonian Venezuelan Project. Provo, Utah: Brigham Young University Science bulletin. Biological series, v. 20, no. 5.
- Henao-Martínez, AF, Parra-Henao, G, Fernandes, MC. Murine heart gene expression during acute Chagasic myocarditis. *Genomics Data*, v. 4, n. 5, p. 76–77, 2015. Elsevier B.V.
- Hoare, CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Protozool*. 1964;11(2):200-7.
- Hoare, CA. 1972. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Part 2 Systematic. Oxford: Blackwell Scientific Publications. P.123-625
- Hodo, CL, Goodwin, CC, Mayes, BC, Mariscal, JA, Waldrup, KA, Hamer, SA. (2016). Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. *Acta Tropica*, 164, 259-266.
- Hoorn, C, Wesselingh, FP, Ter Steege, H, Bermudez, MA, Mora, A, Sevink, J, et al. (2010). Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927-931. doi: 10.1126/science.1194585.
- Hourigan, CL, Johnson, C, Robson, SKA. 2006 The structure of a microbat community in relation to gradients of environmental variation in a tropical urban area. *Urban Ecosyst*. 9:67-82. doi:10.1007/s11252-006-7902-4
- Jaberg, C Guisan A. 2001. Modelling the distribution of bats in relation to landscape structure in a temperate mountain environment. *Journal of Applied Ecology* 38:1169-1181.
- Jansen, AM, Xavier, SCC, Roque, ALR. 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica*, 151: 1-15.
- Johnson, JB, Gates, JE, Ford, WM. 2008. Distribution and activity of bats at local and landscape scales within a rural-urban gradient. *Urban Ecosyst*. 11:227-242. doi:10.1007/s11252-008-0055-x
- Jones, G, Teeling, EC. (2006). The evolution of echolocation in bats. *Trends in Ecology and Evolution*, 21: 149-156.

Jones Jr, JK, Carter, DC. Annotated check-list, with keys to subfamilies and genera. In: Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part I. Baker, RJ, Jones Jr JK, Carter, DC. (eds.) Special Publications of the Museum 10. Lubbock: Texas Tech University Press. 1976.

Johnson, JB, Gates, JE, Ford, WM. 2008. Distribution and activity of bats at local and landscape scales within a rural-urban gradient. *Urban Ecosyst.* 11:227-242. doi:10.1007/s11252-008-0055-x

Junqueira, A, Albajar, R, Coura, JR. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In COURA, JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Vol. 1, GuanabaraKoogan, Rio de Janeiro, p. 595-601, 2005.

Kalka, M, Kalko, EKV. 2006. Gleaning bats as underestimated predators of herbivorous insects: dietary composition of *Micronycteris microtis* (Phyllostomidae) in Panamá. *Journal of Tropical Ecology* 22:1–10.

Kalko, EKV, Handley Jr CO. 2001. Neotropical bats in the canopy: diversity, community structure, and implications for conservation. *Plant Ecology* 153:319–333.

KALKO, EKV. 1997. Tropical Biodiversity and Systematics. Bonn, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum König. 43p.

Kalko, EKV, Herre, EA, Handley Jr, CO. 1996. Relation of fig fruit characteristics to fruit-eating bats in the new and old world tropics. *Journal of Biogeography* 23:565-576.

Kalko, EKV, Condon, MA. 1998. Echolocation, olfaction and fruit display: how bats find fruit of flagelliferous cucurbits. *Functional Ecology*, 12:364-372.

Kneigt, LV, Silva, JA, Moreira, EC, Sales, GL. 2005. Morcegos capturados no município de Belo Horizonte, 1999-2003. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 57:576-583.

Koopman, KF. Order Chiroptera. In: Mammal species of the world, 2 ed. Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (eds). Washington, DC: The Smithsonian Institution Press. 1993.

Korine, C, Kalko EKV, Herre, EA. 2000. Fruit characteristics and factors affecting fruit removal in a Panamanian community of strangler figs. *Oecologia* 123:560-568.

Kumar, S, Stecher, G, Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Kunz, TH. 1982. Roosting ecology of bats. Pp. 1-55, in: Ecology of Bats (T.H. Kunz, ed.). Plenum Press, New York

Kunz, TH, Fenton MB. 2003. Bat Ecology. The University of Chicago Press, Chicago.

Kunz, TH, Thomas, DW, Richards, GC, Tidemann, CR, Pierson, ED, Racey, PA. 1996. Observational techniques for bats. In: Wilson, DE, Cole, FR, Nichols, JD, Rudran, RF, Foster, MS. (Eds). Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard methods for mammals. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, p.105-114.

Kurta, A, Teramino, JA. 1992. Bat community structure in an urban park. *Ecography* 15:257-261.

Law, B. S., e M. Lean. 1999. Common blossom bats (*Syconycteris australis*) as pollinators in fragmented Australian tropical rainforest. *Biological Conservation* 91(2-3): 201-212.

Leite, FHR, Nogueira-Paranhos, JD, Lustosa, GS, Valois, RS. 2010. Filostomídeos do Parque Nacional da Serra das Confusões - Piauí -Brasil (Mammalia, Chiroptera). XXVIII Congresso Brasileiro de Zoologia.

Leonard, G, Soanes, DM, Stevens, JR. Resolving the question of trypanosome monophyly: A comparative genomics approach using whole genome data sets with low taxon sampling. *Infect Genet Evol.* 2011 in press

Leroy, EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Délicat A, Paweska JT, Gonzalez JP, Swanepoel R. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Dec 1; 438(7068):575-6.*

Lim, BK, Engstrom, MD. 2001. Species diversity of bats (Mammalia: Chiroptera) in Iwokrama Forest, Guyana, and the Guianan subregion: implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 10: 613-657.

Lima, IP. 2008. Espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera) registradas em parques nas áreas urbanas do Brasil e suas implicações no uso deste ambiente. In: Reis NR, Peracchi AL, Santos GASD (ed) *Ecologia de morcegos*. Londrina: Technnical books Editora, pp 71-85.

Lima, L. 2011. Morphological, biological and genetic diversity, and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from Brazil and Mozambique (Africa). Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lima, L, Da Silva, FM, Neves, L, Attias, M, Takata, CS, Campaner, M, Teixeira, MM. (2012). Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma*

(*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and allied species. *Protist*, 163(6), 856-872.

Lima, L, Espinosa-Álvarez, O, Hamilton, PB, Neves, L, Takata, CS, Campaner, M, Teixeira, MM. (2013). *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasites & vectors*, 6(1), 1.

Lima, L, Espinosa-Alvarez, O, Pinto, CM, Cavazzana, M Jr., Pavan, AC, Carranza, JC. New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit Vectors*. 2015;8:657. doi: 10.1186/s13071-015-1255-x. pmid:26701154

Lima, L, Espinosa-Álvarez, O, Ortiz, PA, Trejo-Varón, JA, Carranza, JC, Pinto, CM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop*. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.015.

Lima, VS, Jansen, AM, Messenger, LA, Miles, MA, Llewellyn, MS. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. *Parasit Vectors*. 2014;7:263.

Lindenfors, P, Nunn, CL, Jones, KE, Cunningham, AA, Sechrest, W, Gittleman, JL. Parasite species richness in carnivores: effects of host body mass, latitude, geographical range and population density. *Global Ecology and Biogeography*, v. 16, p. 496–509, 2007.

Lobova, T.A., C.K. Geiselman, and S.A. Mori. 2009. *Seed Dispersal by Bats in the Neotropics*. New York Botanical Garden Press, New York.

Loeb, SC, Post, CJ, Hall, ST. 2009. Relationship between urbanization and bat community structure in national parks of the southeastern U.S. *Urban Ecosyst*. 12:197–214. doi:10.1007/s11252-008-0075-6

Lukes, J, Kuchta, R, Scholz, T, Pomajbíková, K. (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends Parasitol*. 30, 377–385 (2014).

Luis, AD, Hayman, DT, O’Shea, TJ, Cryan, PM, Gilbert, AT, Pulliam, JR, et al. (2013) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci* 280:20122753.

Luz, JL. 2012. *Influência de Plantações de Banana na Assembleia de Morcegos (Chiroptera) e na Dieta e Dispersão de Sementes*. Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

Mackie, JT, Stenner, R, Gillett, A, Barbosa, A, Ryan, U, Irwin, P. (2015). Trypanosomiasis in an Australian little red flying-fox (*Pteropus scapulatus*). *Vet. Pathol.*

Madeira, MF, Almeida, ABPF, Barros, JHS, Oliveira, TSF, Sousa, VRF, Alves, AS, et al. *Trypanosoma caninum*, a new parasite described in dogs in Brazil: aspects of natural infection. *J Parasitol.* 2014 100:231-234.

Madeira, MF, Sousa, MA, Barros, JHS, Figueiredo, FB, Fagundes, A, Schubach, A, et al. *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa:Kinetoplastida) isolated from intact skin of domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology* 2009, 136: 411-423

Maia da Silva, F, Marcili, A, Lima, L, Cavazzana Jr, M, Ortiz, PA, Campaner, M, et al. (2009). *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica* **109**, 199–207. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.11.005.

Marcili, A, Lima, L, Valente, VC, Valente, SA, Batista, JS, Junqueira, AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol.* 2009;9(6):1265-74.

Marcili, A, Lima, L, Cavazzana Jr, M, Junqueira, ACV, Veludo, HH, Maia da Silva, F, et al. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136, 641–655.

Marcili, A. 2008. *Trypanosoma cruzi*: Diversidade, relações filogenética e padrões ecogeográficos de isolados silvestres. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Marcon, JL, Menin, M, Araújo, MGP, Hrbek, T. Biodiversidade Amazônica: caracterização, ecologia e conservação. Edua, Manaus, 2012, p.372.

Marinkelle, CJ. 1976. The biology of the trypanosomes of bats. Pp. 175- 216. In: Lumdsen WHR, DA Evans. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, New York.

Martins, A. C., Bernard, E. & Gregorim, R. 2006. Inventários biológicos rápidos de morcegos (Mammals, Chiroptera) em três unidades de conservação do Amapá, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23: 1175-1184.

Martins-Melo, F. R.; Lima, M. DA S.; Ramos, A. N.; Alencar, C. H.; Heukelbach, J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital

transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Tropical medicine & international health* : TM & IH, v. 19, n. 8, p. 943–57, 2014.

Maslov, DA, Podlipaev, SA, Lukes, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. 2001 Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96:397-402.

Maslov, DA, Votypka, J, Yurchenko, V, Lukes, J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in parasitology*, 29(1), 43-52.

Maya, JD, Cassels, BK, Iturriaga-Vásquez, P. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, v. 146, n. 4, p. 601–20, 2007.

McInnes, LM, Gillett, A, Ryan, UM, Austen, A, Campbell, RSF, Hanger, J, et al. *Trypanosoma irwini* n. sp. (Sarcomastigophora: Trypanosomatidae) from de koala (*Phascolarctos cinereus*) *Parasitology* 2009, 136, 875–885.

McInnes, LM, Hanger, J, Simmons, G, Reid, SA Ryan, UM Novel trypanosome *Trypanosoma gilletti* sp. (Euglenozoa: Trypanosomatidae) and the extension of the host range of *Trypanosoma copemani* to include the koala (*Phascolarctos cinereus*) *Parasitology* 2011, 138, 59–70

Medellín, RA, Equihua, M., Amin M. A. 2000. Bat diversity as indicators of disturbance in Neotropical rainforests. *Conservation Biology* 14:1666-1675.

Mello, MAR, Schittini, GM, Selig, P, Bergallo, HG. 2004. A test of the effects of climate and fruiting of *Piper* species (Piperaceae) on reproductive patterns of the bat *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae). *Acta Chiropterologica*, 6 (2): 309 - 318.

Mello, MAR. Interações entre o morcego *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) e plantas do gênero *Piper* (Piperaceae). *Biota Neotropica*, v. 3, n. 1, 2003.

Mello, MAR, Kalko, EK, Silva, WR. Diet and Abundance of the Bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian Montane Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy*, v. 89, n. 2, p. 485-492, 2008.

Menachery, VD, Yount, BL, Debbink, K, Agnihothram, S, Gralinski, LE, Plante, JA, et al. 2015 A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine*; doi: 10.1038/nm.3985

Meneses-Filho, LCL, Ferraz, PA, Pinha, JFM, Ferreira, LA, Brilhante, NA. 1995. Comportamento de 24 espécies arbóreas tropicais madeireiras introduzidas no Parque Zoológico de Rio Branco-Acre. v 1. Edufac, Rio Branco, Brasil, 135pp.

Menezes, Jr LF, Duarte, AC, Novaes, RLM, Façanha, AC, Peracchi, AL, Costa LM, et al. 2008. Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilha e continente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Biota Neotropica*, 8 (2): 243 – 245.

Merzlyak, E, Yurchenko, V, Kolesnikov, A, Alexandrov, K, Podlipaev, S, Maslov, D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48(2):161-9.

Mesquita, RC, Duarte, AF. Diferenças na climatologia das chuvas entre as regiões leste e oeste do estado do Acre. In: CONGRESSO DE ESTUDANTES E BOLSISTAS DO EXPERIMENTO LBA, 2. 2005. Anais... Manaus, 2005.

Miles, MA, Feliciangeli, MD, de Arias, AR. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*, London, v. 326, n. 7404, p. 1444 1448, June 2003.

Ministério da Saúde. 1998. Morcegos em áreas Urbanas e Rurais: Manual de Manejo e Controle, Brasília. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_manejo_morcegos.pdf. 117p. Acesso em 09/08/2016.

Molyneux, DH. *Parasitic Protozoa*. 2nd ed. London: Academic Press; 1991. p. 195-223: Trypanosomes of bats.

Moratelli, R, Dias, D. A new species of nectar-feeding bat, genus *Lonchophylla*, from the Caatinga of Brazil (Chiroptera, Phyllostomidae). *ZooKeys*, n. 514, p. 73, 2015.

Moratelli, R, Dias, D, Bonvicino, CR. 2010. Estrutura e análise zoogeográfica de uma taxocenose de morcegos no norte do Estado do Amazonas, Brasil. *Chiroptera Neotropical*, 16: 661-671.

Moreno, CE, Halffter, G. Spatial and temporal analysis of a, b and g diversities of bats in a fragmented landscape. *Biodiversity and Conservation*. 10: 367382. 2001.

Neuweiler, G. *The biology of bats*. New York: Oxford University Press, 2000, 310p.

Nogueira, MR, Peracchi AL, Moratelli, R. 2007. Subfamília Phyllostominae; p. 61-97 In Reis NR, Peracchi, AL, Pedro, WA, Lima P. (ed.). Morcegos do Brasil. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina.

Nogueira, MR, Pol, A, Peracchi, AL. 1999. New records of bats from Brazil with a list of additional species for the chiropteran fauna of the state of Acre, western Amazon basin. *Mammalia*, 63 (3): 363-368.

Nogueira, MR, Lima, IP, Moratelli, R, Tavares, VC, Gregorin, R, Peracchi, AL. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List*, v. 10, p. 808-821. 2014.

Nogueira, PM, Ribeiro, K, Silveira, ACO. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 26. Nov. 2015.

Nowak, RM. 1994. *Walker's Bats of the World*. Johns Hopkins University Press, 287pp.

Noyes, HA, Stevens, JR, Teixeira, M, Phelan, J, Holz, P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol*. 1999; 29:331- 9.

Odum, EP, Barrett, GW. (2005). *Fundamentals of ecology*. 5th. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole.

Oliveira, RC, Guterres, A, Fernandes, J, D'Andrea, PS, Bonvicino, CR, Lemos, ERS. 2014. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses*, 6: 1929–73.

Oliveira, MT, Lana, M, Martins, HR. Genotipagem de amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos de dois municípios da região do Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, 2012.

Oprea, M, Vieira, TB, Pimenta, VT, Mendes, P, Brito, D, Ditchfield, AD, et al. 2006. Bat Predation by *Phyllostomus hastatus*. *Chiroptera Neotropical* 12(1).

Passos, FC, Silva, WR, Pedro, WA, Bonin, MR. 2003. Frugivoria em morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Parque Estadual Intervalles, sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 20(3): 511-517

Peracchi, AL, Lima, IP, Reis, NR, Nogueira, MR, Ortêncio-Filho, H. 2011. Ordem Chiroptera, pp. 155-234. In: Mamíferos do Brasil, 2ª Ed. Reis, N. R., Peracchi, A. L., Pedro, WA, Lima, IP. (Eds.). Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina. 439p.

Pereira, PCM, Navarro, EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, v. 19, n. 1, p. 34, 2013. CEVAP.

Perini, FA, Tavares, VC, Nascimento, CMD. 2003. Bats from the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, southeastern Brazil. *Chiropt. Neotrop.* 9:1-2.

Pires, AS, Fernandez, FAS, Barros, CS. 2006. Vivendo em um mundo em pedaços: efeitos da fragmentação florestal sobre comunidades e populações animais. Pp. 231-260, in: *Biologia da Conservação* (C.F.D. Rocha, H.G. Bergallo, M.V. Sluys and M.A.S. Alves, ds.). EDITORA: São Carlos.

Pirlot, P. Periodicite de la reproduction chez les chiropteres neotropicaux. *Mammalia*, v. 31, n. 3, p. 361-366. 1967.

Porcel, BM, Denoeud, F, Opperdoes, F, Noel, B, Madoui, MA, Hammarton, TC, et al. (2014). The streamlined genome of *Phytomonas* spp. relative to human pathogenic kinetoplastids reveals a parasite tailored for plants. *PLoS Genet*, 10(2), e1004007.

Poulin, R, Morand, S. The diversity of parasites. *The quarterly review of biology*, v. 75, n. 3, p. 277-293, 2000.

Presley, SJ, Willig, MR, Castro-Arellano, I, Weaver, SC. 2009. Effects of habitat conversion on temporal activity patterns of phyllostomid bats in lowland Amazonian rain forest. *Journal of Mammalogy* 90: 61–71.

Ramírez, JD, Hernández, C, Montilla, M, Zambrano, P, Flórez, AC, Parra, E. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014;61:477–9.

Rangel, DA. Tripanosomatídeos em morcegos de áreas florestais com diferentes níveis de antropização na Mata Atlântica do Rio de Janeiro. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro – RJ.

Rassi, A, Marin-Neto, JA. Chagas disease. *Lancet* (London, England), v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 2010.

Reeder, DM, Helgen, KM, Wilson, DE. 2007. Global trends and biases in new mammal species discoveries. *Occasional Papers. Museum of Texas Tech University* 269:1-36.

Reid, FA. *A Field Guide to the Mammals of Central American & Southeast Mexico*. Oxford. Oxford University Press. 1997.

- Reis, NR, Peracchi, AL, Pedro, WA, Lima, IP. 2011. Mamíferos do Brasil. 2ª Edição. Nélio R. dos Reis, Londrina.
- Reis, NR, Lima, IP, Peracchi, AL. 2002. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 19 (3): 739 - 746.
- Reis, NR, Peracchi, AL, Pedro, WA, Lima, IP. (Eds.). Mamíferos do Brasil. Londrina: 2006, 437p.
- Reis, N, Peracchi, A, Pedro, W., LIMA, I. Morcegos do Brasil. Londrina: 2007.
- Rojas, D, Vale, A, Ferrero, V, Navarro, L. (2011). When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. *Molecular Ecology* 20, 2217–2228. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05082.x.
- Roque, ALR, Jansen, AM. 2014b. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3: 251-262.
- Roque, ALR, Jansen, AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: Galvão, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014a, pp. 75-87.
- Root, RB. 1967. The niche exploitation pattern of the blue–gray gnatcatcher. *Ecological Monographs* 37(4):317-350.
- Rosas, GKC, Drumond, PM, Caracterização da caça de subsistência em dois seringais localizados no Estado do Acre. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2007. 31 p. il. (Embrapa Acre. Documentos, 109).
- Ruppert, EE, Fox, RS, Barnes, RD. 2005. Zoologia dos Invertebrados. Sétima edição. Editora Roca, São Paulo. 1145 p.
- Saldaña-Vázquez, RA, Sosa, VJ, Hernández-Montero, JR, López-Barrera, F. 2010. Abundance responses of frugivorous bats (Stenodermatinae) to coffee cultivation and selective logging practices in mountainous central Veracruz, Mexico. *Biodiversity and Conservation*. 19:2111-2124.
- Santos, FGA, Calouro, AM, Souza, SF, Lague, BM, Marciente, R, Faustino, C, et al. (2012) Ectoparasitismo em uma assembleia de morcegos em um fragmento florestal no Estado do Acre, Brasil. *Acta Vet Brasilica* 6(3):211–218
- Santos, M, Aguirre, LF, Vázquez, LB, Ortega, J. 2003. *Phyllostomus hastatus*. *Mammalian Species*, 722: 1-6.

Sarataphan, N, Vongpakorn, M, Nuansrichay, B, Autarkool, N, Keowkarn-kah, T, Rodtian, P. et al. 2007. Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi-like* infection in a sick infant from Thailand. J. Med. Microbiol. 56, 1118–1121.

Sazima, I, Fischer, WA, Sazima, M, Fischer, E. 1994. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. Ciênc. Cult. 46: 164–168.

Schnitzler, HU, Kalko, EKV. 1998. How echolocating bats search and find food. In: Kunz, TH, Racey, PA. eds. Bat Biology and Conservation. Washington, Smithsonian Institution Press. p. 183-196.

Schnitzler, HU, Kalko, EK. (2001). Echolocation by Insect-Eating Bats We define four distinct functional groups of bats and find differences in signal structure that correlate with the typical echolocation tasks faced by each group. *Bioscience*, 51(7), 557-569.

Schofield, CJ. *Trypanosoma cruzi* - The vector-parasite paradox. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95, p. 535-544, 2000.

Schofield, CJ, Jannin, J, Salvatella, R. The future of Chagas disease control. Trends in parasitology, v. 22, n. 12, p. 583–8, 2006.

Schulze, MD, Seavy, NE, Whitacre, DF. 2000. A comparison of the phyllostomid bat assemblages in undisturbed Neotropical forest and in forest fragments of a slash and burn farming mosaic in Petén, Guatemala. *Biotropica*, 32: 174-184.

Serra-Cobo, J, Amengual, B, Abellán, C, Bourhy, H. European Bat Lyssavirus Infection in Spanish Bat Populations. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 4, p. 413-420, 2002.

Silva, R, Perini, FA, Oliveira, WR. 2005. Bats from the city of Itabira, Minas Gerais, southeastern Brazil. *Chiropt. Neotrop.* 11:1-2.

Simmons, NB. Order Chiroptera. In: Wilson, DE, Reeder, DM. (Eds). *Mammals Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 3.ed. Johns Hopkins University Press, 2005, v.1, p.312-529.

Simmons, NB, Voss, RS. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna, part 1. Bats. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, n. 237, p. 1-219. 1998.

Simpson, AGB, Stevens, JR, Lukes, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006; 22(4):168-74.

Smith, A, Clark, P, Averis, S, Lymbery, AJ, Wayne, AF, Morris, KD, et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-

tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoridae) *Parasitology* 2008 135:1329–1335

Sodré, MM, Gama, AR, Almeida, M. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo*, v. 52, n.2, p. 75-81, 2010.

Stevens, JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite*. 2008;15(3):226-32

Stevens, JR, Teixeira, MMG, Bingle, LEH, Gibson, WC. (1999). The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *International Journal for Parasitology*, 29(5), 749-757.

Stoner, KE. (2000). Leaf Selection by the Tent-Making Bat *Artibeus watsoni* in *Asterogyne martiana* Palms in Southwestern Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology* 16, 151-157.

Svobodová, M, Zídková, L, Cepicka, I, Oborník, M, Lukes, J, Votýpka, J. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007;57(2):423-32.

Tavares, PCB. Expressão gênica de proteínas associadas ao reparo de membrana e dinâmica do citoesqueleto de actina em mioblastos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

Teixeira, MM, Borghesan, TC, Ferreira, RC, Santos, MA, Takata, CS, Campaner, M, et al. (2011) Phylogenetic Validation of the Genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids Harboring Bacterial Endosymbionts with the Description of New Species of Trypanosomatids and of Proteobacterial Symbionts. *Protist*. (In press)

Teixeira, ARL, Hecht, MM, Guimaro, MC, Sousa, AO, Nitz, N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.

Telleria, J, Lafay, B, Virreira, M, Barnabé, C, Tibayrenc, M, Svoboda, M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology*. v.114, n.4, p.279-288, 2006.

Tews, J, Brose, U, Grimm, V, Tielborger, K, Wichmann, MC, Schwager, M. et al. 2004. Animal species diversity driven by habitat heterogeneity/diversity: the importance of keystone structures. *Journal of Biogeography* 31:79-92.

Thies, W, Kalko, EKV, Schnitzler, H. 2006. Influence of environment and resource availability on activity patterns of *Carollia castanea* (Phyllostomidae) in Panama. *Journal of Mammalogy* 87:331-338.

Thomas, ME, Rasweiler, Iv JJ, D'Alessandro, A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):559-65.

Thompson, JD, Higgins, DG, Gibson, TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.

Tibayrenc, M, Neubauer, K, Barnabé, C, Guerrini, F, Skarecky, D, Ayala, F. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington*, v. 90, p. 1335-1339, Feb. 1993.

Tuttle, MD. Distribution and zoogeography of Peruvian bats, with comments on natural history. *University of Kansas Scientific Bulletin*, 49:45–86. 1970.

Tuttle, MD, Ryan, MJ. Bat predation and the evolution of frog vocalizations in the Neotropics. *Science*, 214: 677. 1981.

Vallejo, GA, Guhl, F, Chiari, E, Macedo, AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammal hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*. 1999; 72:203-12.

Velazco, S, Pacheco, V, Maschede, A. 2011. First occurrence of the rare emballonurid bat *Cyttarops alecto* (Thomas, 1913) in Peru — Only hard to find or truly rare? *Mammalian Biology* 76: 373-376.

Vickerman, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumdsen WHR, Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida*. New York: Academic Press; 1976. p. 1-34.

Von Zuben, CJ. Implicações da agregação espacial de parasitas. *Revista de Saúde Pública*, v. 31, n. 5, p. 523-530, 1997.

Voss, RS, Emmons, LH. 1996. Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. *Bulletin of American Museum of Natural History*, 230: 1-115.

Wallace, FG, Camargo, EP, McGhee, RB, Roitman, I. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. J Protozool. 1983;30:308-13.

Wallace, FG. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: (Lumsden WHR, Evans DA). Biology of the Kinetoplastida. Academic Press, New York; 1979:213-40.

Wallace, FG. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp Parasitol. 1966;18:124-93.

Wetterer, AL, Rockman, MV, Simmons, NB. 2000. Phylogeny of Phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. Bulletin of the American Museum of Natural History. n. 248. New York: p.1-200.

Wilkinson, GS, South, JM. 2002 Life history, ecology and longevity in bats. Aging Cell 1, 124 – 131. (doi:10.1046/j.1474-9728.2002.00020.x)

Wilkinson, GS, Carter, GG, Bohn, KM, Adams, DM. 2016 Non-kin cooperation in bats. Phil. Trans. R. Soc. B 371: 20150095. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0095>

Williams, SE, Marsh H, Winter J. Spatial Scale, Species Diversity, and Habitat Structure: Small Mammals in Australian Tropical Rain Forest. Ecology. 83(5): 1317-1329. 2002.

Willig, MR, Presley, SJ, Bloch, CP, Hice, CL, Yanoviak, SP, Mónica, M, et al. 2007. Phyllostomid Bats of Lowland Amazonia: Effects of Habitat Alteration on Abundance. Biotropica 39(6): 737-746.

World Health Organization (WHO), 2016. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 01/08/2016.

Zingales, B, Andrade, SG, Briones, MRS., Campbell, DA, Chiari, E, Fernandes, O. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 1051–1054.

Zingales, B, Miles, MA, Campbell, DA, Tibayrenc, M.; Macedo, AM, Teixeira, MMG. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological, relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution, v.12, p.240 - 253, 2012.

Zortéa, M, Chiarello, AG. 1994. Observations on the big fruit - eating bat, *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in eastern Brazilian. Mammalia 52 (4): 665 - 670.

Zortéa, M, Mendes, SL. 1993. Folivory in the big fruit eating bat, *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in eastern Brazil. Journal of Tropical Ecology, Cambridg, 9: 117-120.

5 APÊNDICES E/OU ANEXOS

Anexo 1:

Chave simplificada de identificação das Famílias de morcegos.

1. Presença de folha nasal (=apêndice nasal) em forma de lança ou apêndice em forma semi-circular (=ferradura) ao redor da narina
..... **Família Phyllostomidae**
- 1'. Ausência de folha nasal **2**
2. Presença de discos adesivos na base do pólex e do hálux
..... **Família Thyropteridae**
- 2'. Ausência de discos adesivos **3**
3. Cauda tão longa ou mais longa que a membrana interfemural (=uropatágio)
..... **4**
- 3'. Cauda mais curta que a membrana interfemural, podendo perfurá-la dorsalmente **6**
4. Cauda livre, aproximadamente metade do comprimento da cauda se dá além da borda distal da membrana interfemural (=uropatágio)
Família Molossidae
- 4'. Cauda toda ou quase toda contida ao longo da membrana interfemural **5**
5. Pólex reduzido (=diminuto), contido na membrana do propatágio e sem garra **Família Furipteridae**
- 5'. Pólex bem desenvolvido, livre da membrana do propatágio em sua porção distal e provido de garra..... **Família Vespertilionidae**
6. Lábio superior com marcada fenda vertical; plagiopatágio ligado à perna (=tíbia)..... **Família Noctilionidae**
- 6'. Lábio superior sem fenda vertical, um par de almofadas no lábio inferior formando um V; plagiopatágio ligado ao tornozelo, e cauda perfurando dorsalmente a membrana interfemural (=uropatágio) **Família Emballonuridae.**

Chave simplificada de identificação das espécies de morcegos da Família Phyllostomidae coletados.

1. Apêndice ao redor da narina em forma semi-circular (=ferradura), incisivos superiores mais amplos que os caninos, polegar bem desenvolvido.....**2**
- 1'. Folha nasal bem desenvolvida; cauda geralmente presente; se cauda ausente, rostro visivelmente estreito e alongado; folha nasal lanceolada (=triangular ou forma de lança), incisivos superiores menores que os caninos, polegar de tamanho normal.....**3**
2. Incisivos 1/2; polegar com três calosidades, pontadas das asas sem manchas brancas.....***Desmodus rotundus***
3. Nenhuma fenda mediana profunda no lábio inferior; lábio inferior com fenda vertical, ladeado por almofadas em forma de V ou U, essas fendas podem ou não ser margeadas por papilas; coroas dos molares formando um W; geralmente com orelhas, folha nasal, membrana interfemural e calcâneo bem desenvolvidos; língua não alongada;.....**4**
- 3'. Lábio inferior tem um único par de papilas lisas divididas por uma profunda fenda mediana; rostro geralmente alongado; orelhas curtas; estreitas e alongadas; língua alongada; molares e pré-molares reduzida; geralmente os pré-molares separados uns dos outros partir de canino.....**9**
4. Arco zigomático incompleto; cauda relativamente curta ou ausente, lábio inferior ladeado por uma ou mais linhas de papilas menores ou papilas lábias centrais ladeadas por uma única papila, molares inferiores não se assemelham ao pré-molar inferior ou assemelham-se pré-molares inferiores.....**5**
4. Arco zigomático completo.....**12**
5. Antebraço, na maioria das vezes, menor que 40 mm.....**6**
- 5'. Antebraço maior que 40 mm.....**7**
6. Antebraço sem pelos, 34 a 38 mm; dorso castanho pálido; primeiro molar inferior com cúspide principal baixa; segundo pré-molar inferior maior do que o primeiro.....***Carollia benkeithi***
- 6'. Antebraço com pelos, de 35 a 40 mm; dorso castanho-escuro; pelos tricoloridos; primeiro molar inferior com cúspide principal de alta; primeiro e segundo pré-molares inferiores quase iguais em altura.....***Carollia brevicauda***
7. Pelage relativamente curta; redução do primeiro pré-molar superior em relação ao canino; primeiro e segundo pré-molares inferiores são iguais em altura; antebraço e

dedos dos pés sem ou com poucos pelos; fileira de dentes da maxila maior que 7,4 mm; quando visto diretamente acima por mandíbula, 1/2 ou mais dos incisivos externos escondidos pelo cíngulo dos caninos; mandíbula tende a ser em forma de V.. ***Carollia perspicillata***

8. Primeiro incisivo superior relativamente amplo e com 3 ou 4 lóbulos bem definidas; nenhum espaço entre o incisivo superior e canina; margem membrana interfemural sem pelos; primeiros incisivos superiores com cíngulo laterais..... ***Rhinophylla pumilio***

8'. Antebraço menor que 32 mm; comprimento do condilobasal inferior a 16 mm; margem de uropatágio com uma franja de pelos; primeiros incisivos superiores sem cíngulo laterais..... ***Rhinophylla fischeriae***

9. Incisivos superiores internos e externos não muito diferentes em tamanho; língua com a ponta "pincel" que consiste em longas papilas filamentosas; nenhum sulco profundo ao longo de cada lado da língua; Três molares superiores e inferiores de cada lado..... **10**

9'. Incisivos superiores internos em destaque com pontas largas, visivelmente maiores do que os incisivos externos; língua carece de ponta "pincel"; um sulco longitudinal profundo presente ao longo de cada lado da língua..... **11**

10. Três molares superiores e inferiores de cada lado; três pré-molares superiores; uropatágio pouco desenvolvido; margem posterior de uropatágio geralmente bem peludo; caninos superiores de tamanho moderado..... ***Anoura caudifer***

10'. Dois pré-molares superiores; incisivos inferiores bem desenvolvidos em adultos; I1 sobressai muito além da ponta do I2; incisivos inferiores aglomerados, geralmente em contato uns com os outros e caninos..... ***Glossophaga soricina***

11. Comprimento do crânio menor que 24,5 mm; comprimento da fileira de dentes da maxila igual ou inferior a 7 mm (6,2-7 mm); maior comprimento do crânio (19,6-21,8 mm); antebraço 31-34 mm..... ***Lonchophylla thomasi***

12. Lábios com pequenas papilas ou com um par de almofadas dérmicos dispostos em um V ou Y; molares superiores com cúspides externas distintas em forma de W..... **13**

12'. Molares superiores sem cúspides externas distintas em forma de W..... **26**

13. Um par de incisivos inferiores..... **14**

13'. Dois pares de incisivos inferiores..... **19**

14. Cauda bem desenvolvida; antebraço inferior a 70 mm; comprimento do crânio menor que 35 mm; dois pré-molares inferiores; margem da folha nasal crenulada e franjas com pelos retos; listra dorsal presente mediana pálida ou ausente; membrana da asa anexada ao lado do pé; antebraço 45-51 mm; maior comprimento do crânio (21-23mm); pelos dorsais variando de acinzentada a marrom enegrecida; listra dorsal ao longo da linha média; sem ranhura vertical entre protocônide e hipocônide no cíngulo lingual de M1 e M2.....**Mimon crenulatum**

14'. Cauda bem desenvolvida; antebraço inferior a 70 mm; comprimento do crânio menor que 35 mm; três pré-molares inferiores.....**15**

15. Constrição pós-orbital inferior a 5 mm.....**16**

15'. Constrição pós-orbital maior que 5 mm.....**18**

16. Antebraço maior que 49 mm; comprimento do crânio maior que 26 mm.....**18**

16'. Antebraço menor que 49 mm; comprimento do crânio menor que 26 mm.....**17**

17. Antebraço mais curto do que 40 mm; maior comprimento do crânio inferior a 21 mm.....**Lophostoma braziliense**

18. Manchas brancas pós-auricular presentes ou ausentes; pelagem ventral mais pálida, muitas vezes fortemente fosco branco; superfície anterior do segundo pré-molar superior sobreposto por primeiro pré-molar superior.....**Lophostoma silvicolum**

18'. Constrição pós-orbital geralmente 5,0-5,5 mm; diferença distinta entre cíngulo de caninos inferiores quando visto de cima; listra no topo da cabeça entre as orelhas.....**Tonatia saurophila**

19. Cauda contida na membrana interfemoral, não se estendendo a margem posterior; dois pré-molares inferiores.....**20**

19'. Cauda contida na membrana interfemoral, não se estendendo a margem posterior; três pré-molares inferiores.....**23**

20. Calcâneo igual ou maior do que o comprimento do pé; comprimento da orelha mais de 25 mm; crista sagital bem desenvolvido.....**21**

20'. Calcâneo mais curto do que o comprimento do pé; comprimento da orelha inferior a 25 mm; crista sagital ausente ou pouco desenvolvida.....**Phyllostomus discolor**

21. Antebraço menor que 75 mm; membrana da asa anexada aos tornozelos; maior comprimento do crânio inferior a 35 mm.....**22**

- 21'. Antebraço maior que 75 mm; membrana da asa anexada ao lado do pé; maior comprimento do crânio maior que 35 mm,.....***Phyllostomus hastatus***
22. Antebraço maior que 61 mm; tíbia mais do que 23 mm; maior comprimento do crânio maior que 29 mm.....***Phyllostomus elongatus***
23. Antebraço maior que 100 mm; cauda ausente; rostró mais longo que caixa craniana.....***Vampyrum spectrum***
- 23'. Antebraço menor que 75 mm; cauda presente; rostró menor que caixa craniana.....**24**
24. Varias papilas ao redor da boca; margem da folha nasal levemente serrilhada; antebraço entre 55-65 mm.....***Trachops cirrhosus***
- 24'. Sem papilas ao redor da boca; margem da folha nasal não serrilhada.....**25**
25. Antebraço 33-58 mm; maior comprimento do crânio 17-28 mm; primeiros incisivos superiores semelhantes aos caninos em comprimento; primeiro pré-molar superior (P3) com cúspides acessórias sobre as margens lingual e posterior; ventre de cor escura semelhante ao dorso; antebraço com comprimento superior a 41 mm; maior comprimento do crânio superior a 21 mm; incisivos inferiores estreitos com e coroas altas.....***Micronycteris hirsuta***
26. Molar 2/2.....**27**
- 26'. Molar 2/3 ou 3/3.....**33**
27. Arcada dentária superior não semicircular, rostró maior que a ½ da caixa craniana; rostró não inflado ou em forma cuboide; sem nasais, a margem posterior de narinas externas marcadas em forma de lira; tamanho moderada a grande, antebraço maior que 43 mm, comprimento do crânio maior que 23 mm; incisivos superiores internos delgados e paralelos uns aos outros (não convergentes nas pontas); listras dorsais e faciais relativamente discretos ou ausentes.....***Chiroderma villosum***
- 27'. Nasais presentes, a margem posterior de narinas externas sem marginalização em forma de lira.....**28**
28. Margem posterior das narinas externas mais ou menos em linha reta; segundo molar superior muito menor do que o primeiro e em informa diferentes; processo paroccipital pequeno ou moderadamente desenvolvido; pelos dorsais bicolores; primeiro incisivo superior marcadamente bífido, duas vezes menor que o tamanho da segunda incisivo.....**29**
- 28'. Primeiro incisivo superior não bífido ou apenas fracamente, duas vezes maior que o tamanho da segunda incisivo; segundo molar superior visivelmente maior do

que em primeiro lugar; pré-molares superiores separados uns dos outros partir de dentes adjacentes através de lacunas evidentes.....	<i>Mesophylla macconnelli</i>
29. Antebraço menor que 46 mm.....	30
29'. Antebraço maior que 46 mm.....	31
30. Molares 2/2; membrana Interfemoral praticamente sem pelos.....	<i>Dermanura cinereus</i>
30'. Molares 2/2.....	<i>Dermanura sp</i>
31. Molares 3/3; listras faciais geralmente evidentes; ferradura da folha nasal com borda inferior, geralmente livre do lábio superior; ponta das asas pálida; antebraço maior que 61 mm; comprimento do crânio maior que 29,5 mm.....	<i>Artibeus planirostris</i>
31'. Molares 3/3; pelos longos, enegrecidos; listras faciais fracas ou ausentes; mascara negra ao redor dos olhos.....	<i>Artibeus obscurus</i>
32. Molares 2/3; listras faciais proeminentes e bem definidas.....	<i>Artibeus lituratus</i>
33. Molar 2/3.....	34
33'. Molar 3/3.....	34'
34. Primeiro incisivo superior não bífido ou levemente bífido e duas vezes maior em tamanho que segundo incisivo; segundo molar superior de tamanho igual a, ou menor do que o primeiro; incisivos 2/1; primeiro incisivo mais de alto que primeiro pré-molar; comprimento do crânio inferior a 24 mm; primeiro pré-molar inferior caniniformes.....	<i>Vampyressa sp</i>
34'. Arcada dentária superior não expandida lateralmente, em forma de U, vista occlusal.....	35
35. Membrana interfemural ausente; molares superiores distintamente sulcados longitudinalmente.....	36
35'. Membrana interfemural presente mesmo que às vezes reduzida; molares superiores sem sulco longitudinal.....	37
36. Quatro incisivos inferiores, dois de cada lado, e não reduzida para espículas; Molares e pré-molares geralmente em contato com os dentes adjacentes; cúspides linguais do M1 e M2 bem definidas e separadas por um entalhe profundo; paraconide não está presente em M1 e M2; antebraço inferior a 55 mm; antebraço entre 43-51 mm; pontas dos incisivos superiores interiores amplos e fracamente bilobado com os lóbulos de igual tamanho.....	<i>Sturnira tildae</i>

36'. Antebraço 45,5 mm ou menos; maior comprimento do crânio 20.0- 24,5 mm; pontas dos incisivos superiores interiores estreitas; linhas dentes superiores arqueadas para fora; incisivos superiores internos levemente bifeto.....***Sturnira lilium***

37. Primeiro incisivo superior duas vezes o tamanho do segundo e diferente em forma; espaços evidentes presentes entre os incisivos superiores; coroas de primeira incisivos superiores paralelo, profundamente bifida; incisivos inferiores em contato uns com os outros; cor escura, listras faciais proeminentes, margem orelha amarelada, membrana interfemoral quase nua.....***Uroderma bilobatum***

37'. Coroas de primeiros incisivos superiores convergem nas suas extremidades, não profundamente bifida; incisivos inferiores separadas por espaços distintos.....**38**

38. Antebraço maior que 54 mm; comprimento do condilobasal maior que 26 mm; dorsal com pelagem marrom claro a marrom escuro, não enegrecido; listras dorsais e faciais; PM4 com uma curta cúspide posterior.....***Platyrrhinus infuscus***

38'. Pelage castanho claro ao castanho-escuro; listras faciais sempre brancas e geralmente bem visíveis; antebraço 32-42 mm; crista anterolingual no último pré-molar inferior (p2) com uma cúspide acessória bem desenvolvida.....***Platyrrhinus incarum***.

Chave simplificada de identificação das espécies de morcegos da Família Vespertilionidae coletados.

1. Orelhas normais, comprimento menor que 20 mm, não alcançando a ponta do focinho quando dobradas para frente**2**
2. Superfície dorsal da membrana interfemural densamente pilosa.....**3**
- 2'. Superfície dorsal da membrana interfemural nua ou pouco pilosa; se pilosa, com pelos esparsos e apenas na porção proximal.....**4**
3. Coloração geral avermelhada; orelha arredondada ou romboidal, antebraço menor que 45 mm (36,75 – 40,45 mm); superfície dorsal da membrana interfemural densamente pilosa em toda sua extensão; pré-molares 2/2 (primeiro pré-molar superior bastante reduzido)..... ***Lasiurus blossevillii***
4. Incisivos 2/3.....**5**

5. Face dorsal da membrana interfemural pouco pilosa em sua porção proximal; pré-molares 3/3; focinho não inflado; coloração geral castanha a castanha-enegrecida; membrana interfemural sem franja, sem despigmentação ou borda pregueada; crista sagital presente; segundo pré-molar superior deslocado internamente à série de dentes (deslocado para a face lingual), se não completamente deslocado esse dente é reduzido e comprimido lateralmente entre o primeiro e o terceiro pré-molares.....***Myotis riparius***.

Chave simplificada de identificação das espécies de morcegos da Família Emballonuridae coletados.

1. Fenda Basefenoidal dividida por septo mediano; dorso com duas linhas esbranquiçadas ou castanho mais ou menos distintas longitudinais, asa ligada ao tarso ou no tornozelo, pelagem dorsal castanha uniforme; linhas dorsais longitudinais geralmente distintos; comprimento do antebraço 37,4 - 42,3 (machos 37,4 - 40, fêmeas 39.1 - 42.3); comprimento da fileira de dentes do maxilar superior 5 (5,1-5,5); maior largura de molares transversais (M3-M3) geralmente mais de 6 (5,9-6,3).....***Saccopteryx leptura***.

Anexo 2:



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47377-1	Data da Emissão: 21/01/2015 15:53	Data para Revalidação*: 20/02/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Francisco Chagas Bezerra dos Santos	CPF: 465.404.232-68
Título do Projeto: Importância de quiróptera no ciclo de transmissão de Leishmania spp. e Trypanosoma cruzi no Estado do Acre.	
Nome da Instituição: Instituto de Educação Ciências e Tecnologia do Acre	CNPJ: 10.918.674/0001-23

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura de quirópteros para estudo de tripanosomatídeos.	12/2014	12/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, a difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio n° 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da Infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Armando Muniz Calouro	Colaborador	074.796.748-21	16626195 SSP-SP	Brasileira
2	André Luiz Rodrigues Roque	Orientador	273.556.108-99	28362324-X SSP-SP	Brasileira
3	Raír Sousa Verde	Colaborador	950.950.202-20	10450106 SSP-AC	Brasileira
4	Sergio Augusto Vidal de Oliveira	Colaborador	929.777.152-15	365701 SSP-AC	Brasileira
5	PAULO SÉRGIO D ANDREA	Colaborador	062.639.198-92	16921152 SSP-SP-SP	Brasileira
6	Chane Ferreira Crisóstomo	Colaborador	233.520.782-20	401606 SSP-AC	Brasileira
7	ANA MARIA JANSEN	Orientadora	184.807.057-87	1917077 IFF-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	RIO BRANCO	AC	Universidade Federal do Acre	Fora de UC Federal
2	XAPURI	AC	Projeto de Assentamento Agroextrativista Chico Mendes	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n° 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93215919



Página 1/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47377-1	Data da Emissão: 21/01/2015 15:53	Data para Revalidação*: 20/02/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Francisco Chagas Bezerra dos Santos	CPF: 465.404.232-68
Título do Projeto: Importância de quiróptera no ciclo de transmissão de Leishmania spp. e Trypanosoma cruzi no Estado do Acre.	
Nome da Instituição: Instituto de Educação Ciências e Tecnologia do Acre	CNPJ: 10.918.674/0001-23

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtd: 15)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Rede de neblina, Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93215919



Página 2/3



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47377-1	Data da Emissão: 21/01/2015 15:53	Data para Revalidação*: 20/02/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Francisco Chagas Bezerra dos Santos	CPF: 485.404.232-68
Título do Projeto: Importância de quiróptera no ciclo de transmissão de Leishmania spp. e Trypanosoma cruzi no Estado do Acre.	
Nome da Instituição: Instituto de Educação Ciências e Tecnologia do Acre	CNPJ: 10.918.674/0001-23

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93215919



Página 3/3

Anexo 3:



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44089-1	Data da Emissão: 02/06/2014 10:58	Data para Revalidação*: 02/07/2015
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Richarly da Costa Silva	CPF: 002.837.822-93
Título do Projeto: COMPOSIÇÃO, ABUNDÂNCIA E RIQUEZA DE ESPÉCIES DE MORCEGOS E SUA RELAÇÃO COM A OBSTRUÇÃO VEGETACIONAL NO LESTE DO ESTADO DO ACRE	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE	CNPJ: 04.071.106/0001-37

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de morcegos	04/2014	03/2015

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros Instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Sergio Augusto Vidal de Oliveira	Pesquisador	929.777.152-15	365701 SSP-AC	Brasileira
2	Armando Muniz Calouro	Pesquisador	074.796.745-21	16626195 SSP-SP	Brasileira
3	Rair Sousa Verde	Pesquisador	950.950.202-20	10450106 SSP-AC	Brasileira
4	Iuiz Henrique Medeiros Borges	Pesquisador	002.567.482-09	10521860 SSP-AC	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SENADOR GUIOMARD	AC	Fazenda Experimental Catuaba	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 79144297



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44089-1	Data da Emissão: 02/06/2014 10:58	Data para Revalidação*: 02/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Richarly da Costa Silva	CPF: 002.837.822-93
Título do Projeto: COMPOSIÇÃO, ABUNDÂNCIA E RIQUEZA DE ESPÉCIES DE MORCEGOS E SUA RELAÇÃO COM A OBSTRUÇÃO VEGETACIONAL NO LESTE DO ESTADO DO ACRE	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE	CNPJ: 04.071.108/0001-37

2	PORTO ACRE	AC	Reserva Florestal Humaitá	Fora de UC Federal
3	SENA MADUREIRA	AC	Floresta Estadual do Antimary	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 4)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual, Rede de neblina
---	---	---------------------------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 79144297



Página 2/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44089-1	Data da Emissão: 02/06/2014 10:58	Data para Revalidação*: 02/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Richarly da Costa Silva	CPF: 002.837.822-93
Título do Projeto: COMPOSIÇÃO, ABUNDÂNCIA E RIQUEZA DE ESPÉCIES DE MORCEGOS E SUA RELAÇÃO COM A OBSTRUÇÃO VEGETACIONAL NO LESTE DO ESTADO DO ACRE	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE	CNPJ: 04.071.106/0001-37

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 79144297



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44089-1	Data da Emissão: 02/06/2014 10:58	Data para Revalidação*: 02/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Richarly da Costa Silva	CPF: 002.837.822-93
Título do Projeto: COMPOSIÇÃO, ABUNDÂNCIA E RIQUEZA DE ESPÉCIES DE MORCEGOS E SUA RELAÇÃO COM A OBSTRUÇÃO VEGETACIONAL NO LESTE DO ESTADO DO ACRE	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE	CNPJ: 04.071.106/0001-37

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 79144297



Página 4/4

Anexo 4: Artigo

Oecologia Australis
21(2): 191-196, 2017
10.4257/oecol.2017.2102.09

FIRST RECORD OF *Lasiurus blossevillii* LESSON & GARNOT, 1826 (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE) IN THE STATE OF ACRE, SOUTHWEST OF THE AMAZON, BRAZIL

Rair de Sousa Verde^{1,2*}, Francisco Charles Bezerra dos Santos²,
Richarly da Costa Silva¹ & Armando Muniz Calouro^{1,2}

¹Universidade Federal do Acre (UFAC), Departamento de Ciências Biológicas e da Natureza. BR-364, km04, Distrito Industrial, Rio Branco, AC, Brasil. CEP: 69902-350

²Universidade Federal do Acre (UFAC), Departamento de Ciências Biológicas e da Natureza, Laboratório de Ecologia de Mamíferos. BR-364, km04, Distrito Industrial, Rio Branco, AC, Brasil. CEP: 69902-350

³Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos. Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro/RJ, Brasil. CEP: 21040-360
E-mails: rair.verde@gmail.com, francisco.santos@ufac.edu.br, rcosta.bio@gmail.com, acalouro@bol.com.br

ABSTRACT

We recorded two individuals of *Lasiurus blossevillii* for the State of Acre, in the municipality of Xapuri, boundary with Bolivia. Two adult specimens, a female and a male, were caught in the Agro-extractive Settlement Project Chico Mendes (PAECM) in August 2014 and December 2015, by using mist-nets installed at ground level. The morphometric characteristics are consistent with the literature, ensuring the precise taxonomic identification of the specimens. This study increases to five the number of records of this species to the legal Amazon.

Keywords: Amazon forest; bats; distribution.

The genus *Lasiurus* comprises 17 species with restricted distribution in the Americas (Simmons 2005, Gardner 2007) and, according to Nogueira *et al.* (2014), seven species of *Lasiurus* occur in Brazil: *L. blossevillii* Lesson & Garnot, 1826, *L. cinereus* Palisot de Beauvois, 1796, *L. ebenus* Fazzolari-Corrêa, 1994, *L. ega* (Gervais 1856), *L. egregius* (Peters 1870), *L. castaneus* Handley, 1960, and *L. salinae* Thomas, 1902. *Lasiurus blossevillii* occurs from Canada to South America, being recorded in all countries except Chile (Gardner 2007). In Brazil, this species has been previously registered in the States of Amapá, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, São Paulo, and Santa Catarina, occurring in the Amazon, Cerrado and Atlantic Forest biomes (Gardner 2007, Martins *et al.* 2006, Peters *et al.* 2006, Tavares & Gregorin 2008, Alho *et al.* 2011, Bernard *et al.* 2011, Rodrigues & Ribas 2011, Fischer *et al.* 2015, Oliveira *et al.* 2015, Soares *et al.* 2016).

Despite the widespread occurrence of *L. blossevillii* throughout Brazil, previous records are

rare and sporadic, hampering the design of the actual distribution of the species. Bernard *et al.* (2011) and Rodrigues & Ribas (2011) have commented on *L. blossevillii* records in the North region of Brazil, where they recognize only the records of Reis (1984) and Bernard & Fenton (2002) as incontestable to Brazilian Amazon. Here we report the first occurrence of *L. blossevillii* for the State of Acre, constituting the fifth record of the species in the Brazilian Amazon.

Samples were collected in the extreme southwest of Amazon, municipality of Xapuri, State of Acre, border with Bolivia (10°54'S; 68°21'W), in the Agro-extractive Settlement Project Chico Mendes (PAECM). The area has 24,898 ha and the predominant habitat types are open forest dominated by bamboos, open forest with palm trees and dense forest (Acre 2010). The climate of region according to Köppen is Af (hot and humid), with annual minimum temperature around 24°C with two distinct seasons: dry, which usually occurs between the months of May and September; and rainy, which usually occurs between the months October and April (Macedo *et al.* 2013). The site where the two

specimens were collected has as predominant vegetation type of open forest with palm trees, with the presence of a water body (stream).

The specimens of *L. blossevillii* were collected in August 2014 and December 2015, using mist nets (12 x 3 m, 19 mm mesh, Ecotone®) arranged at ground level of the sampled sites. The animals were euthanized with intramuscular administration of 100 mg/kg of hydrochloride of ketamine in combination with acepromazine 1%, in a ratio of 9:1. They were fixed in 10% formalin, and stored in 70% alcohol at the Zoological Collection of Mammals / Federal University of Acre (UFAC) with voucher numbers CZM-562 and CZM-707. Bats were captured under Biodiversity Information and Authorization System (SISBIO) No. 47377-1.

To confirm the identification of specimens, in addition to verify the age of the specimens by viewing the ossification of the third metacarpal epiphysis (Kunz & Anthony 1982, Kunz & Robson 1995), external body, cranial and dental measurements were taken: Weight; Forearm Length (CA) - distance from the ulna to the wrist including carpal; Overall Length (CT) - distance from the tip of the snout to the tip of the last caudal vertebra; Tibial Length (CTi) - distance from the proximal end of the tibia to the posterior base of the calcaneus; Ear Length (CO) - from the notch to the tip of the pinna; Tail length (CC) - distance from the dorsal flexure of the tail with the sacrum to the end of the last caudal vertebra; Maximum Skull Length (CMC) - the proximal point of the occiput to the distal point on the premaxilla (excluding the incisors); Zygomatic Width (LZ) - the largest distance between the zygomatic arches. Each morphological and cranial measurement was measured three times using a digital caliper with 0.01 mm precision, and then the mean was calculated. The identification was performed with the aid of identification keys of bats (Simmons 2005, Gardner 2007, Díaz *et al.* 2011), as well as comparisons with morphological and cranial measurements available in previous studies (*e.g.*, Rodrigues & Ribas 2011).

The two specimens captured in Xapuri correspond to the first and second records for Acre. Our captures increase the number of records of *L.*

blossevillii for the Brazilian Amazon (Figure 1). The specimens of *L. blossevillii* correspond to a non-breeding female and male, caught between the first and second hour after sunset in a riparian zone. The habitat was characterized by the presence of a water body, trees of palm trees and a matrix composed of pasture and secondary forest.

These individuals had striking features of *Lasiurus*, such as reddish-brown dorsal pelage, pale belly in shades of yellow and rusty face, small ears, rounded and pink color, as well as the face, long tail completely contained in the membrane of uropatagium which is thick hair on the dorsal region, small eyes and long fur (Figure 2). First pair of upper premolars is tiny. The two individuals were adults and all external measurements, cranial and dental were compatible with measurements obtained in previous studies (Table 1).

The nearest record of *L. blossevillii* was made by Aguirre & Urioste (1994) in Arroyo Hermozo, Bolivia, which was located 100 km away from our record. The genus *Lasiurus* is widely distributed in the Neotropics, and comprises known migratory species in North America, but with little data on the species from South America (Gardner 2007). In Amazon, *L. blossevillii* was previously recorded in Bolivia (Aguirre & Urioste 1994, Anderson 1997), Colombia (Morales-Martínez & Ramírez-Chaves 2015), French Guiana (Simmons 1998), Guyana (Gardner 2007), Peru (Solari *et al.* 2006, Fernández-Arellano & Torres-Vásquez 2013) and Suriname (Gardner 2007).

The record of *L. blossevillii* in the State of Acre, though expected, fills a distribution gap in Brazil, where the records of the species are widely spaced, caused by the forage strategy of species and low rate of captures on studies with mist nets Shump & Shump (1982). According to Reid (1997), the activity of *L. blossevillii* is concentrated mainly in the first two hours after the sunset and have an association with riparian zones, foraging near streams, where the species actively search for insects near the water courses. We captured the two individuals of *L. blossevillii* two hours after the sunset with mist-nets placed near streams, in accordance with the preference of the species. Bats of family

Vespertilionidae are insectivores that normally forage in open areas or edges and because of this, species of genus *Lasiurus* have low capture rates in studies that use mist-nets (Kalko *et al.* 1996). Studies that use direct search on roosts, canopy nets or acoustic methods are more effective to maximize captures of Vespertilionid bats species, for example *L. blossevillii* (Portfors *et al.* 2000).

Thus, studies that aggregate results on Vespertilionid bats such as *L. blossevillii*, whether local or regional, most often result in increased knowledge of the occurrence and distribution of this species. Systematic data on environmental variables are also needed in order to understand the ecological factors that determine the distribution and abundance of this species.

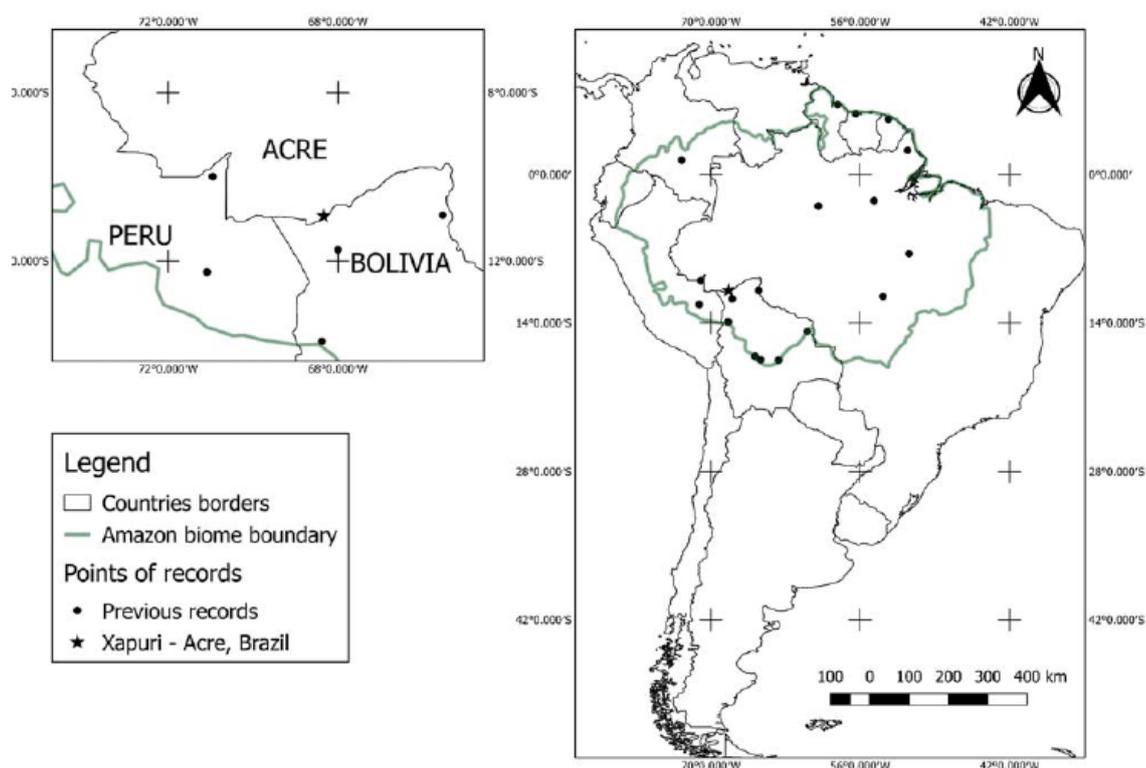


Figure 1. Distribution of *Lasiurus blossevillii* in the Amazon. The star represents the specimens collected in the Municipality of Xapuri, Acre, Brazil. Circular points represent the current distribution for Amazon with the localities: [1] Colombia, Caquetá, Florencia (Morales-Martínez & Ramírez-Chaves 2015), [2] Guyana, Demerara, Demerara-Mahaica (Gardner 2007), [3] Suriname, Coronie, Paramaribo (Gardner 2007), [4] French Guiana, Sinnamary, Paracou Research Station (Simmons & Voss 1998), [5] Brazil, Amapá (Martins *et al.* 2006), [6] Brazil, Manaus (Reis 1984), [7] Brazil, Santarém Alter do Chão (Bernard & Fenton 2002), [8] Brazil, Santarém City (Rodrigues & Ribas 2011), [9] Brazil, São Félix do Xingu, Kayapó Indigenous Area (Peters *et al.* 2006), [10] Peru, Uyacali, Rio Curanja (Fernández-Arellano & Torres-Vásquez 2013), [11] Brazil, Acre, Xapuri (Present Study), [12] Bolivia, Beni, Guayaramarin (Anderson 1997), [13] Bolivia, Santa Cruz, Aserradero Moira (Anderson 1997), [14] Bolivia, Santa Cruz, Cerro Itahuaticua (Anderson 1997), [15] Bolivia, Cochabamba, Incachaca (Anderson 1997) [16] Bolivia, Cochabamba, Tinkusiri (Anderson 1997), [17] Bolivia, La Paz, Sayanani (Aguirre & Urioste 1994), [18] Bolivia, Pando, Arroyo Hermoso (Aguirre & Urioste 1994), [19] Peru, Madre de Dios, Manu National Park (Solari *et al.* 2006), Bolivia, Santa Cruz City (Anderson 1997).

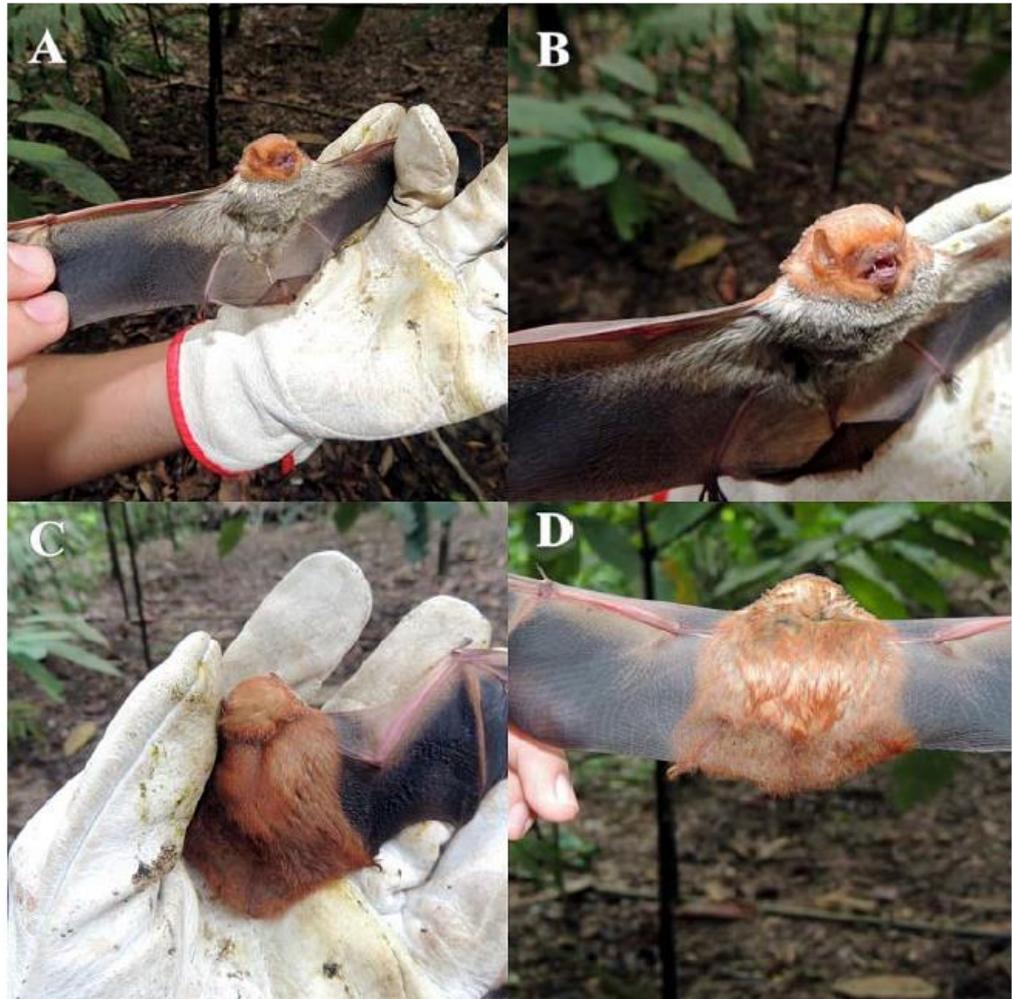


Figure 2. Specimens of *Lasiurus blossevillii*, female (CZM-707, A and B) and male (CZM-562 C and D), collected in the area of the Agro-extractive Settlement Project Chico Mendes (PAE Chico Mendes), Municipality of Xapuri, State of Acre, Brazil.

Table 1. Morphological and cranial measurements of the *Lasiurus blossevillii* specimens from Xapuri, AC (CZM-562, CZM-707), Santarém, PA (LR-896; Rodrigues & Ribas, 2011), Espírito Santo (MBML-1107; Vieira et al. 2009), and French Guiana (MNHN-1995,936; Simmons & Voss 1998). Legend: CA= Forearm Length; CT= Overall Length; CTi= Tibial Length; CO= Ear Length; CC= Tail length; CMC= Maximum Skull Length; CDM= dental-jaw series length; LZ= Zygomatic Width; LMo= Width between molars.

	CZM-562	CZM-707	LR-896	MBML-1107	MNHN-1995,936
	♂	♀	♀	♀	♀
Weight (g)	8	13	8	8	8.2
CA (mm)	40.42	39.21	39.2	41,7	40.6
CT (mm)	94.53	96.48	112	88	109
CTi (mm)	20.25	19.36	22	-	-
CO (mm)	9.06	10.85	9	10	10
CC (mm)	46.39	46.71	51	54	53
CMC (mm)	13.44	13.67	12.49	-	11.46
CDM (mm)	-	-	4.03	-	4.02
LZ (mm)	7.58	7.75	8.88	-	8.74
LMo (mm)	-	-	5.62	-	5.53

REFERENCES

- Acre. 2010. Recursos naturais: biodiversidade e ambientes do Acre. ZEE/AC, fase II, escala 1:250.000 / Programa Estadual de Zoneamento Ecológico. Relatório Técnico. Secretaria de Estado de Meio Ambiente (SEMA), Rio Branco, p. 130.
- Aguirre, L. F., & Urioste, R. J. 1994. Nuevos registros de murciélagos para Bolivia y los departamentos de Beni y Pando. *Ecología en Bolivia*, 23, 71-76.
- Alho, C. J. R., Fischer, E., Oliveira-Pissini, L. F., & Santos, C. F. 2011. Bat-species richness in the Pantanal floodplain and its surrounding uplands. *Brazilian Journal of Biology*, 71(1), 311-320.
- Anderson, S. 1997. Mammals of Bolivia, taxonomy and distribution. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 231, 1-652.
- Bernard, E., & Fenton, M. B. 2002. Species diversity of bats (Mammalia: Chiroptera) in forest fragments, primary forests, and savannas in central Amazonia, Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 80(6), 1124-1140. DOI: 10.1139/z02-094
- Bernard, E., Tavares, V. C., & Sampaio, E. 2011. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotropica*, 11(1), 35-46. DOI: 10.1590/S1676-06032011000100003
- Díaz, M. M., Aguirre, L. F., & Barquez, R. M. 2011. Clave de identificación de los murciélagos del cono sur de Sudamérica. Cochabamba, Bolivia: Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada: p. 94.
- Fernández-Arellano, G. J., & Torres-Vásquez, M. I. 2013. Lista actualizada de quirópteros de los Departamentos de Loreto Ucayali y Madre de Dios (Perú). *Barbastella*, 6(1), 73-88.
- Fischer, E., Santos, C. F., Carvalho, L. F. A. D. C., Camargo, G., Cunha, N. L. D., Silveira, M., & Silva, C. D. L. 2015. Bat fauna of Mato Grosso do Sul, southwestern Brazil. *Biota Neotropica*, 15(2), 1-17. DOI: 10.1590/1676-06032015006614
- Gardner, A. L. (Ed). 2007. *Mammals of South America - Volume 1*. Chicago: The University of Chicago Press: p. 690.
- Kalko, E. K. V., Handley Jr., C. O., & Handley, D. 1996. Organization, diversity, and long-term dynamics of a Neotropical bat community. In: M. L. Cody & J. A. Smallwood (Eds.), *Long-term studies of vertebrate communities*: pp. 503-553. San Diego: Academic Press
- Kunz, T. H., & Anthony, E. L. 1982. Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *Journal of Mammalogy*, 63(1), 23-32. DOI: 10.2307/1380667
- Kunz, T. H., & Robson, S. K. 1995. Postnatal growth and development in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*): birth size, growth rates, and age estimation. *Journal of Mammalogy*, 76(3), 769-783. DOI: 10.2307/1382746
- Macedo, M. N. C., Dias, H. C. T., Coelho, F. M. G., Araujo, E. A., Souza, M. L. H., & Silva, E. 2013. Precipitação pluviométrica e vazão da bacia hidrográfica do Riozinho do Rôla, Amazônia Ocidental. *Amibi-Água*, 8(1), 206-221.
- Martins, A. C. M., Bernard, E., & Gregorin, R. 2006. Rapid biological surveys of bats (Mammalia, Chiroptera) in three conservation units in Amapá, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 23(4), 1175-1184.
- Morales-Martínez, D. M., & Ramírez-Chaves, H. E. 2015. The distribution of bats of genus *Lasiurus* (Vespertilionidae) in Colombia, with notes on taxonomy, morphology and ecology. *Caldasia*, 37(2), 397-408. DOI: 10.15446/caldasia.v37n2.54392
- Nogueira, M. R., Lima, I. P., Moratelli, R., Tavares, V. C., Gregorin, R., & Peracchi, A. L. 2014. Checklist of Brazilian bats with comments on original records. *Check List*, 10(4), 808-821. DOI: 10.15560/10.4.808
- Peters, S. L., Malcolm, J. R., & Zimmerman, B. L. 2006. Effects of selective logging on bat communities in the southeastern Amazon. *Conservation Biology*, 20(5), 1410-1421. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2006.00526.x
- Portfors, C. V., Fenton, M. B., Aguiar, L. M. D. S., Baumgarten, J. E., Vonhof, M. J., Bouchard, S., Faria, D. M., Pedro, W. A., Rauntenbach, N. I. L. A., & Zortea, M. 2000. Bats from Fazenda Intervalas, southeastern Brazil: species account and comparison between different sampling methods. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(2), 533-538. DOI: 10.1590/S0101-81752000000200022
- Reid, F. A. 1997. *A field guide to the mammals of Central America and southeast Mexico*. New York: Oxford University Press: p. 334.
- Reis, N. R. 1984. Estrutura de comunidade de morcegos na região de Manaus, Amazonas. *Revista Brasileira de Biologia*, 44(3), 247-254.
- Rodrigues, L. R. R., & Ribas, T. F. A. 2011. Novo registro de *Lasiurus blossevillii* Lesson & Garnot, 1826 (Chiroptera, Vespertilionidae) na região de Santarém, oeste do Pará. *Revista Brasileira de Zootecias*, 13(3), 11-17.
- Oliveira, S. L. D., Souza, L. A. S., Silva, H. K., & Faria, K. D. C. 2015. Spatial configuration of the occurrence of bat species (Mammalia: Chiroptera) in eastern Mato Grosso, Brazil. *Biota Neotropica*, 15(1), 1-8. DOI: 10.1590/1676-06032014012214
- Shump, K. A., & Shump, A. U. 1982. *Lasiurus cinereus*. *Mammalian species*, (185), 1-6.
- Simmons, N. B. 2005. Order Chiroptera. In: D. E. Wilson & D. M. Reeder (Eds.), *Mammals species of the New World: a taxonomic and geographic reference*. v.1. pp. 312-359. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Simmons, N. B., & Voss, R. S. 1998. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna Part 1. Bats. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 237, 1-219.
- Soares, F. A. M., Gracioli, G., Ribeiro, C. E. B. P., Bandeira, R. S., Moreno, J. A. T., & Ferrari, S. F. 2016. Bat (Mammalia: Chiroptera) diversity in an area of mangrove forest in southern Pernambuco, Brazil, with a new species record and notes on ectoparasites (Diptera: Streblidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 56(6), 63-68. DOI: 10.11606/0031-1049.2016.56.06
- Solari, S., Pacheco, V., Luna, L., Velazco, P. M., & Patterson, B. D. 2006. Mammals of the Manu Biosphere Reserve. *Fieldiana Zoology*, 110, 13-22.

- Tavares, V. C., & Gregorin, R. 2008. A diversidade de morcegos no Brasil: Lista atualizada com comentários sobre distribuição e taxonomia. In: S.M. Pacheco, R.V. Marques & C.E. Esbérard (Eds.), *Morcegos no Brasil: Biologia, ecologia e conservação*. pp. 25-60. Porto Alegre: Amazém Digital.
- Vieira, T.B., Mendes, P., Oprea, M. & Ditchfield, A.D. 2009. New record of *Lasiurus blossevillii* (Chiroptera: Vespertilionidae) for the restinga ecosystem, and second occurrence for the State of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mammalia*, 73(2), 155-157. DOI: 10.1515/MAMM.2009.025

Submitted: 30 September 2016

Accepted: 22 December 2016

Research Article

Cite this article: dos Santos FCB, Lisboa CV, Xavier SCC, Dario MA, Verde R de S, Calouro AM, Roque ALR, Jansen AM. *Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre State, Brazil. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0031182017001834>

Received: 22 April 2017
Revised: 26 June 2017
Accepted: 15 September 2017

Key words:

Trypanosoma sp.; bats; Amazon Basin; *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease

Author for correspondence:

A.L.R. Roque, E-mail: roque@ioc.fiocruz.br

Trypanosoma sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre State, Brazil

Francisco C.B. dos Santos^{1,2}, Cristiane V. Lisboa¹, Samanta C.C. Xavier¹, Maria A. Dario¹, Rair de S. Verde³, Armando M. Calouro³, André Luiz R. Roque¹ and Ana M. Jansen¹

¹Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, CEP 21040-360, Rio de Janeiro/RJ, Brazil; ²Instituto Federal do Acre, Rua Rio Grande do Sul, S/Nº, Aeroporto Velho, CEP 69911-036, Rio Branco/AC, Brazil and ³Laboratório de Ecologia de Mamíferos, Universidade Federal do Acre, BR 364, Km 04, CEP 69920-900, Rio Branco/AC, Brazil

Abstract

Bats are ancient hosts of *Trypanosoma* species and their flying ability, longevity and adaptability to distinct environments indicate that they are efficient dispersers of parasites. Bats from Acre state (Amazon Biome) were collected in four expeditions conducted in an urban forest (Parque Zoobotânico) and one relatively more preserved area (Seringal Cahoeira) in Rio Branco and Xapuri municipalities. *Trypanosoma* sp. infection was detected by hemoculture and fresh blood examination. Isolated parasite species were identified by the similarity of the obtained DNA sequence from 18S rDNA polymerase chain reaction and reference strains. Overall, 367 bats from 23 genera and 32 species were examined. Chiropterofauna composition was specific to each municipality, although *Artibeus* sp. and *Carollia* sp. prevailed throughout. *Trypanosoma* sp. infection was detected in 85 bats (23.2%). The most widely distributed and prevalent genotypes were (in order) *Trypanosoma cruzi* TcI, *T. cruzi* marinkellei, *Trypanosoma dionisii*, *T. cruzi* TcIV and *Trypanosoma rangeli*. At least one still-undescribed *Trypanosoma* species was also detected in this study. The detection of *T. cruzi* TcI and TcIV (the ones associated with Chagas disease in Amazon biome) demonstrates the putative importance of these mammal hosts in the epidemiology of the disease in the Acre State.

Introduction

Chiropterans are nocturnal and widely dispersed mammals, representing approximately 20% of the recognized mammalian species in the world (Fenton and Simmons, 2015). These flying mammals display long life spans and can occupy diverse and numerous habitats in both natural and urban environments. These characteristics result in their high capacity as seed dispersers as well as parasite dispersion, making these animals important contributors to biodiversity (Luis *et al.* 2013).

Bats are ancient hosts of *Trypanosoma* sp. (Trypanosomatida; Protozoa), a parasite genus transmitted between several vertebrate species and blood-sucking invertebrate vector worldwide. Bat trypanosomes included in the *Trypanosoma cruzi* clade were already described in Asia, Africa, the Americas and Europe (Lima *et al.* 2013, 2015; Barbosa *et al.* 2016). Within this clade, *T. cruzi*, a zoonotic parasite responsible for Chagas disease that is currently considered a worldwide problem (Coura *et al.* 2014). This taxon displays marked heterogeneity, and six discrete typing units (DTUs) are currently recognized (TcI–TcVI) in addition to a putative TcVII DTU, which was previously associated with bats (Tcbat) and has already been observed infecting humans (Zingales *et al.* 2012; Ramirez *et al.* 2014). Other than *T. cruzi*, all species from the subgenus *T.* (*Schizotrypanum*) are described to be restricted to bats, although *Trypanosoma dionisii* was recently described in cardiac tissue in one human (Dario *et al.* 2016).

The most accepted theory to explain the origin of the trypanosomatids from *cruzi* clade indicates bats are the ancestral hosts (the bat seeding hypothesis), and their flying capacity is responsible for the dispersal of some species, such as *T. dionisii*, between the Old and New Worlds (Hamilton *et al.* 2012). Recent molecular and phylogenetic studies have corroborated this theory, describing new species of bat trypanosomes within the *T. cruzi* clade, including *Trypanosoma erneyi* and *Trypanosoma livingstonei* in African bats (Lima *et al.* 2012, 2013), *Trypanosoma wauwau* in South and Central America bats (Lima *et al.* 2015) and *Trypanosoma teixeirae* in an Australian little red flying fox (Barbosa *et al.* 2016). In Brazil, bats have been found to be infected by *T. cruzi* (TcI, TcII and Tcbat), *T. rangeli*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* and *T. wauwau* (Lima *et al.* 2015; da Costa *et al.* 2016).

The Acre state is in the Amazon basin, the biome that contains the greatest biodiversity in the world (Hoorn *et al.* 2010). The Amazonian region that previously was free from Chagas disease and where only the enzootic transmission cycle of *T. cruzi* existed, started to be considered as endemic for this disease (Coura and Junqueira, 2015). In the state of Acre, 13 autochthonous cases were reported between 1988 and 2015, which contrasts the 25 cases reported in 2016 (data from the Secretary of Health from Acre State). Considering the recent higher effort for

© Cambridge University Press 2017

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

case identification and the dispersion of the municipalities that reported cases in a huge area of the state, this historical report of cases is underestimated. There are an estimated 59 species of bats in Acre State in both forest fragments and urban areas. The most abundant species are those from the genera *Artibeus*, *Carollia* and *Phyllostomus* (Bernard *et al.* 2011). Despite their abundance and dispersion within a biome characterized by its biodiversity, the diversity of trypanosomes infecting bats from Acre state is completely unknown. The aim of this study was to describe the chiroptero-fauna and their associated trypanosomes in areas with different ecological landscapes and degrees of human disturbance in one urbanized and one rural municipality from Acre State in the Brazilian Amazon.

Materials and methods

Study areas

Bats were captured in two municipalities from Acre State, north Brazil: Rio Branco, the capital of the state (09°58'29"S/67°48'36"W), and Xapuri, 175 km away from the former (10°10'95"S/68°30'16"W). Characteristic of Amazonia, the climate is tropical-humid, displaying high levels of regular rainfalls and elevated temperatures. The rainy period is from October to March, whereas April to September has the lowest rain volumes. In Rio Branco, captures were conducted in Parque Zoológico (PZ), which is the highest vegetation area of the municipality; it belongs to the Acre Federal University and consists of 150 ha of secondary vegetation that has been preserved since 1983. In Xapuri, captures occurred in Seringal Cahoeira (SC), a well-preserved area of almost 25 thousand ha of pristine vegetation that is 30 km from the centre of the municipality alongside management areas of *Hevea brasiliensis*. Expeditions were conducted four times to each locality during the wet and dry seasons, in March and August 2014 and June and November 2015.

In each area (PZ and SC), the following three localities were selected according to a gradient of preservation and vegetation characteristics (Fig. 1): Solid Ground (A1 and A4), areas consisting of dense forest with native (A4) or secondary (A1) vegetation with palm trees and bamboo as well as lower stratum with clean aspect; Sandbank (A2 and A5), a less dense vegetation area mainly consisting of palm trees near the floodplains of rivers with high flow during the wet season and characterized by an open canopy forest and spots of dense forest with emergent trees; and Open areas (A3 and A6) near dwellings of human activity (A3) or consisting of rubber trees associated with banana and various timber species (A6).

Sample collection

Bats were captured using 10 mist nets (12 m × 3 m, 35 mm mesh) per night, which were arranged approximately 50 cm from the ground. The nets were installed in the early evening, maintained over 6 h from 6:00 to 12:00 pm (two nights in each area), and checked every 30 min. The total effort was the same for the six areas, which was 2,160 m²-h per night; 4320 m²-h per expedition in each area; 12 960 m²-h per municipality in each expedition and 51 840 m²-h in the four expeditions conducted to each municipality.

Pregnant and/or lactating bat females were removed from the net and immediately released. The others were individually placed in cloth bags and transported to the field laboratory where they stayed until the next morning when the collection procedures were performed. For all collected specimens, the morphological characteristics and body measurements were recorded for age

estimations and taxonomic identification, which was determined using the available bibliography (Gardner, 2007; Diaz *et al.* 2011).

In the field laboratory that was established exclusively for this purpose, bats were anesthetized (9:1, ketamine chloridrate 10% and acepromazine 2%), and their blood was collected by cardiac puncture. The collected blood was processed as follows: (i) for fresh blood examination, one drop was set between a glass slide and coverslip and observed in an optical microscope at 400× magnification; and (ii) for hemoculture, approximately 0.6 mL of blood was cultured in tubes containing Novy-Mc Neal-Nicolle medium with either a liver infusion tryptose medium or Schneider's Insect Medium overlay (0.3 mL in each one).

Parasitologic diagnostic procedures and DNA extraction

Fresh blood examination was performed in the field laboratory and considered positive when at least one parasite or a flagellar movement beyond blood cells was observed. Hemocultures were transported to LABTRIP and analysed every other week for up to 5 months (usually three because of bacterial contamination). The positive hemocultures were amplified, cryopreserved and deposited in the Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores, COLTRYP/FIOCRUZ (www.coltryp.fiocruz.br). The amplification of the positive hemoculture means that the observed parasites were allowed to multiply spontaneously at 27 °C until the stationary phase (when cells stopped to multiply), and after what, the flagellates were harvested and DNA was extracted as described below.

We sometimes observed in the culture tubes the presence of flagellates morphologically identical to trypanosomatids, but that did not grow, that is, we could not establish a culture of these parasites. In these cases, the liquid phase of the cultures were harvested, centrifuged and the pellet subjected to DNA extraction for further molecular characterization. To this sediment we gave the name 'culture mass'. Positive hemocultures also point to infective potential to vectors since we were able to obtain parasites starting from 300 µL.

Positive cultures and/or culture mass were washed with phosphate-buffered saline solution and incubated with proteinase K (100 µg mL⁻¹) and 0.5% of sodium dodecyl sulphate at 56 °C for 2 h. Then, DNA was extracted by the classical phenol-chloroform method (Vallejo *et al.* 1999) and then quantified in a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific), and the final concentration was adjusted to 50 ng µL⁻¹.

Molecular characterization and phylogenetic analyses

A nested polymerase chain reaction (PCR) targeting the 18S rRNA gene (~600–800 bp) was performed as described by Noyes *et al.* (1999) with external primers TRY927F (5'GAAAC AAGAAACACGGGAG3') and TRY927R (5'CTACTGGGCAGC TTGGA 3') for 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 60 s and 72 °C for 90 s. The products from the first amplification were diluted 1:10 in sterile deionized water, and 2 µL was used as template for the second-round PCR with the following internal primers: SSU561F (5'TGGGATAACAAAGGAGCA3') and SSU561R (5'CTGAGACTGTAACCTCAAAGC3') using the same cycling conditions. The products derived from the second-round reaction were electrophoresed in a 2% agarose gel run at 90 V for 1.5 h in Tris-acetate EDTA buffer, which was stained with ethidium bromide and visualized by illumination with UV light. Six samples obtained from the first expedition were characterized by other primer pairs from the same 18S rRNA gene (V7V8) using PCR conditions described elsewhere (Borghesan *et al.* 2013).

Amplified PCR products were purified using Illustra GFX PCR DNA and a gel band purification kit (GE Healthcare Life

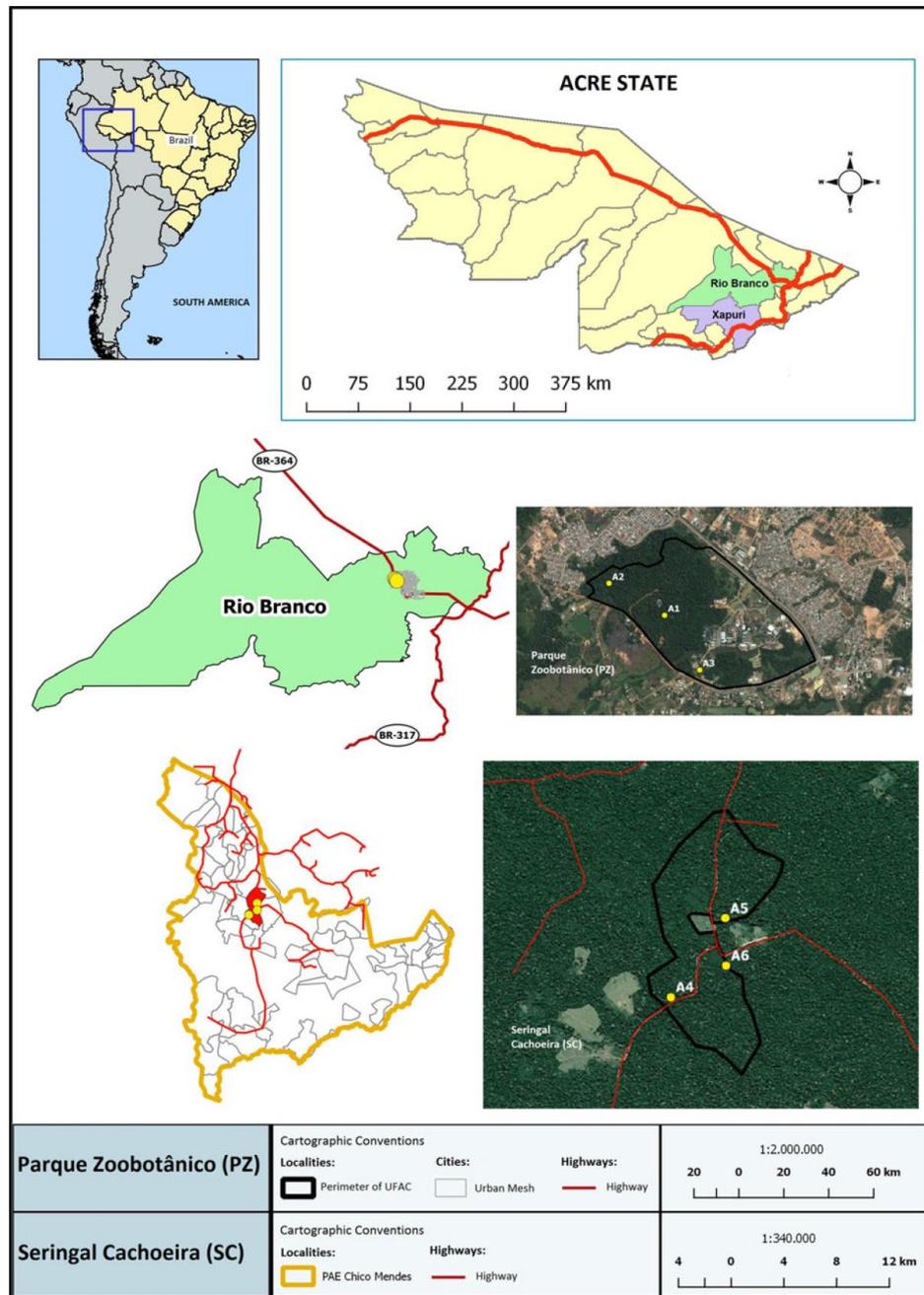


Fig. 1. Geographical location of study area: Mapping of the bat collected areas in Acre state (Amazon Biome). Bats were collected in an urban forest: Parque Zoobotânico – PZ (A1–A3); and one more preserved area: Seringal Cachoeira – SC (A4–A5) in Rio Branco and Xapuri municipalities, respectively. On the left of the figure is the study site in Brazil, highlighting the Acre state and the Brazilian and South America limits.

Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The purified PCR products were sequenced using the corresponding internal reverse primers diluted at 3·2 picomoles with ABI 3730 BigDye Terminator (v3·1) Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an Applied Biosystem DNA Analyzer on the PDTIS/FIOCRUZ sequencing platform.

Nucleotide sequences obtained from 18S rRNA were manually edited using the DNASTAR's Lasergene Sequence Analysis Software (Burland, 2000) and aligned using CLUSTALW. The obtained sequences were compared with nucleotide sequences deposited in GenBank using the NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algorithm to identify *Trypanosoma* species and/or *T. cruzi* DTUs. Identification was confirmed when the obtained sequence had a minimum length of 400 bp, an e-value equal to zero, 98% coverage and a minimum of 97% of identity with reference sequences from GenBank. The evolutionary histories at 18S rRNA gene were inferred in Mega 7 (Kumar *et al.* 2016) by Maximum Likelihood (ML) using Kimura 2-parameter model of nucleotide substitution with gamma-distributed plus invariant sites (K2+G+I), with bootstrapping at 1000 replicates for nodal support. We used in the analysis reference strains from *T. cruzi* clade and *Herpetomonas ziplika* as outgroup (Table S1).

Statistical analysis

The richness and prevalence of *Trypanosoma* species (and *T. cruzi* DTUs) were compared between species, sex and micro habitats, using the Chi-square statistical analysis. The test was performed using software R (Version 2.11.1, R Development Core Team, 2010) considering the level of significance ($P < 0.05$).

Ethical statements

Bat captures were licensed by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation Brazilian (ICMBio – SISBIO), license numbers 44089-1 and 47377-1. All procedures with the bats followed protocols that had been approved by the Ethics Committee of the Fiocruz Animal Use (LW81-12). The carcasses of euthanized animals were deposited as voucher specimens in the collection of the Mammalian Ecology Laboratory of the Acre Federal University (UFAC).

Results

Diversity and abundance of the Chiropteran fauna

The four field excursions resulted in the capture of 367 bat specimens that were included in three families (Phyllostomidae, Emballonuridae and Vespertilionidae), 23 genera and 32 species (Fig. 2). The number of captured bats in the two study areas, PZ and SC, did not differ significantly ($P = 0.08$). Moreover, the species composition of the chiropteran fauna was specific to each of the two areas (Fig. 2). Additionally, the bat species diversity was significantly higher in SC ($n = 29$) compared with PZ ($n = 17$) ($P = 0.016$). The *Artibeus* sp and *Carollia* sp predominated in both areas, and the first was slightly more abundant (35.9% vs 34.3%). The relative abundance of the *Artibeus* sp was significantly higher in PZ (49.2%) than in SC (18.1%) ($P < 0.0001$). In contrast, the relative abundance of *Carollia* sp bats was comparable in the two localities, with 32.6% in PZ and 39.7% in SC ($P = 0.10$). Data concerning the abundance of bat species in each area of both municipalities are listed in Table S2.

Distribution of *Trypanosoma* sp. infection in Chiroptera of Acre State, Amazon Biome

Infection by *Trypanosoma* sp. was observed in 85 bats (23.2%); four of them were only observed by fresh blood examination, while 81 (22%) bats from 15 genera and 22 species displayed positive hemocultures (Table 1 and Table S2). Of these, 12 (14.8%) also displayed positive fresh blood examination. Infection by *Trypanosoma* sp. was three times higher in Chiroptera from SC ($n = 60$; 34.5%) in comparison with Chiroptera from PZ ($n = 21$; 10.9%) ($P < 0.0001$).

In PZ, the infectivity potential for vectors, expressed by positive hemocultures of the examined bats, was restricted to species from the two most abundant genera, *Artibeus* and *Carollia* (85.7%). A distinct enzootical picture was observed in SC, where a higher number of infected bats and overall higher bat species diversity were observed in all collected areas. Overall, the most common *Trypanosoma* sp. infected bat species was the generalist short tailed bat species *Carollia perspicillata*, wherein 16.3% were infected.

Of the 81 bats that were positive in the hemoculture, 68 isolates were obtained from 67 bats (two isolates were obtained from one *C. perspicillata* from PZ – LBT 7063). Three culture mass were

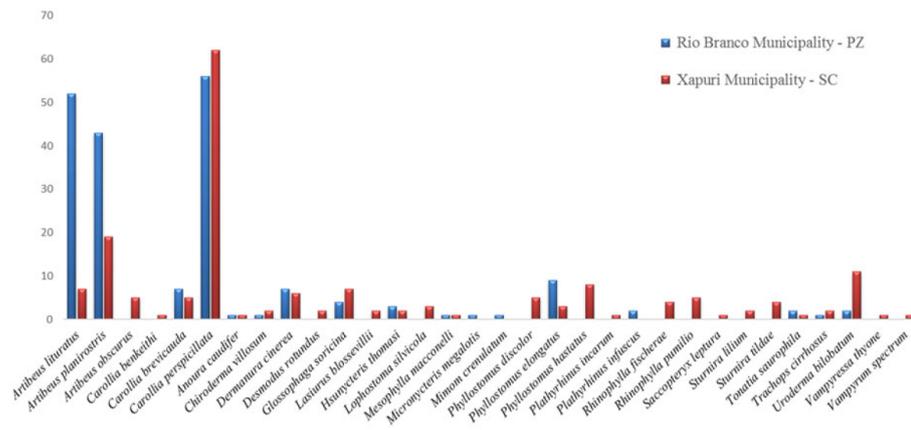


Fig. 2. Diversity and distribution of bats in two municipalities of Acre state, Rio Branco (Parque Zoobotânico –PZ) and Xapuri (Serinal Cachoeira – SC), in the Amazonian region of Brazil. Except for the species from the two most abundant genera (*Artibeus* and *Carollia*), the bat species are presented in alphabetical order.

Table 1. Distribution of *Trypanosoma* sp. infection in Chiroptera from Rio Branco and Xapuri municipalities, Acre State

Genus	Rio Branco municipality (PZ) Positive/Total (%)	Xapuri municipality (SC) Positive/Total (%)
<i>Artibeus</i>	9/95 (9.5)	10/31 (32.3)
<i>Carollia</i>	9/63 (14.3)	24/68 (35.3)
<i>Phyllostomus</i>	0/9	12/16 (75)
<i>Anoura</i>	0/1	1/1 (100)
<i>Dermanura</i>	0/7	1/6 (16.7)
<i>Glossophaga</i>	1/4 (25)	1/6 (16.7)
<i>Lasiurus</i>	–	1/2 (50)
<i>Hsuyneris</i>	0/3	1/2 (50)
<i>Lophostoma</i>	–	2/3 (66.6)
<i>Platyrrhinus</i>	1/2 (50)	0/1
<i>Sturnira</i>	–	2/6 (33.3)
<i>Tonatia</i>	0/2	1/1 (100)
<i>Trachops</i>	1/1 (100)	2/2 (100)
<i>Uroderma</i>	0/2	1/11 (9.1)
<i>Vampyressa</i>	–	1/1 (100)
Total	21/193 (10.9)	60/174 (34.5)

also successfully characterized. Infection of the other 11 bats was only diagnosed by the morphological characteristics of the parasites observed in positive cultures.

The diversity of bat species in PZ was higher in area A2, where 12 distinct species could be distinguished among the 86 collected individuals. Additionally, the prevalence of *Trypanosoma* sp. infection was higher in this area (16.3%) compared with A1 (7.6%) and A3 (4.9%), although there was only a significant difference between A2 and A3 ($P = 0.035$). In SC, no differences in the *Trypanosoma* sp. infection were noted among the distinct areas ($P = 0.305$).

Trypanosoma sp. diversity infecting bats from Acre state

At least five different and one unidentified species and/or *T. cruzi* DTUs were observed in bats from Acre. Moreover, two mixed infections were also detected; one was identified in the same

hemoculture (LBT 5060), and the other was identified in two different hemocultures from the same bat (LBT 7063). *Trypanosoma cruzi* TcI followed by *T. c. marinkellei* were the most widely distributed and prevalent trypanosomatid species (Tables 2 and 3). However, whereas *T. cruzi* TcI was found infecting bats in all areas, 11 of the 12 *T. c. marinkellei* isolates were derived from bats collected in the three SC areas. A similar feature was observed for *T. dionisii* wherein five of the six infected bats were from the same municipality. *Trypanosoma cruzi* TcIV was only detected in the most preserved areas from PZ (A1 and A2) and in SC, and the latter had co-infection with *T. c. marinkellei*. The two isolates that were characterized as *T. rangeli* belong to the genotype A and were derived from SC bats (*C. perspicillata* and *Artibeus planirostris*). One still-undescribed *Trypanosoma* species was isolated in co-infection with *T. cruzi* TcI in a bat from PZ (Tables 2 and 3). One of those samples clustered in the same branch as trypanosomes described in neotropical bats, between *T. wauwau* and *Trypanosoma* sp RNMO56 and 63 (Fig. 3). Although parasites were observed in another 11 positive hemocultures, those cultures were not established, and the parasites were characterized as *Trypanosoma* sp. based on their morphology in axenic cultures (Table 2).

The most abundant bat genera were *Carollia* sp. and *Artibeus* sp., but *Phyllostomus* sp. also displayed infections with the greatest diversity of *Trypanosoma* species (Table 4). *Trypanosoma cruzi* DTU TcI was the most dispersed *Trypanosoma* species and DTU. Only two of the 15 infected bat genera (*Lophostoma* and *Sturnira*) were not infected by *T. cruzi* TcI. *Trypanosoma dionisii* infected bats from four genera, including the most abundant bat genera, *Carollia* sp. *T. marinkellei* was mainly observed in *Phyllostomus* sp. (including one mixed infection with *T. cruzi* TcIV) as well as in *Lophostoma* sp. and *Artibeus* sp. *Artibeus* sp. was the taxon with the highest *Trypanosoma* sp. species diversity, followed by the most abundant bat genera *Carollia* sp. and *Phyllostomus* sp (Table 4).

Discussion

Bats are mammals that live for a long time, and their lifespan may easily reach more than two or even three decades (Wilkinson and South, 2002). Additionally, bats have high displacement capacity covering wide areas, which means that they are highly capable of dispersing parasites for a long time. The majority of the captured bats were included in 21 genera of Phyllostomidae, the 'leaf nosed' bat family that represent the most common and diverse bat taxon in Brazil and have a huge ecological importance.

Table 2. Distribution and diversity of *Trypanosoma* sp. in Chiroptera of Acre State, Amazon Biome according to distinct study areas and habitats

<i>Trypanosoma</i>	Rio Branco municipality			Xapuri municipality			Total
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	
<i>Trypanosoma cruzi</i> TcI	1	10	2	9	16	7	45
<i>Trypanosoma cruzi</i> TcIV	2	1	–	–	–	–	3
<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>	–	1	–	3	4	4	12
<i>Trypanosoma dionisii</i>	–	1	–	3	–	2	6
<i>Trypanosoma rangeli</i>	–	–	–	1	–	1	2
<i>Trypanosoma cruzi</i> TcIV + <i>T. cruzi marinkellei</i>	–	–	–	–	1	–	1
<i>Trypanosoma</i> sp. + <i>T. cruzi</i> TcI	–	1	–	–	–	–	1
<i>Trypanosoma</i> sp. ^a	2	–	–	5	4	–	11
Total	5	14	2	21	25	14	81

Characterization was performed using 18S SSU primers that were described by Noyes *et al.* (1999).

^aMorphologically identified.

Table 3. Identification numbers, bat species, locality and molecular characterization of the trypanosomatids using SSUrDNA

Coltryp no ^a	Isolate	Host specie	Area	18S SSU	GenBank accession no
549	LBT 5060	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcIV ^b + <i>T. c. marinkellei</i> ^b	KY748354 KY824655
550	LBT 5004	<i>Glossophaga soricina</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcIV ^b	KY748355
555	LBT 5009	<i>Artibeus lituratus</i>	A1	<i>T. cruzi</i> TcIV ^b	KY748356
558	LBT 5040	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. dionisii</i> ^b	KY689928
567	LBT 5043	<i>Sturnira tildae</i>	A4	<i>T. dionisii</i> ^b	KY689929
568	LBT 5042	<i>Trachops cirrhosus</i>	A4	<i>T. dionisii</i> ^b	KY689930
574	LBT 5469	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. dionisii</i>	KY649111
579	LBT 5340	<i>Artibeus lituratus</i>	A1	<i>T. cruzi</i> TcIV	KY649112
584	LBT 5473	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. dionisii</i>	KY649113
589	LBT 5408	<i>Artibeus planirostris</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649114
587	LBT 5472	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. rangeli</i> A	KY649115
590	LBT 5439	<i>Uroderma bilobatum</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649116
592	LBT 5427	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649117
634	LBT 6568	<i>Artibeus planirostris</i>	A3	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649118
640	LBT 7060	<i>Artibeus planirostris</i>	A2	<i>T. dionisii</i>	KY649119
647S 647L	LBT 7063	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>Trypanosoma</i> sp.+ <i>T. cruzi</i> TcI	KY649120 KY649121
648	LBT 7065	<i>Trachops cirrhosus</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649122
650	LBT 7068	<i>Carollia perspicillata</i>	A1	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649123
-	LBT 7058	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	N.D.
651	LBT 7074	<i>Artibeus lituratus</i>	A3	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649124
652	LBT 7064	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649125
653	LBT 7056	<i>Carollia breviceuda</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649126
654	LBT 7057	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	N.D.
655B	LBT 7066	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI ^c	KY649127
656	LBT 7059	<i>Carollia breviceuda</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649128
657	LBT 7080	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649129
658	LBT 7081	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649130
659	LBT 7083	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	N.D.
660	LBT 7084	<i>Vampyressa thione</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	N.D.
661	LBT 7085	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649131
662	LBT 7088	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	N.D.
663	LBT 7089	<i>Carollia benkeithi</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649132
664	LBT 7090	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649133
665	LBT 7092	<i>Artibeus lituratus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649134
666	LBT 7094	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649135
667	LBT 7095	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649136
668	LBT 7100	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649137
669	LBT 7102	<i>Artibeus lituratus</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649138
670	LBT 7078	<i>Carollia breviceuda</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649139
671	LBT 7097	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649140
672	LBT 7098	<i>Hsunycteris thomasi</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649141
674	LBT 7104	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649142
676	LBT 7087	<i>Carollia perspicillata</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	N.D.
677	LBT 7086	<i>Trachops cirrhosus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649143

(Continued)

Table 3. (Continued.)

Coltryp no ^a	Isolate	Host specie	Area	18S SSU	GenBank accession no
678	LBT 7105	<i>Dermanura cinerea</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649144
680	LBT 7110	<i>Lasiurus blossevillii</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649145
682	LBT 7067	<i>Plathyrrhinus infuscus</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649146
684	LBT 7061	<i>Artibeus planirostris</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649147
686	LBT 7091	<i>Tonatia saurophilla</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649148
687	LBT 7099	<i>Anoura caudifer</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649149
689	LBT 7108	<i>Artibeus planirostris</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649150
690	LBT 7101	<i>Carollia perspicillata</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649151
691	LBT 7093	<i>Artibeus obscurus</i>	A5	<i>T. cruzi</i> TcI	KY753877
695B	LBT 7062	<i>Carollia perspicillata</i>	A2	<i>T. cruzi</i> TcI ^c	KY649152
696	LBT 7079	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649153
697	LBT 7082	<i>Carollia perspicillata</i>	A4	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649154
–	LBT 5428	<i>Artibeus planirostris</i>	A4	<i>T. rangeli</i> A	KY649155
–	LBT 7096	<i>Glossophaga soricina</i>	A6	<i>T. cruzi</i> TcI	KY649156
575	LBT 5416	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A4	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649157
576	LBT 5423	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A4	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649158
577	LBT 5467	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649159
578	LBT 5466	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY649160
580	LBT 5434	<i>Lophostoma silvicola</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689835
581	LBT 5471	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689836
582	LBT 5441	<i>Phyllostomus elongatus</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689837
585	LBT 5425	<i>Artibeus planirostris</i>	A4	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689838
586	LBT 5389	<i>Artibeus planirostris</i>	A2	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689839
591	LBT 5450	<i>Lophostoma silvicola</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689840
673	LBT 7113	<i>Phyllostomus discolor</i>	A6	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689841
679	LBT 7106	<i>Phyllostomus hastatus</i>	A5	<i>T. c. marinkellei</i>	KY689842

The last column includes the GenBank accession number of each deposited sequence.

N.D. not deposited in GenBank due to the presence of ambiguous sites.

^aCOLTRYP number codes of cultures deposited and cryopreserved in the Coleção de *Trypanosoma* de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores – COLTRYP (www.coltryp.fiocruz.br) of the Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ/Brazil.

^bCharacterized by V7V8 primer pairs (Borghesan *et al.* 2013).

^cParasites isolated from spleen culture.

This family includes the three genera of hematophagous, as well as small predators of vertebrates, and consumers of pollen, fruits, nectar and insects. The latter correspond to an ancestral food item that is kept in the diet of almost all species of bats to a greater or lesser degree (Gardner, 1979; Rojas *et al.* 2011; Carrillo-Araujo *et al.* 2015). Considering that bats are voracious insect predators, it is very likely that bats may infect at least by *T. cruzi*, *T. dionisii* and *T. rangeli* by ingesting infected Triatomine vectors.

Even in the highly preserved SC area, we collected 29 bat species, which is far less than the 59 bat species Bernard *et al.* (2011) described as extant in Acre State. One possible reason may be that, although well preserved, SC has a history of logging, which may reduce roost offerings and adequate shelters for some species of bats. In addition, we collect in the sub-forest, which therefore decreases the chances of capturing the bats that fly in higher forest strata.

The PZ area, as expected, displayed a significantly lower number of bat species ($n = 17$). In fact, although it is an area of urban forest that is not frequented by tourists, it suffers anthropic action because there is a research institute in this area where people and vehicles circulate. *Carollia* sp seem to be well adapted to altered

environments, as shown by the similar number of specimens of this taxon collected in both study areas. By contrast, *Phyllostomus* sp. was mainly collected in SC. In PZ, the generalist bat genus *Artibeus* predominated.

There are ecological traits of chiropterans that may enhance their exposure to *Trypanosoma* sp infection. In fact, bats can roost in several natural and artificial habitats and can even modify vegetation to form suitable roosting places as tents that are built by some bat genera. In all these distinct habitats bats may get in contact with triatomines (Stoner, 2000). Palm trees whose leaves are frequently used as refuges by bats, are classical habitat of *Rhodnius* specimens, an efficient *T. cruzi* vector that is very common in the Amazon region (Coura and Junqueira, 2015). Considering that bats are voracious insect predators, it is very likely that tent building bats may be infected at least by *T. cruzi* and *T. rangeli* by ingesting infected vectors.

Bats may have a complex social structure that includes cooperative behaviour even among distinct groups. Cooperation includes roosting, taking care of offspring, grooming, foraging and feeding (Gardner, 2007). Food sharing is especially evident in the three hematophagous bat genera. Sharing food from

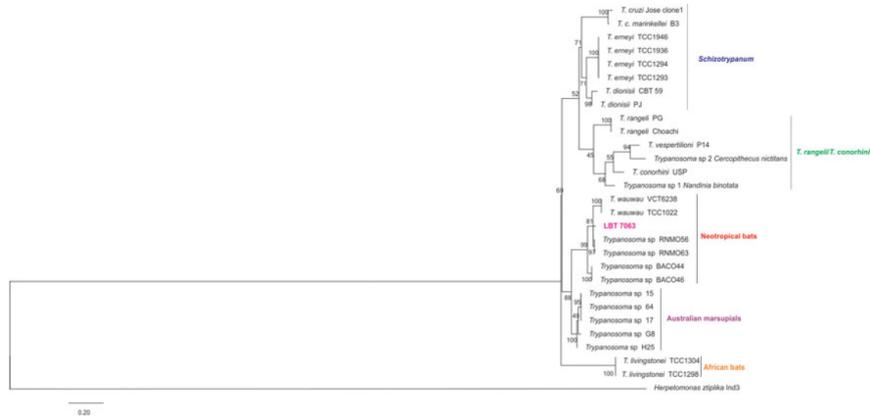


Fig. 3. Phylogenetic inference of isolate LBT 7063 detected in *Carollia perspicillata* bat from Rio Branco municipality, Acre state, Brazil, in the *T. cruzi* clade. Tree construction from SSU rRNA followed the maximum likelihood (ML) method under Kimura's two-parameter model and gamma distributed with invariant sites (K2 + G + I). Numbers at nodes indicate support from 1000 bootstrap replicates. The isolate clustered into the *T. cruzi* clade associated with trypanosomes described in neotropical bats (Lima *et al.* 2015). *Trypanosoma* sp H25, G8 and probably *T.* sp 15 and 17 have now been named *T. noyesi* (Botero *et al.* 2016)

adult animals to their offspring is a common pattern of behaviour in the animal world and may favour parasite transmission. This may especially be the case for mammalian trypanosomatids if the bat meal consists of blood. Of note, blood-feeding bats share food between adults, i.e. adult individuals regurgitate the blood they obtained for both their puppies and adult bats that could not feed themselves (Wilkinson *et al.* 2016). The care of offspring includes feeding other female pups and creating maintenance clusters of young as a crèche (Wilkinson *et al.* 2016). Bats are excellent reservoirs of *Trypanosoma* sp. and probably the ancestral host of *T. cruzi* (Molyneux, 1991; Hamilton *et al.* 2012). Nevertheless, *Trypanosoma* sp. of bats is a little explored universe. In fact, the increase in the analytical power of the molecular tools

has resulted in a growing number of new species of *Trypanosoma* sp. described in Chiropterans over the last several years. Chagas disease is currently a health threat in the Amazon region and in Acre State, where cases and outbreaks are becoming frequent; moreover, studies about *Trypanosoma* sp. infection of the mammalian fauna including bat species of Acre State are scarce.

Bats fidelity to their refuges is a factor that favours the establishment and maintenance of triatomine colonies. The association of *Cavernicola pilosa* with caves and *T. cruzi* and *T. c. marinkellei* transmission with bats is a nice example. Knowledge of how animal, especially bat, behaviour can alter and modulate the transmission of their parasites is still in the early stages.

Table 4. *Trypanosoma* sp. diversity in bats from Acre State, Amazon Biome

Genus	<i>T. cruzi</i> TcI	<i>T. cruzi</i> TcIV	<i>T. c. marinkellei</i>	<i>T. dionisii</i>	<i>Trypanosoma</i> sp. + <i>T. cruzi</i> DTU I	<i>T. cruzi</i> TcIV + <i>T. c. marinkellei</i>	<i>T. rangeli</i>	<i>Trypanosoma</i> sp.
<i>Carollia</i>	24			3	1		1	4
<i>Artibeus</i>	8	2	2	1			1	5
<i>Phyllostomus</i>	2		8			1		1
<i>Anoura</i>	1							
<i>Dermanura</i>	1							
<i>Glossophaga</i>	1	1						
<i>Lasiurus</i>	1							
<i>Hsunitycteris</i>	1							
<i>Lophostoma</i>			2					
<i>Plathyrrhinus</i>	1							
<i>Stumira</i>				1				1
<i>Tonatia</i>	1							
<i>Trachops</i>	2			1				
<i>Uroderma</i>	1							
<i>Vampyressa</i>	1							
Total	45	3	12	6	1	1	2	11

Phyllostomidae constitutes a diverse group that includes generalist feeders such as *Phyllostomus* sp. as well as specialist feeders such as the hematophagous bat species *Desmodus rotundus*, essentially frugivores bat species *Carollia perspicillata* and *Artibeus jamaicensis*, and nectarivorous *Glossophaga soricina*. Moreover, insectivory is part of the diet to a greater or lesser extent for most bats (Carrillo-Araujo *et al.* 2015). *Phyllostomus* sp. displayed a high infection rate (75%) by both *T. cruzi* and *T. c. marinkellei*, which were found in single and mixed infections, but *Trypanosoma* infection in this bat genera was only noted in SC. Although *C. pilosa* is considered the vector species of these two *Trypanosoma* species, also *Rhodnius* species may act as a vector based on it was successfully used in bat xenodiagnosis (Marinkelle, 1976; Garcia *et al.* 2012).

Carollia sp., which also displayed high *Trypanosoma* sp. infection rates, are considered resilient bats in terms of their diet (they feed on fruits and insects) and roosting sites, although they have also been described as understory specialists (Bernard, 2001). They live in colonies that may include hundreds of individuals that can be set in hollow trees, dense foliage, caves and tunnels, and they mainly forage at night. It is likely these bats acquire the *Trypanosoma* sp. infection in their roosting sites by ingesting triatomines or by the contaminative route because several of their roosting places are classical habitats of triatomines. This food and habit eclecticism in *Carollia* sp. probably explains the observation that this taxon not only had the highest rates of *T. cruzi* infection, but it also demonstrated a great diversity of *Trypanosoma* species that included *T. rangeli*, *T. dionisii* and at least one still-undescribed *Trypanosoma* species. Of note, we do not know if all trypanosomatids that could not be diagnosed at the species level constitute only a single species or include more than one species.

The diversity of *Trypanosoma* species that were found to infect bats from Acre state was astonishing, and further studies may reveal new aspects of *Trypanosoma* ecology and phylogeny. Additionally, *Carollia*, *Artibeus* and *Phyllostomus* were bat genera that also showed high rates of infection by a great diversity of *Trypanosoma* species. Concerning *T. cruzi* DTUs, bats were infected by TcI and TcIV, and both genotypes are associated with Chagas disease in the Amazon biome (Tables 3–4). In the infected bats, *T. cruzi* DTU TcI was found to infect all but two bat genera. This was an expected result because DTU TcI is ubiquitous in the transmission cycle of *T. cruzi* in the wild. *Lophostoma* sp. and *Sturnira* sp., two bat genera that were not infected by *T. cruzi*, harboured *T. c. marinkellei* and *T. dionisii*, respectively. The number of individuals of these two genera was very low, at only 3 and 2, respectively, and they were only collected in SC – the pristine vegetation area. Both Phyllostomidae and *Sturnira* are considered very abundant bat genera. Additionally, *Lupinus silvicola* is considered an abundant bat species. This species has a unique habitat because it is able to prepare and roost in cavities of active termite nests (Dechmann *et al.* 2004).

In addition to Marinkelle's seminal description of *T. rangeli* infection in bats (Marinkelle, 1976), there are only a few reports of infection by this taxon in chiropterans. *Trypanosoma rangeli* infecting *Artibeus planirostris* and *Platyrrhinus lineatus* bats was described by Maia da Silva *et al.* (2009) in central Brazil. Moreover, the authors observed a new lineage of *T. rangeli* in *P. lineatus* that was named lineage E. Here, we expand the occurrence area of lineage A of *T. rangeli* in bats to the northern region of Brazil, i.e. the Amazon biome. This lineage is widely distributed and infects many mammalian host species; therefore, it would be expected to be found in bats from other biomes. It is interesting to note that the two isolates of *T. rangeli* were obtained from two bats (*C. perspicillata* and *A. planirostris*) of the best-preserved area (SC), where the diversity of bats and trypanosomes was higher. The sequence analysis grouped one isolate from a

C. perspicillata (LBT 7063) between *T. wauwau* and *Trypanosoma* sp. RMNO, described in *Pteronotus* and *Tracops cirrhosus* bats in northern Brazil (Lima *et al.* 2015; da Costa *et al.* 2016). This result demonstrates that another trypanosome species is circulating in neotropical bats from Acre, reinforcing how little is known about the trypanosome diversity that circulate among bats. Even if it is an apparently well-preserved urban forest, the PZ area already shows a loss of bat and *Trypanosoma* sp. diversity, as demonstrated by the lower number of bat species captured and lower diversity of *Trypanosoma* species (Table 2).

The Trypanosomes that did not grow in culture media or presented with non-sustainable growth give a clue about how much remains to be known about the realm of bat trypanosomes without considering the trypanosomes that are not cultivable. In fact, there is still much to uncover about the assemblage of extant *Trypanosoma* species, their biology and ecology.

One phenomenon that is ripe for a thorough re-evaluation is host specificity in Trypanosomatids. It has been increasingly observed that numerous genotypes and species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) are far more eclectic with respect to their hosts. This is the case for Tcbat, a *T. cruzi* genotype that was exclusively associated with bats but has already been observed to infect humans (Ramírez *et al.* 2014), and for *T. dionisii*, a species of the subgenus *T. (Schizotrypanum)* that is usually associated with bats and has been detected in the cardiac tissue of a human individual who died from Chagas disease (Dario *et al.* 2016). Beyond parasites of medical or veterinary interest, trypanosomes are a fascinating model of the parasite–host interaction that constantly challenges and surprises us.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182017001834>

Acknowledgements. We acknowledge all people involved in the cooperation agreement between Oswaldo Cruz Institute and Acre Federal Institute as well as the Biologia Parasitária Post Graduation Program. The authors also thank Carlos Ardé and Marcos Antônio dos Santos Lima for technical support with the hemocultures, Dr Alena Iniguez for the molecular characterization using V7V8 primer pairs, and the professionals from the laboratories of Tripanosomatid Biology and Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals, Oswaldo Cruz Institute, who assisted us in the field expeditions.

Financial support. Cooperation agreement between IOC/FIOCRUZ and IFAC, CNPq (Edital Universal 2014 and PAPES/FIOCRUZ VII). ALRR is a 'Jovem Cientista do Nosso Estado' provided by FAPERJ. AMJ is a 'Cientista do Nosso Estado', provided by FAPERJ and financially supported by CNPq (Bolsista de Produtividade, nível 1', CNPq).

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Barbosa AD, Mackie JT, Stenner R, Gillett A, Irwin P and Ryan U (2016) *Trypanosoma teixeirae*: a new species belonging to the *T. cruzi* clade causing trypanosomiasis in an Australian little red flying fox (*Pteropus scapulatus*). *Veterinary Parasitology* 223, 214–221.
- Bernard E (2001) Vertical stratification of bat communities in primary forest of Central Amazon, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 17, 115–126.
- Bernard E, Tavares VC and Sampaio E (2011) Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. *Biota Neotropica* 11, 35–46.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, Paiva F, Milder RV, Teixeira MM and Camargo EP (2013) Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae) a genus of insect parasites associated with flies. *Protist* 164, 129–152.
- Botero A, Cooper C, Thompson CK, Clode PL, Rose K and Thompson RCA (2016) Morphological and Phylogenetic Description of *Trypanosoma noyesi* sp. nov.: An Australian Wildlife Trypanosome within the *T. cruzi* Clade. *Protist* 167, 425–439.

- Burland TG (2000) DNASTAR's lasergene sequence analysis software. In Misener S and Krawetz SA (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols*, vol. 132, Methods in Molecular Biology, Tonada, USA: Humana Press, pp. 71–91.
- Carrillo-Araujo M, Taş N, Alcántara-Hernández RJ, Gaona O, Schondube JE, Medellín RA and Falcón LI (2015) Phyllostomid bat microbiome composition is associated to host phylogeny and feeding strategies. *Frontiers in Microbiology* 6, 447.
- Coura JR and Junqueira ACV (2015) Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon Basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. *Acta Tropica* 151, 51–57.
- Coura JR, Albajar-Viñas P and Junqueira ACV (2014) Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109, 856–862.
- da Costa AP, Nunes PH, Leite BHS, Ferreira JIGDS, Tonhosolo R, da Rosa AR and Marcili A (2016) Diversity of bats trypanosomes in hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. *Acta Tropica* 164, 185–193.
- Dario MA, Rodrigues MS, da Silva Barros JH, das Chagas Xavier SC, D'Andrea PS, Roque ALR and Jansen AM (2016) Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites & Vectors* 9, 477.
- Dechmann DKN, Kalko EKV and Kerth G (2004) Ecology of an exceptional roost: energetic benefits could explain why the bat *Lophostoma silvicolum* roosts in active termite nests. *Evolutionary Ecology Research* 6, 1037–1050.
- Díaz MM, Aguirre LF and Barquez RM (2011) *Clave de Identificación de los Murciélagos del Cono sur de Sudamérica*. Cochabamba, Bolivia: Centro de Estudios en Biología Teórica y Aplicada.
- Fenton MB and Simmons NB (2015) *Bats, A World of Science and Mystery*. Chicago, USA: The University of Chicago Press.
- García L, Ortiz S, Osorio G, Torrico MC, Torrico F and Solari A (2012) Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome B sequence and minicircle analyses. *PLoS ONE* 7, e36578.
- Gardner AL (1979) Feeding habits. In Baker RJ, Jones J, Knox J and Carter DC (eds). *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae. Part II*. Lubbock, USA: The Museum Texas Tech University, pp. 293–350.
- Gardner AL (2007) Order Chiroptera. In Gardner AL (ed.). *Mammals of South America: Volume 1 Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. Chicago, USA: University of Chicago Press, pp. 187–498.
- Hamilton PB, Cruickshank C, Stevens JR, Teixeira MMG and Mathews F (2012) Parasites reveal movement of bats between the new and old worlds. *Molecular Phylogenetic Evolution* 63, 521–526.
- Hoorn C, Wesselingh FP, Ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J and Jaramillo C (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330, 927–931.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874.
- Lima L, Da Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M and Teixeira MM (2012) Evolutionary insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist* 163, 856–872.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M and Teixeira MM (2013) *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasites & Vectors* 6, 1.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana M Jr., Pavan AC and Carranza JC (2015) New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasites & Vectors* 8, 657.
- Luis AD, Hayman DT, O'Shea TJ, Cryan PM, Gilbert AT, Pulliam JR, Mills JN, Timonin ME, Willis CK, Cunningham AA, Fooks AR, Rupprecht CE, Wood JL and Webb CT (2013) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280, 20122753.
- Maiá da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana M Jr, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, Paiva F, Nunes VL, Camargo EP and Teixeira MM (2009) *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica* 109, 199–207.
- Marinkelle CJ (1976) The biology of the trypanosomes of bats. In Lumsden WHR and Evans DA (eds). *Biology of the Kinetoplastida*. New York, USA: Academic Press, pp. 175–216.
- Molyneux D.H. (1991) Trypanosomes of bats. In Kreier JP and Baker JR (eds). *Parasitic Protozoa*. London, UK: Academic Press, pp. 195–223.
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J and Holz P (1999) A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *International Journal for Parasitology* 29, 331–339.
- Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC and Parra E (2014) First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses and Public Health* 61, 477–479.
- R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing, Reference Index Version 2.11.1 (2010-05-31)*. Vienna, Austria: The R Foundation for Statistical Computing.
- Rojas D, Vale A, Ferrero V and Navarro L (2011) When did plants become important to leaf-nosed bats? Diversification of feeding habits in the family Phyllostomidae. *Molecular Ecology* 20, 2217–2228.
- Stoner KE (2000) Leaf selection by the tent-making bat *Artibeus watsoni* in *Asterogyne martiana* Palms in Southwestern Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology* 16, 151–157.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E and Macedo AM (1999) Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammal hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica* 72, 203–212.
- Wilkinson GS and South JM (2002) Life history, ecology and longevity in bats. *Aging Cell* 1, 124–1131.
- Wilkinson GS, Carter GG, Bohn KM and Adams DM (2016) Non-kin cooperation in bats. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371, 20150095.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG and Sturm NR (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological, relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* 12, 240–253.