



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**
CENTRO DE ESTUDOS
SUPERIORES DE CAXIAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS – CESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE, AMBIENTE E
SAÚDE - PPGBAS**

Katione Valéria Amorim de Sousa Cardozo

**COMPLEXO *Artibeus* Leach, 1821 (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DE
OCORRÊNCIA NOS BIOMAS CERRADO E AMAZÔNIA MARANHENSES**

CAXIAS/MA

2017

KATIONE VALÉRIA AMORIM DE SOUSA CARDOZO

COMPLEXO *Artibeus* Leach, 1821(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DE
OCORRÊNCIA NOS BIOMAS CERRADO E AMAZÔNIA MARANHENSES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Maria Claudene Barros-CESC/UEMA

CAXIAS/MA

2017

C268c Cardozo, Katione Valéria Amorim de Sousa

Complexo Artibeus leach, 1821 (chiroptera: phyllostomidae) de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses / Katione Valéria Amorim de Sousa Cardozo. __Caxias-MA: UEMA, 2017.

75f.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Claudene Barros.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

1. Identificação. 2. Morfologia. 3. Marcadores 4. Raiva. I. Cardozo, Katione Valéria Amorim de Sousa. II. Título.

CDU 599.4

COMPLEXO *Artibeus* Leach, 1821(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DE
OCORRÊNCIA NOS BIOMAS CERRADO E AMAZÔNIA MARANHENSES

Katione Valéria Amorim de Sousa Cardozo

APROVADO EM: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Claudene Barros – Orientadora
Doutorado em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Maranhão – CESC/UEMA

Prof. Dr Fabio Barros Brito
Doutorado em Biologia Celular e Molecular
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr Elmary da Costa Fraga.
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual do Maranhão CESC/UEMA

*A todos que me apoiaram em especial á minha
família, com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me capacitar para a realização desse trabalho;
A Universidade Estadual do Maranhão por propiciar o Programa de Mestrado em Biodiversidade, Ambiente e Saúde;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde;

Agradeço a minha orientadora, Claudene Barros, pela oportunidade concedida, aprendizado proporcionado, paciência, disponibilidade e por ter acreditado no meu potencial;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Ambiente e Saúde, em especial ao Professor Dr. Elmary Fraga, pelas excelentes contribuições ao longo do curso, aos demais por terem contribuído com a minha formação;

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA - GENBIMOL pelo suporte;

Aos meus companheiros e amigos do grupo de pesquisa, carinhosamente chamados de “morcególogos”, Samira Brito, Marcia Mascarenhas, Priscilla Olímpio, Amanda Cristina, Cleisson Luís, Marcelo Ventura, Fábio Henrique, Tiago Reis, e aos demais, Walna Micaelle, Maria Histelle, Marcelo Almeida, Andreлина Alves, Daiane Nascimento, sem vocês eu não conseguiria desenvolver os trabalhos laboratoriais pertinentes a pesquisa, vocês foram “luzes” no meu caminho, meus sinceros agradecimentos;

Aos colegas e companheiros de luta da turma do PPGBAS, por todo o apoio em cada fase importante que passei no mestrado, companheirismo e pela troca de experiências;

Ao pós - doutorando, Dr. Bruno Augusto Torres Parahyba Campos, que contribuiu nas coletas e análises dos dados, também por se mostrar sempre solícito em auxiliar;

A FAPEMA pela concessão financeira que auxiliou nas coletas tornando possível a realização do projeto;

À Agência Estadual de Defesa agropecuária do Maranhão – AGED, e toda sua equipe pelo auxílio prestado nas coletas;

A Prefeitura Municipal de Timbiras- MA, através da Secretaria de Educação, por permitir a licença para estudo do Mestrado.

À minha família, em especial ao meu pai, Bartolomeu Lima de Sousa, e mãe, Maria do Socorro Amorim de Sousa, minhas filhas Isabella e Isadora, que sempre foram motivação e razão para meu crescimento, ao esposo Joubert Cardozo, por estar sempre ao meu lado me dando todo o carinho e suporte necessário. Aos irmãos maravilhosos, Katia Cilene, Dione

Maria, Kassiane Mykaelle, Maurício Henrique, Marco Roberto e Marcio Amorim, pelo exemplo e apoio.

A todos aqueles que de forma direta e indireta me acompanharam nessa caminhada em busca de mais conhecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representantes de morcegos do gênero <i>Artibeus</i> . Em (A) <i>Artibeus lituratus</i> ; (B) <i>Artibeus planirostris</i> ; (C) <i>Artibeus fimbriatus</i> ; ((D) <i>Artibeus obscurus</i>	16
Figura 2. Diferenças entre espécies do Gênero <i>Artibeus</i> em relação às folhas nasais. A Esquerda <i>Artibeus fimbriatus</i> com a borda inferior da folha nasal soldada ao lábio superior. À direita em <i>Artibeus planirostris</i> a borda inferior da folha nasal é livre	17
Figura 3. Pontos de coleta das amostras de <i>Artibeus</i> nos biomas Amazônia legal e Cerrado no estado do Maranhão	23
Figura 4. Morfologia Craniana de <i>A. lituratus</i> , <i>A. obscurus</i> , <i>A. planirostris</i> e <i>A. fimbriatus</i> e crista cranial evidente e, formato triangular do pós-orbital nestas espécies	28
Figura 5. Variáveis canônicas das variáveis morfométricas das espécies de <i>Artibeus</i> estudadas no Estado do Maranhão	31
Figura 6. Variáveis canônicas das variáveis cranianas das espécies de <i>Artibeus</i> estudadas no Estado do Maranhão	32
Figura 7. Árvore filogenética pelo método Máxima Verossimilhança para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene COI. <i>A.lit</i> = <i>A. lituratus</i> ; <i>A.fimb</i> = <i>A. fimbriatus</i> ; <i>A. plan</i> = <i>A. planirostris</i> ; <i>A. obsc</i> = <i>A. obscurus</i> . Cx = Caxias; CM = Cândido Mendes; Tu = Turiaçú; Cr = Carutapera; GV = Godofredo Viana. Os valores corresponde ao <i>bootstrap</i> de Máxima verossimilhança, Máxima parcimônia e Agrupamento de vizinhos da esquerda para a direita.	34
Figura 08. Árvore filogenética pelo método Máxima Verossimilhança para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene RNA 16S. <i>A.lit</i> = <i>A. lituratus</i> ; <i>A.fimb</i> = <i>A. fimbriatus</i> ; <i>A. plan</i> = <i>A. planirostris</i> ; <i>A. obsc</i> = <i>A. obscurus</i> . Cx = Caxias; CM = Cândido Mendes; Tu = Turiaçú; Cr = Carutapera; GV = Godofredo Viana. Os valores corresponde ao <i>bootstrap</i> de Máxima verossimilhança, Máxima parcimônia e Agrupamento de vizinhos da esquerda para a direita	37
Apêndice A- Área de coleta nos Biomas Cerrado e Amazônia Maranhenses	57
Apêndice B- Arqueamento das redes de neblinas na área de coleta	58
Apêndice C- Morcegos capturados em redes de neblina	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Municípios e localização da área de estudo	22
Tabela 2 Espécies, caracteres, biomas e números de espécimes do gênero <i>Artibeus</i> procedentes na área de estudo.....	27
Tabela 3 Medidas de alguns caracteres morfológicos das espécies estudadas. Em cada célula a linha superior apresenta a média \pm desvio padrão e a linha inferior os valores mínimos e máximos (entre parênteses).....	27
Tabela 4 Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado para medidas morfométricas. (Comum = R - quadrado múltiplo) valores amostrados $> 0,7$	28
Tabela 5. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado para medidas cranianas (Comum = R - quadrado múltiplo) valores amostrados $> 0,7$	29
Tabela 6. Análise da função discriminante de 28 variáveis craniométricas e morfométricas de <i>Artibeus</i> do estado do Maranhão	30
Tabela 7 Coeficiente padronizado para variáveis canônicas dos caracteres avaliados que mais contribuíram para função discriminante	30
Tabela 8 Similaridade de sequencias obtidas das espécies do Gênero <i>Artibeus</i> do Maranhão com as disponíveis na plataforma BOLDSystems	33
Tabela 9 Percentual de divergência nucleotídica gerada para o gene COI para as espécies do Gênero <i>Artibeus</i>	35
Tabela 10 Matriz de divergência nucleotídica gerada através do algoritmo Tamura Nei a partir de gene rRNA 16 S para as espécies do complexo <i>Artibeus</i> de ocorrência no Maranhão	38
Tabela 11. Condição de PCR para isolamento dos genes rRNA 16S e COI	61

LISTA DE ABREVIACOES

Ant. E- Antebraço esquerdo

Ant. D- Antebraço direito

Po- Polegar

III Me- Terceiro Metacarpo

1a Fal- Primeira falange

2a Fal- Segunda falange

IV Me- Quarto Metacarpo

1a Fal- Primeira Falange

2a Fal- Segunda Falange

V Me- Quinto Metacarpo

1a Fal- Primeira falange

2a Fal- Segunda falange

Ti- Tíbia

Uro. Alt- Uropatgio Altura

Uro. Comp- Uropatgio comprimento

Ct- Comprimento total

Cc- Comprimento côndilo-canino

B- Comprimento basal

Cpt- Comprimento palatal

C-M2/3S- Comprimento da série de dentes superiores

C-M2/3I- Comprimento da série de dentes inferiores

Cm- Comprimento da mandíbula

Lc- Largura externa dos *cingula*-caninos

Lm- Largura externa dos molares

Li- Largura interorbital

Lp- Largura posorbitria

Lcx- Largura da caixa craniana

Lmt- Largura mastóidea

Lpt- Largura palatal

Acx- Altura da caixa craniana

Ao- Altura do occipital

CC+Inc- Comprimento do crânio até os incisivos

Cca-PMO- Comprimento do canino ao processo mastóideo oposto

CNaFo- Comprimento do nasal ao forâmen

LBTiL- Largura bula timpânica porção mais larga

LBTPP- Largura bula timpânica na porção mais próxima

DInCa- Distância entre incisivo e os caninos

BcCs- Altura da base do crânio a crista sagital

RESUMO

COMPLEXO *Artibeus* Leach, 1821(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) DE OCORRÊNCIA NOS BIOMAS CERRADO E AMAZÔNIA MARANHENSES

Os Morcegos do gênero *Artibeus* pertencem a ordem Chiroptera, família Phyllostomidae. Estes apresentam problemas taxonômicos referentes à sua identificação, sendo motivo de grandes controvérsias. No presente trabalho foram utilizadas análises morfométricas, craniométricas e moleculares das espécies do complexo *Artibeus* de ocorrência nos Biomas Cerrado e Amazônia maranhenses com objetivo de inferir sobre incertezas taxonômicas, distribuição geográfica, bem como, verificar a ocorrência do vírus rábico nestas espécies. Nas análises, morfométricas e craniométricas foram investigados um total de 38 marcadores fenotípicos, dessa forma, foram obtidas medidas de caracteres externos (n=14) e cranianos (n=25) em 39 espécimes. Os resultados das medidas foram submetidos a análises estatísticas no software Statistic (análises discriminantes) para selecionar os melhores caracteres que separam as espécies. Esta discriminação entre a média das variáveis foram calculadas pelo método Stepwise. As medidas das variáveis morfológicas que mais contribuíram para a discriminação, foram o comprimento do antebraço (Ant.E e Ant.D), o terceiro e quarto metacarpo (III e IV Me). Para os caracteres cranianos as principais variáveis que discriminam as espécies foram o comprimento total do crânio (Ct), da série de dentes superiores (CM2/3S), o comprimento do côndilo canino (Cc), a largura externa dos molares (Lm) e a largura da caixa craniana (Lcx), a que menos contribuiu foi a largura interorbital (Li). A análise craniana mostrou formato triangular do pós-orbital e uma crista cranial evidente. A análise canônica das variáveis cranianas separou as espécies e mostrou *A. obscurus* bem separada das demais espécies. Os genes citocromo oxidase I (COI) e rRNA 16S foram amplificados via PCR a partir do DNA total e em seguida realizou-se o sequenciamento. Para análise dos dados genéticos foram utilizados os softwares: BIOEDIT, DNAsp e MEGA. As sequencias do gene COI foram plotadas na plataforma *Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems)* e do gene rRNA 16S na plataforma *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. Verificou-se incongruências entre a identificação morfológica e molecular de algumas espécies, a exemplo de *A. lituratus* Olfers, 1818 (CESC 114, RRM 71) que mostrou 100% de similaridade com *A. planirostris* Spix, 1823 e uma baixa divergência, alcançando apenas 2,9 e 1,7% respectivamente; *A. fimbriatus* Gray, 1838 (CESC 125) apresentou 100% de similaridade com *A. lituratus* e divergência de apenas 1,8%; *A. obscurus* Schinz, 1821 (RRM29) mostrou 99,69% de similaridade com *A. planirostris* e alcançou 2,0% de divergência. Para *A. obscurus* (RRM29) e *A. planirostris* foi encontrado divergência de apenas 0,8 % para o gene RNA 16S. As árvores filogenéticas geradas independentes do gene mostraram monofilia para as espécies do gênero *Artibeus* de ocorrência nos dois biomas maranhenses. Os resultados das análises morfológicas mostraram a ocorrência de *A. lituratus*, *A. fimbriatus*, *A. obscurus* e *A. planirostris* para o Bioma Cerrado, no entanto a molecular aponta apenas as espécies *A. lituratus*, *A. obscurus* e *A. planirostris* para este bioma. Para o bioma amazônico independente do caractere não houve registro da espécie *A. fimbriatus*. Fez-se o Teste de Imunofluorescência Direta para verificação da presença ou ausência do vírus da raiva que revelou resultados negativos para todos os espécimes analisados, confirmando a ausência do vírus.

Palavras-Chave: Identificação, Morfologia, Marcadores moleculares, Raiva.

ABSTRACT

COMPLEX *Artibeus* Leach, 1821 (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE) OF OCCURRENCE IN CLOSED BIOMAS AND AMAZON MARANHENSES

Bats of the genus *Artibeus* belong to the order Chiroptera, Phyllostomidae family. These present taxonomic problems related to their identification, being the cause of great controversy. In the present work, morphometric, craniometric and molecular analyzes of the species of the *Artibeus* complex occurring in the Cerrado and Amazonia Maranhenses Biomes were used in order to infer about taxonomic uncertainties, geographic distribution, as well as to verify the occurrence of the rabies virus in these species. In the analysis, morphometric and craniometric were investigated a total of 38 phenotypic markers thus external measurements were obtained characters (n = 14) and brain (n = 25) in 39 specimens. The results of the measurements were submitted to statistical analysis in the Statistic software (discriminant analyzes) to select the best characters that separate the species. The discrimination between the averages of the variables were calculated by Stepwise method. Of the morphological variables, the length of the forearm (Ant.E and Ant.D), the third and fourth metacarpal (III and IV Me) were the main contributors to the discrimination. For the cranial characters the main variables that discriminated the species were the total length of the cranium (Ct), the series of upper teeth (CM2/3S), the length of the canine condyle (Cc), the external width of the molars (Lm) and the width of the cranial box (Lcx), the one that contributed least was the interorbital width (Li). The cranial analysis showed triangular shape of the post-orbital and an evident cranial crest. The canonical analysis of the cranial variables separated the species and showed *A. obscurus* well separated from the other species. The cytochrome oxidase I gene (IOC) and 16S rRNA were amplified by PCR from total DNA and after sequencing was performed. For the analysis of genetic data, the following software were used: BIOEDIT, DNAsp and MEGA. The COI gene sequences were plotted on the Barcode of Life Data Systems (BOLD Systems) platform and the 16S rRNA gene on the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) platform. There were incongruities between the morphological and molecular identification of some species, such as *A. lituratus* (CESC 114, RRM 71) that showed 100% similarity with *A. planirostris* and a low divergence reaching only 2.9 and 1.7 % respectively; *A. fimbriatus* (CESC 125) 100% similarity with *A. lituratus* and the divergence reached of only 1.8% and *A. obscurus* (RRM29) with 99.69% similarity with *A. planirostris* reached 2.0%. For *A. obscurus* (RRM29) and *A. planirostris* a divergence of only 0.8% was found for the 16S RNA gene. The phylogenetic trees generated independently of the gene showed monophyly for the species of the genus *Artibeus* of occurrence in the two biomes of Maranhão. The results of the morphological analyzes showed the occurrence of *A. lituratus*, *A. fimbriatus*, *A. obscurus* and *A. planirostris* for the Cerrado biome, although the molecular species only indicates *A. lituratus*, *A. obscurus* and *A. planirostris* species for this biome. For the Amazonian biome, independent of the character there was no record of the species *A. fimbriatus*. The Direct Immunofluorescence Test was performed to verify the presence or absence of the rabies virus, which revealed negative results for all the analyzed specimens, confirming the absence of the virus.

Key words: Identification, Morphology, Molecular markers, Rabies

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aspectos gerais da Ordem Chiroptera	14
1.2 Família Phyllostomidae	15
1.3 Gênero <i>Artibeus</i>	16
1.3.1 Problemática Taxonômica do gênero <i>Artibeus</i>	17
1.4 Características Morfométricas e Craniométricas	18
1.5 Ferramenta Molecular	19
1.6 Biomas Maranhenses	19
1.7 Virologia	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Obtenção das Amostras	22
3.2 Técnicas Morfométricas e Craniométricas	24
3.3 Análises Morfométricas e craniométricas	25
3.4 Técnicas Moleculares	25
3.5 Análises Genéticas	25
3.6 Técnica de Imunofluorescência Direta	26
4 RESULTADOS	26
4.1 Análises Morfológicas e Craniométricas.....	26
4.2 Análises Estatísticas	28
4.3 Análises Moleculares	32
4.4 Vírus Rábico em morcegos do Gênero <i>Artibeus</i>	37
5 DISCUSSÃO	39
5.1 Abordagem morfológica	39
5.2 Abordagem molecular a parti do gene COI e RNA 16S	42
5.3 Abordagem sobre a transmissão do vírus rábico nas espécies do gênero	44
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Ordem Chiroptera

O Brasil é um país considerado rico em biodiversidade com sua fauna bem representada por mamíferos, ocorrendo 710 espécies, 243 gêneros, 50 famílias e 12 ordens, sendo as mais especiosas Rodentia e Chiroptera, com respectivamente 34,7% e 24,8% (REIS et al., 2011). Os morcegos pertencem a ordem Chiroptera, o nome provém do grego, “Cheir” (mão) e “Ptero” (asa), indicando que as asas dos morcegos são mãos altamente modificadas (REIS et al., 2013). Entre os mamíferos são os únicos a possuírem capacidade de vôo verdadeiro e a maioria de suas espécies são ativos a noite, com exceção do grupo das raposas-voadoras, que inclui muitas espécies diurnas (REIS et al., 2007).

A fauna mundial de morcegos engloba 1.300 espécies, 202 gêneros e 18 famílias (VOIGHT e KINGSTON, 2016). No Brasil há nove famílias, 68 gêneros e 179 espécies registradas (NOGUEIRA et al., 2014, FEIJÓ et al., 2015). Entretanto, há uma total carência de estudos em cerca de 60% do território brasileiro e nenhum dos biomas encontram-se minimamente amostrados (BERNARD et al., 2011). Assim, os estudos sobre a atual diversidade de morcegos no Brasil ainda é uma estimativa, apesar de estar aumentando significativamente.

Estudos voltados para o conhecimento dos morcegos são de fundamental importância, considerando que participam ativamente na manutenção dos ecossistemas, conservação destes e dos remanescentes florestais, pois influenciam de forma direta nos ambientes em que atuam, ocupando os mais variados nichos ecológicos com uma diversidade que envolve desde espécies dispersoras de sementes, polinizadoras de plantas, predadoras de vertebrados e invertebrados até sanguívoros (FINDLEY, 1993). Assim são excelentes fontes de informações para o estudo da diversidade, pela sua abundância, e pela riqueza de espécies.

Os quirópteros estão associados a determinadas doenças de origens bacterianas, fúngicas, e virais (GREENHALL et al. 1983, HILL e SMITH 1986, CONSTANTINE,1988), assumindo um importante papel epidemiológico, incluindo a transmissão do vírus rábico (SCHNEIDER et al., 2009). Das 179 espécies registradas no Brasil, cerca de 41 já foram diagnosticadas com o vírus (SODRE et al., 2010), pois possuem características que os potencializam como transmissores do vírus rábico, dentre essas, estão a capacidade de vôo, o número elevado de indivíduos, a ampla distribuição geográfica, o comportamento em colônia, e a existência das espécies hematófagas (MESSENGER et al. 2003, CALISHER et al. 2006).

Os morcegos apresentam-se bem distribuídos, estão entre os grupos de mamíferos mais antigos e divergentes. Isso se deve a diversidade de habitats, hábito de vida e história

natural que refletem em distintas morfologias e levam a adaptações e diversificação do grupo acompanhado por mudanças comportamentais e fisiológicas (FREEMAN, 2000). Mostram-se complexos, na identificação das relações de parentesco baseados em caracteres que estejam envolvidos apenas com mecanismos adaptativos, como os morfológicos. Sendo assim, faz-se necessários o uso de outros caracteres que possam inferir quanto à resolução dessa problemática.

1.2 Família Phyllostomidae

Entre as famílias de morcegos neotropicais, a família Phyllostomidae é a que apresenta maior representatividade. As revisões taxonômicas apontam para 10 subfamílias, sendo elas: Macrotoninae, Micronycterinae, Desmodontinae, Phyllostominae, Lonchophyllinae, Rhinophyllinae, Stenodermatinae, Carollinae, Glyphonycterinae, Glossophaginae (DATZMANN et al., 2010) com 60 gêneros e cerca de 200 espécies reconhecidas (REIS et al., 2007, 2011; SOLARI et al., 2014; HURTADO et al., 2014). Característica marcante relacionada ao grupo é a presença de uma folha nasal, estrutura membranosa, localizada junto às narinas, que está relacionada à ecolocalização (biossonar), participando no direcionamento dos ultrassons que saem pelas narinas (NEUWEILER, 2000).

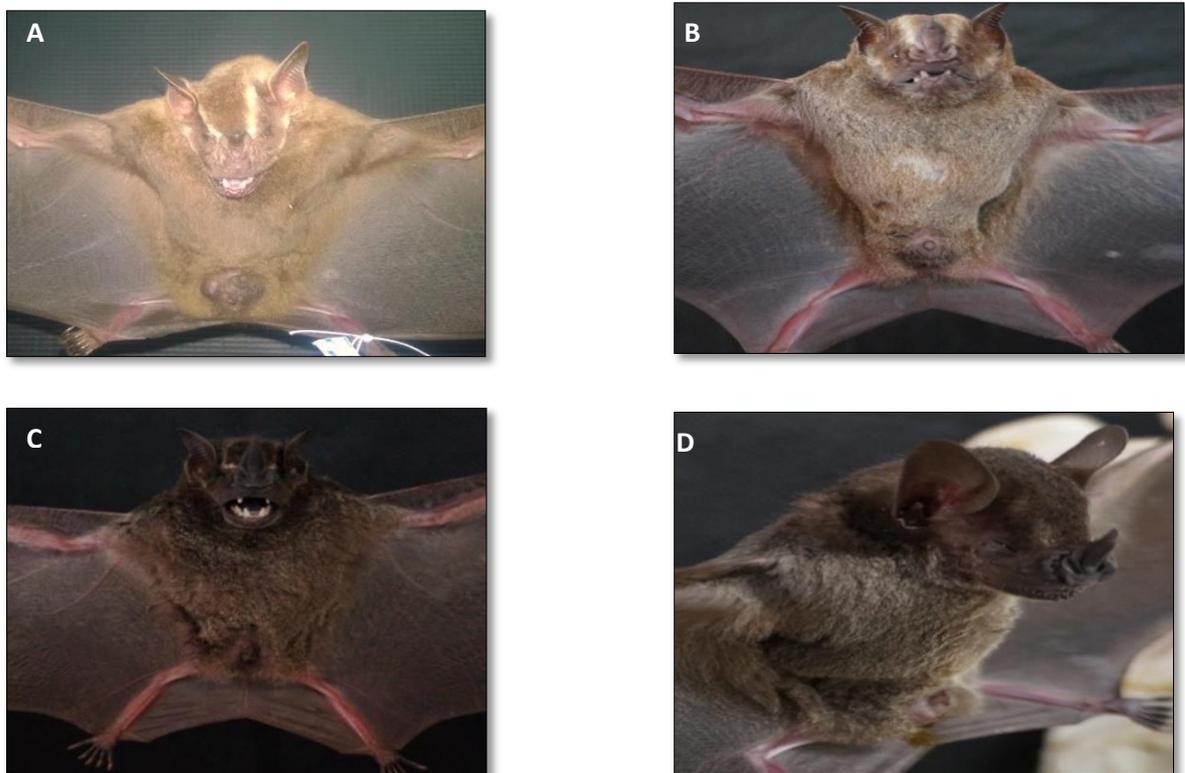
A diversidade de nichos ecológicos que a família Phyllostomidae pode estar associada é marcante, sendo frugívoros; nectarívoros; carnívoros; insetívoros; hematófagos, assim, constata-se que, o fato de possuírem grande mobilidade, plasticidade no uso de abrigos e diversidade de hábitos e itens alimentares, tornam-se capazes de transportar o vírus rábico para outras espécies em várias localidades por unidade de tempo (WOO et al. 2009). Os morcegos desta família assumem papel ecológico importante, pois atuam na dispersão de sementes e na polinização de muitas espécies vegetais, sendo responsáveis pela regeneração de áreas florestadas (BREDT et al.,1996).

As espécies representantes desta família são anatomicamente complexas apresentando formas bastante diversificadas, o que determina considerável confusão e desacordos em estudos sistemáticos e filogenéticos de alguns gêneros e espécies. Exibem diversidade de características morfológicas, tais características foram mencionadas por Freeman (2000) considerando rostrum, tamanho e variação morfológica dos dentes. O rostrum: fino, alongado, curto, largo; o tamanho: maiores e menores e a variação morfológica dos dentes relacionada a seus hábitos alimentares. Estes fatos, entre outros, tem sido fator primordial para estudar os filostomídeos.

1.3 Gênero *Artibeus*

Os morcegos do gênero *Artibeus* mostram-se bem distribuídos nas florestas neotropicais (LIM et al. 2004). É um dos gêneros mais numerosos (SIMMONS, 2005) com aproximadamente 18 espécies ocorrendo do México ao norte da Argentina (MARQUES AGUIAR, 2008). De acordo com Nogueira et al. (2014) em uma revisão da subfamília Stenodermatinae a qual pertence o gênero *Artibeus*, no Brasil ocorrem cinco espécies: *Artibeus concolor* (Peters, 1865), *Artibeus fimbriatus* (Gray, 1838), *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818), *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) e *Artibeus planirostris* (Spix, 1823) (Figura 1).

Figura 1. Espécies de morcegos do gênero *Artibeus*. Em (A) *Artibeus lituratus*; (B) *Artibeus planirostris*; (C) *Artibeus fimbriatus*; (D) *Artibeus obscurus*.



Fonte: GENBIMOL

Os morcegos do gênero *Artibeus* são frugívoro, de alimentação variada, importantes dispersores de sementes. (NOWAK, 1994; ZORTÉA e CHIARELLO, 1994; BREDET et al., 1996). Podem viver solitariamente ou abrigando-se em grupos com 8 a 10 indivíduos que se dispõem nos galhos de árvores (MUNÓZ-ROMO, 2006), emite sinais multi-harmônicos curtos, de banda larga e alta frequência e apresenta ecolocalização de frequência modulada (JENNINGS et al., 2004).

Os *Artibeus* são classificados na subfamília Stenodermatinae que é constituída de morcegos grandes e pequenos, com listras faciais evidentes, ou pouco perceptíveis, folha nasal de tamanho médio, uropatágio e cauda podem estar ausentes (REIS, 2013). Em *A. lituratus* e *A. fimbriatus*, espécies filogeneticamente próximas, a folha nasal apresenta-se especialmente evidente, diferenciando significativamente as duas espécies, sendo maior em *A. lituratus* o que permite identificar a morfologia da folha nasal como caráter taxonômico na identificação destas espécies (BARROS et al., 2002). Entretanto, a separação da margem inferior da folha nasal com lábio diferenciam *A. fimbriatus* de *A. planirostris* (Figura 2).

Figura 2: Diferenças entre espécies do gênero *Artibeus* em relação à folha nasal. A esquerda . *A. fimbriatus* com a borda inferior da folha nasal soldada ao lábio superior. À direita em *A. planirostris* com a borda inferior da folha nasal livre.



Fonte: GENBIMOL

1.3.1 Problemática Taxonômica do Gênero *Artibeus*

De acordo com Wetterer *et al* (2000) os *Artibeus* demonstram certa complexidade havendo desacordo no que se refere ao relacionamento entre as espécies deste táxon e a monofilia do grupo como um todo. Pois a grande sobreposição de caracteres externos leva ao diagnóstico equivocado de muitos indivíduos (DIAS e PERACCHI, 2008). Este gênero tem sido alvo de constantes debates entre os sistematas, pois quanto à distribuição nos subgêneros não há acordo (OWEN 1987, 1991; BUSSCHE et al., 1998; WETTERER et al., 2000). A taxonomia e a sistemática do gênero são extremamente complexas e tem sido motivo de grandes controvérsias (TADDEI, 1998). Há também muita discussão em nível específico.

Um problema abordado constantemente nos trabalhos sistemáticos do gênero está relacionado com o nível taxonômico de *A. planirostris*, que já foi considerada uma subspecie de *A. jamaicensis* (HANDLEY, 1987). Lim et al. (2004), baseados em estudos moleculares,

concluíram que *A. jamaicensis* e *A. planirostris* são entidades distintas (OWEN 1987; KOOPMAN 1993), restringindo a distribuição de *A. jamaicensis* ao norte do Rio Orinoco na Venezuela e estabelecendo que os exemplares encontrados ao sul do Rio Orinoco seriam na verdade *A. planirostris*. O autor também comparou sua filogenia molecular com as filogenias morfológica (MARQUES-AGUIAR, 1994) e morfométrica (GUERRERO et al., 2003).

As espécies *A. fimbriatus* e *A. lituratus* são espécies morfológicamente convergentes em vários aspectos e foram confundidas durante muito tempo em suas áreas de ocorrência. HANDLEY (1989) redescreveu *A. fimbriatus* diferenciando-a das demais espécies e forneceu informações sobre sua distribuição geográfica. Apesar dos numerosos esforços empregados na resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Artibeus*, a problemática persiste principalmente em relação à caracterização e variação geográfica das espécies brasileiras (TADDEI et al.1998). Segundo Tavares et al. (2008) o gênero necessita de uma revisão abrangente que inclua comparações com todas as formas geográficas, portanto, realizar a identificação apenas em campo torna-se inviável (TADDEI et al., 1998; DIAS e PERACCHI, 2008; ARAÚJO e LANGGUTH, 2010).

1.4 Características Morfométricas e Craniométricas

As medidas morfométricas e craniométricas permitem discriminar as espécies morfológicamente, principalmente espécies que possuem controvérsias em sua classificação, como as do gênero *Artibeus* (TADDEI, et al., 1998). A morfometria é utilizada pelos taxonomistas para mensurar medidas que possam diferenciar as espécies, criando referências para comparações (PERES-NETO, 1995). É usada para a identificação de populações de organismos, que podem assumir diferentes formas ou tamanhos, conforme o ambiente em que se desenvolvem. Constitui uma importante ferramenta no estudo da morfologia, pois pode detectar padrões de anomalias e variações tanto de tamanho quanto de forma (STÜPP DE SOUZA, 2008).

A craniometria é caracterizada como a mensuração do crânio, é definida como sendo uma técnica que determina a medição do crânio de maneira sistematizada universalmente. O que permite a avaliação comparativa entre estudos realizados por diferentes pesquisadores, que tem por finalidade a complementação da inspeção visual do crânio (cranioscopia) e permite o conhecimento das variabilidades morfológicas dos crânios animais (PEREIRA e ALVIM, 2006).

Estudo morfométricos e craniométricos em morcegos vem sendo realizados a fim de classificar e organizar as espécies que apresentam grandes similaridades no gênero e

subfamília (BAKER et al., 2002). Embora tenham sido realizados estudos sobre a anatomia craniana funcional em filostomídeos (FREEMAN, 1988, 1992; FREEMAN e WEINS, 1997) esse grupo permanece inexplorado do ponto de vista de descrição detalhada sobre a osteologia craniana. Cadrin (2000) sugere que a interação dos indivíduos com o ambiente pode produzir diferenças morfométricas dentro da mesma espécie ou aumentar estas diferenças entre diferentes espécies.

1.5 Ferramenta Molecular

Ferramentas moleculares, tanto em nível de família como em níveis taxonômicos menores acrescentam dados importantes que complementam a morfologia. Geger et al. (2014) destacam a importância de combinar características morfológicas e dados genéticos na identificação de espécies, já que alguns parâmetros podem variar geograficamente. Pesquisas têm mostrado que os marcadores moleculares têm sido utilizados em vários estudos com diferentes grupos de animais, visando a caracterização da variabilidade. Desta forma os dados moleculares podem trazer informações inestimáveis sobre as espécies de morcegos (OPREA, 2013).

Estudos em quirópteros com os genes mitocondriais rRNA 16S, rRNA 12S, Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e Citocromo b (Cyt b) por exemplo, têm proporcionado caracterização de espécies crípticas, identificação das espécies, estudos populacionais e relacionamentos filogenéticos (BURLAND e WILMER, 2001; BUSSCHE e HOOFER, 2004; MARTINS et al., 2009; OLIVEIRA, 2013). Dentre os genes mitocondriais o gene rRNA 16S é o mais conservado com baixas taxas de mutações, sendo bastante utilizado em estudos para a identificação e caracterização de espécies (COLEMAN, 2003; NAEGELE et al., 2006). O gene COI é um gene de evolução suficientemente rápida e por isso permite a discriminação de espécies que estão intimamente associadas (COX e HEBERT, 2001). Apresenta 1.551 pares de bases, dos quais 648 são consideradas como *barcoding* (MURAKAMI et al., 1998), possuindo vantagens na identificação de espécies, especialmente em espécies crípticas, tendo em vista que possui divergências intraespecíficas menores que as interespecíficas (HEBERT et al., 2003).

1.6 Biomas Maranhenses

A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e abriga uma grande diversidade biológica (HEYER et al., 1999; MAGURRAN, 2011). Ocupa aproximadamente 5,4 milhões de Km² e estende-se por oito países na América do Sul. A porção mais oriental do bioma

atinge o Estado do Maranhão que possui 81.208,40 km², representando 24,46% do território do Estado (IBGE, 2002).

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), pelo menos 147 espécies de morcegos ocorrem neste ambiente, das quais 46 são de ocorrência restrita ao bioma, representando 87 % da fauna conhecida para o país, no entanto, considerando a extensão deste bioma o conhecimento da diversidade de morcegos ainda é muito baixo (BERNARD et al., 2011) com a porção do Maranhão apresentando 21 espécies de morcegos registradas (CRUZ et al., 2007; BERNARD et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; REIS et al., 2011).

O Cerrado é a área florestal mais extensa da América do Sul e um dos 34 hotspots de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000, MITTER MEIER et al., 2004) ocupa mais de 200 milhões de hectares do território brasileiro abrigando um rico patrimônio de recursos naturais renováveis adaptados às duras condições climáticas, edáficas e hídricas que determinam sua própria existência. Desse total 38,8 milhões de hectares estão no Nordeste, tendo o Maranhão 43,3% da sua superfície coberta pelo cerrado. Este é o segundo maior bioma brasileiro concentrando um terço da biodiversidade nacional e 5% da flora e da fauna mundial (HOGAN et al., 2002; SAWYER, 2002).

Estudos relacionados com a distribuição e identificação das espécies do gênero *Artibeus* nos Biomas Cerrado e Amazônia maranhense são incipientes, para estudos moleculares não há registro, conseqüentemente esta pesquisa terá importância na identificação das espécies do complexo *Artibeus* nesses biomas e contribuirá com resolução das incertezas taxonômicas e sua real distribuição.

1.7 Virologia

A moléstia raiva já se fazia naturalmente presente em morcegos hematófagos na América do Sul antes da chegada dos europeus (HOLMES et al., 2002). O vampiro comum destaca-se, sobretudo, pela propagação da raiva parálitica entre os vertebrados, incluindo humanos, bem como pelos grandes prejuízos econômicos causados à pecuária (MÁLAGA-ALBA 1954, ACHA e MÁLAGA-ALBA 1988, FINDLEY 1993, BRASS 1994, BROWN 1994).

A raiva é uma encefalite (inflamação aguda no cérebro) causada por um vírus que pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae e ao gênero *Lyssavirus* (HANLON et al., 2005). A transmissão se dá pela inoculação do vírus presente na saliva e secreções do

animal agressor infectado, geralmente pela mordedura, mais raramente pela arranhadura e lambadura de mucosas (BRASIL, 2009). Os morcegos são considerados os únicos reservatórios naturais desse vírus, no entanto, podem contaminar outros organismos, como cães, gatos, bovinos, suínos, bubalinos, gambás, raposas, macacos, outros morcegos não hematófagos e seres humanos (UIEDA et al., 1995).

No Brasil, entre os anos de 2004 a 2013, com o sucesso das medidas de controle da raiva canina, os quirópteros passaram a responder pela transmissão de 70% dos casos de raiva humana (SCHNEIDER et al, 2009; OPAS, 2014). A ascendência dos morcegos na transmissão de raiva humana é atribuída, principalmente, a um surto ocorrido entre os anos de 2004 e 2005, nos Estados do Pará e Maranhão. Em 2004 os casos ocorreram nos municípios de Viseu e Portel no estado do Pará, em 2005 outro foco de raiva humana foi identificado em Godofredo Viana, Cândido Mendes, Carutapera e Turiaçu no Maranhão, resultando em um número elevado de óbitos (19 pessoas) com registro de 91,4% provocadas pela espécie hematófaga, *Desmodus rotundus* e 8,6% por espécies não hematófagas (OPAS, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza o uso das técnicas de identificação viral por meio da Imunofluorescência Direta (IFD) conforme descrita por Dean et al. (1996) e o isolamento viral que pode ser feito tanto “in vitro”, por meio dos cultivos celulares, como “in vivo”, por meio da Prova Biológica (PB) de inoculação em camundongos (KOPROWSKI, 1996). Ambos os testes devem ser usados, pois são considerados de alta sensibilidade e especificidade (MESLIN; KAPLAN, 1996).

A IFD é uma técnica bastante sensível e específica de baixo custo para realização e rápida obtenção dos resultados. Seu sucesso está intimamente relacionado à qualidade dos reagentes e conjugado e à experiência do examinador. Todavia é uma técnica que permite a análise de amostras de diversas origens que podem ser frescas, congeladas ou até glicerinizadas (DEAN et al., 1996).

Tendo em vista os relatos de casos de raiva ocorridos no estado do Maranhão, e a importância da enfermidade, este trabalho buscou estimar a presença/ausência do vírus rábico nas espécies de *Artibeus*, pois os morcegos agem como vetores da doença, e o vírus da raiva tem sido isolado de várias outras espécies não hematófagas com significativo impacto sobre humanos, rebanhos animais e outras espécies de morcegos (SCHNEIDER et al., 2009; AGUIAR e BRITO, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um levantamento das espécies do complexo *Artibeus* de ocorrência no Cerrado e Amazônia maranhenses dando ênfase a sistemática do grupo, bem como, verificar presença ou ausência dos vírus rábico nas populações.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar as espécies de morcegos do complexo *Artibeus* de ocorrência nos biomas, Cerrado e Amazônia maranhenses utilizando a morfologia, craniometria e marcadores moleculares;
- ✓ Realizar uma reavaliação dos caracteres diagnósticos das quatro espécies de grande porte do gênero *Artibeus*: *A. fimbriatus*, *A. lituratus*, *A. obscurus* e *A. planirostris* que ocorrem no Maranhão, Brasil;
- ✓ Obter medidas de caracteres morfológicos externos e cranianos dos espécimes coletados do gênero *Artibeus*;
- ✓ Inferir quanto as incertezas taxonômicas e a distribuição geográfica das espécies do complexo *Artibeus* de ocorrência nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses;
- ✓ Verificar a ocorrência do vírus rábico nas espécies do complexo *Artibeus* de ocorrência no Cerrado e Amazônia maranhenses.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras

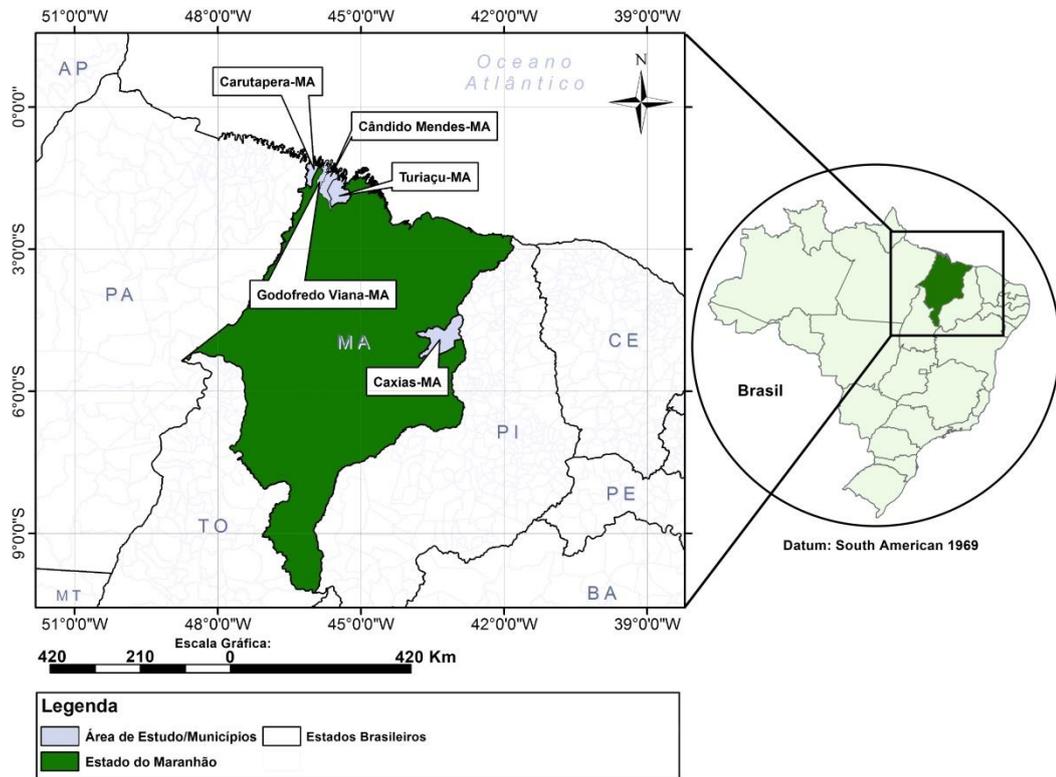
As coletas foram realizadas nos municípios maranhenses: Godofredo Viana; Turiaçu; Carutapera, Cândido Mendes e Caxias (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1. Municípios e localização da área de estudo.

MUNICÍPIOS	COORDENADAS
Carutapera	1° 12' 25" S e 46° 1' 54" W
Godofredo Viana	1° 24' 43" S e 45° e 46' 30" W
Cândido Mendes	1° 27' 21" S e 45° 43' 32" W
Turiaçu	1° 39' 36" S e 45° 22' 12" W
Caxias	4° 51' 32" S e 43° 21' 22" W

Fonte: IBGE, (2011)

Figura 3. Pontos de coleta das amostras de *Artibeus* nos biomas Amazônia e Cerrado no Estado do Maranhão.



Fonte: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2005)

Os morcegos foram coletados em seis expedições de três noites consecutivas em pontos específicos com duração de seis horas diárias (18:00 às 00:00 hs) a cada município. Foram utilizadas seis redes de neblina fixadas com auxílio de hastes e barbantes em cada um dos pontos. Estas foram dispostas perto de abrigos (casas ou árvores) em riachos ou em trilhas.

Foram coletados 39 espécimes, todos adultos, acondicionados em sacos de panos codificados. Em fichas foram anotados os seguintes dados: horário de coleta, data e local, nome dos coletores, código do saco de pano, nome da família, espécie, sexo e estágio reprodutivo. Os mesmos foram levados ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA (GENBIMOL) onde foram realizados os seguintes procedimentos laboratoriais: etiquetados, fotografados, ortotansados, pesados, medidos, retirada de tecidos encefálicos e musculares que foram armazenados em microtubos com álcool a 70%. As medidas foram realizadas através de um paquímetro digital, onde foram aferidas as medidas de: antebráço, orelha, trago, pés e cauda, visto que há variação na forma e no tamanho.

Para a conservação dos espécimes foi realizado um breve mergulho em álcool 90%, posteriormente injetado formol a 10% na cavidade abdominal e inserido um chumaço de

algodão na boca do animal para mantê-los de boca aberta para facilitar a identificação através da dentição. Em seguida, os morcegos foram recobertos com formol por sete dias. Após esse período os animais foram armazenados em um recipiente contendo álcool 70%. Os espécimes foram identificados com auxílio de bibliografia especializada (GREGORIN; TADDEI 2002; UIEDA et al., 2006; REIS et al., 2007; REIS et al., 2011; BRASIL, 2012; REIS et al., 2013). Este projeto faz parte de um projeto fomentado pela FAPEMA e licenciado pelo ICMBIO/SISBIO nº 42670-1 e 54384-1.

3.2 Técnicas Morfométricas e Craniométricas

A retirada craniana de cada espécime foi realizada através da abertura bucal e rebatimento da pele, seguida de limpeza, por meio manual e com o auxílio de larvas e adultos de insetos do gênero *Dermestes* (Coleoptera, Dermestidae). Depois de limpos, os crânios foram clareados com água oxigenada a 10%, levados à estufa à temperatura de 37°C para secagem, sendo numerados e acondicionados individualmente em frascos limpos. Todos os crânios foram mantidas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do CESC/UEMA

Foram aferidos um total de 14 medidas morfométricas e 25 craniométricas para as espécies do complexo *Artibeus*. Considerando Handley (1991); Marques Aguiar (1994); Taddei et al. (1998) utilizou-se os seguintes caracteres para diagnosticar as espécies: comprimento do pé (**Pé**); comprimento do antebraço esquerdo (**Ant E**) e do antebraço direito (**Ant D**), comprimento do polegar (**Po**); comprimento do III metacarpo (**III Me**); da 1ª falange do terceiro metacarpo (**1aFal- III**) da 2ª falange do terceiro metacarpo (**2aFal- III**); comprimento do IV metacarpo (**IV Me**); 1ª falange do quarto metacarpo (**1aFal- IV**), 2ª falange do quarto metacarpo (**2aFal- IV**); comprimento do V metacarpo (**V Me**); 1ª falange do quinto metacarpo (**1aFal- V**), e 2ª falange do quinto metacarpo (**2aFal- V**); comprimento da tíbia (**Ti**); comprimento total (**Ct**) do crânio; comprimento côndilo-canino (**Cc**); comprimento basal (**Cb**); comprimento palatal (**Cpt**); comprimento da série de dentes superiores (**CM2/3S**) e comprimento da série de dentes inferiores (**CM2/3I**); comprimento da mandíbula (**Cm**); Largura externa dos cingula-caninos (**Lc**); largura externa dos molares (**Lm**); largura interorbital (**Li**); largura posorbitária (**Lp**); largura zigomática (**Lz**); largura da caixa craniana (**Lcx**); largura mastóidea (**Lmt**); largura palatal (**Lpt**); altura da caixa craniana (**Acx**); altura do occipital (**Ao**); comprimento do crânio até o incisivos (**CInc**); comprimento do canino ao processo mastóideo oposto (**CaPMO**); comprimento do nasal ao forâmen (**NaFo**); largura bula timpânica porção mais larga (**LBTiL**); largura bula timpânica na porção

mais próximas (**LBTPP**); distância entre incisivo e o caninos (**DInca**); altura da base do crânio a crista sagital (**BcCs**); e comprimento basal (**B**). Para cada espécimes foram realizadas 14 medidas externas e 25 cranianas, adaptadas de Vizzoto e Taddei (1973), Martins (2008) e Andrade (2011), com auxílio de paquímetro manual e digital, com resolução de 0,1 mm.

3.3 Análises morfométricas e craniométricas

Os testes de suposições inerentes às bases estatísticas da análise multivariada foi realizada no software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 1993), pelo método “stepwise”, com utilização de medidas morfométricas e craniométricas, para determinar a contribuição de cada um dos caracteres, com o propósito de avaliar, através de análises multivariadas, a distinção entre as espécies e quais as medidas que mais contribuiriam para esta possível separação.

Foram realizadas análises canônicas discriminantes entre as amostras de cada uma das quatro espécies. Esta técnica maximiza a diferença entre os grupos e minimiza as diferenças dentro deles (REIS, 1988; REIS et al. 1990). A associação entre as variáveis foi testada pelo método de rotação ortogonal Varimax normalizado, que redistribuiu as variâncias dos primeiros fatores na busca de um padrão mais simples.

A análise discriminante foi realizada para calcular as distâncias entre os grupos baseadas na Matriz de Distância de Mahalanobis (MD) que permite calcular distâncias entre duas populações normais. Este tipo de análise permite que, além da variância na amostra, a covariância seja identificada e avaliada (MAHALANOBIS 1936; MANLY, 2008). A análise canônica também foi realizada para resumir a maior parte da informação original a um número mínimo de fatores em todos os grupos amostrais e originou um gráfico de dispersão das populações.

3.4 Técnicas Moleculares

O DNA total foi isolado de amostras de tecido muscular utilizando-se o protocolo Wizard® Genomic DNA Purification Kit-Promega seguindo as orientações do fabricante. Foram realizadas à amplificação de fragmentos dos genes mitocondriais, COI e rRNA 16S através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se primers específicos descritos por Folmer et al. (1994) e Palumbi et al. (1991) respetivamente. Em seguida foi realizado o sequenciamento em um sequenciador automático de DNA ABI 3.500 (AppliedBiosystems) no GENBIMOL (ANEXO I).

3.5 Análises Genéticas

Para o alinhamento das sequências de DNA foi utilizado o programa Bioedit (HALL, 1999) utilizando a ferramenta ClustalW. Para análises de distâncias evolutivas e relações de parentesco foi utilizado o programa MEGA 7.0 (KUMAR, STECHER e TAMURA 2016). Foram construídas árvores filogenéticas usando diferentes métodos: Agrupamento de Vizinhos (Neighbor Joining - NJ), Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP) com o algoritmo Tamura-Nei, selecionado pelo programa MEGA, como o modelo mais simples para medir a distância evolutiva entre as sequencias. A estimativa de significância dos agrupamentos foi verificada pela análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Para verificação do número de haplótipos foi utilizado o programa DnaSP 4.10 (ROZAS et al., 2003). Para a identificação correta da espécie e análise de similaridade foram usadas as plataformas *BOLD Systems v3 (The Barcode of Life Data Systems - www.barcodinglife.org)* e *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*. Como grupo externo (*outgroup*) foram usadas as sequências da espécie *Molossus molossus*.

3.6 Técnica de Imunofluorescência Direta

A técnica de imunofluorescência direta foi realizada para o diagnóstico do vírus da raiva seguindo o protocolo utilizado no Laboratório de virologia CCA/UEMA (ANEXO II).

4 RESULTADOS

4.1 Análises Morfométricas e Craniométricas

Nesse estudo 39 espécimes pertencentes ao gênero *Artibeus* foram registrados para os dois biomas maranhenses, sendo classificados por identificação morfológica em quatro espécies: *A. lituratus*, *A. fimbriatus*, *A. obscurus* e *A. planirostris* (Tabela 2). Os resumos das principais características que as diferenciaram estão descritas na Tabela 3.

Tabela 2. Espécies, caracteres, biomas e números de espécimes do gênero *Artibeus* procedentes na área de estudo.

Espécies	Caracteres		Bioma	Procedência	Nº amostral
	Coloração	Listras Faciais			
<i>A. obscurus</i>	Escuro no dorso e claro na região ventral	Não definidas	Cerrado	Caxias	5
			Amazônia	Godofredo Viana	1
				Cândido Mendes	2
				Carutapera	1
<i>A. planirostris</i>	Cinza escura	Não definidas	Cerrado	Caxias	1
			Amazônia	Carutapera	1
				Turiaçu	3
				Godofredo Viana	2
				Cândido Mendes	7
<i>A. lituratus</i>	Marrom escuro e marrom claro	Bem definidas	Cerrado	Caxias	10
			Amazônia	Cândido Mendes	3
				Turiaçu	1
<i>A. fimbriatus</i>	Acinzentada com as extremidades dos pelos mais claros na região ventral	Pouco definidas	Cerrado	Caxias	2
					39

Tabela 3. Medidas de alguns caracteres morfológicos das espécies estudadas. Em cada célula a linha superior apresenta a média \pm desvio padrão e a linha inferior os valores mínimos e máximos (entre parênteses)

Caracteres Morfológicos	<i>Artibeus lituratus</i> (n=14)	<i>Artibeus planirostris</i> (n=14)	<i>Artibeus fimbriatus</i> (n=2)	<i>Artibeus obscurus</i> (n=9)
M.C	60,56 \pm 17,01 (52-76)	46,6 \pm 47,70 (35-64)	56 \pm 56,08 (53-59)	30,6 \pm 1,85 (29-34)
ANT	66,46 \pm 3,22 (60,9-70,8)	62,97 \pm 2,15 (58,6-66,8)	68,35 \pm 1,25 (67,1-69,6)	55,59 \pm 2,96 (53,9-56,22)
TI	26,3 \pm 26,41 (25-28,1)	25,25 \pm 2,04 (21,5-27,8)	27,1 \pm 2,1 (25-29,2)	22,13 \pm 0,71 (21-23,3)
CT	30,42 \pm 1,06 (28,5-32,1)	29,29 \pm 0,94 (27,1-30,3)	30,8 \pm 0,2 (30,6-31)	27,37 \pm 1,31 (25,9-29,5)
C.D	i 2/2; c 1/1; pm 2/2; m 2/3= 30	i 2/2; c1/1; pm 2/2; m 3/3 = 32	i 2/2; c 1/1; pm 2/2; m 2/3 = 30	i 2/2; c 1/1; pm 2/2; m 3/3 = 32

n= nº amostral; **M.C** = Massa corporal (g); **Ant** = Comprimento do antebraço (mm); **Ti**= Comprimento da tíbia (mm); **Ct** = Comprimento total do crânio (mm); **C. D**= composição dentária.

Quanto a morfologia craniana os *Artibeus* apresentam características marcantes, como uma crista cranial evidente e um formato triangular do pós-orbital, como demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Morfologia Craniana de *A. lituratus*, *A. fimbriatus*, *A. planirostris* e *A. obscurus* mostrando crista cranial evidente e um formato triangular do pós orbital.



Fonte: Autora

4.2 Análises estatísticas

Na análise estatística fatorial e de comunalidade foram selecionadas as medidas que permaneceriam na análise, o valor 0,7 foi utilizado para a mensuração do grau de significância de cada uma das características trabalhadas a partir do método de rotação por Varimax que redistribuiu as variâncias dos primeiros fatores na busca de um padrão mais simples (Tabela 4). Todas as medidas selecionadas pela análise fatorial atenderam a níveis aceitáveis de explicação, tanto pelas cargas significativas, quanto pela alta comunalidade, ou seja, quantia de variância no compartilhamento com as demais medidas da análise (Tabela 5).

Tabela 4. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado para medidas morfométricas. (Comum = R - quadrado múltiplo) valores amostrados > 0,7

Variável	Fator 1	Fator 2
Ant. E (antebraço esquerdo)	0,9066027	-
Ant.D (antebraço direito)	0,9027731	-
Po (polegar)	-	0,7238966
III Me (III metacarpo)	0,8586174	-
2ª Fal (2ª falange do III metacarpo)	0,7488321	-
IV Me (IV metacarpo)	0,8880893	-
1ª Fal. (1ª falange do quarto metacarpo)	-	0,7399760
2ª Fal. (2ª falange do quarto metacarpo)	0,7365141	-
V me (V metacarpo)	0,8851150	-
Eigenvalue	18,18821	3,507976
Total variance %	47,86373	9,231517
Cumulative %	47,86373	57,09525

Tabela 5. Matriz de análise fatorial com fatores principais de variáveis dos componentes da última rotação com VARIMAX normalizado para medidas cranianas (Comum = R - quadrado múltiplo) valores amostrados > 0,7

Variável	Fator 1	Fator 2
Ct(comprimento total do crânio)	-0,93718	-
Cb(comprimento basal)	-0,73781	-
Cc(comprimento do côndilo- canino)	-0,94320	-
B(comprimento basal do crânio)	-0,85425	-
Cpt(comprimento palatal do crânio)	-0,75014	-
C-M2/3S(comp. da série de dentes superiores)	-0,92451	-
C-M2/3I(comp. da série de dentes inferiores)	-0,85449	-
Lc(largura externa dos cingulos- caninos)	-0,72988	-
Lm(largura externa dos molares)	-0,91162	-
Lz(largura zigomática)	-0,83462	-
Lcx (largura da caixa craniana)	-0,94614	-
Lmt (largura mastóidea)	-0,09367	-
CC+Inc(comp. Do crânio ao incisivo)	-0,77998	-
Cca-PMO(comp. Do canino ao processo mastóideo oposto)	-0,78579	-
Eigenvalue	11,72687	1,97877
% Total Variance	48,86197	8,24487
Cumulative%	48,86197	57,10683

Análise discriminante

A discriminação entre a média das variáveis pelo método *Foward Stepwise* foi significativa, com $\lambda=2452089$, $F(3,28) = 29,75549$; $p<0000$ (Tabela 6). A medida que mais contribuiu para a discriminação em geral foi comprimento da série de dentes superiores (CM2/3S) = 0,245 e a que menos contribuiu foi largura interorbital (Li) = 0,764. Na análise canônica foi calculado as diferenças (ortogonais) das funções discriminantes independentes. Os coeficientes padronizados para variáveis canônicas de determinadas medidas indicam quais características contribuíram para a função discriminante (Tabela 7). A primeira função discriminante evidenciada nessa análise foi comprimento da série de dentes superiores (C-M2/3S) com 0,479 na primeira raiz e 0,183 na segunda raiz.

Tabela 6. Análise da função discriminante de 28 variáveis craniométricas e morfométricas de *Artibeus* do estado do Maranhão.

Variável	λ	λ Parcial	Teste F	P
Pé	0,364	0,364	16,83	0,000
At. E	0,430	0,430	12,78	0,000
Ant .D	0,392	0,392	14,96	0,000
III Me	0,462	0,462	11,24	0,000
1ª Fal.	0,614	0,614	6,060	0,002
2ª Fal.	0,675	0,675	4,649	0,008
IV Me	0,389	0,389	15,13	0,000
2ª Fal	0,711	0,711	3,923	0,018
V Met	0,417	0,417	13,48	0,000
Ti	0,648	0,648	5,250	0,005
Ct	0,347	0,347	18,14	0,000
Cb	0,503	0,503	9,544	0,000
Cc	0,316	0,316	20,86	0,000
B	0,686	0,686	4,406	0,011
Cpt	0,657	0,657	5,027	0,006
C-M2/3S	0,245	0,245	29,75	0,000
C-M2/3I	0,546	0,546	8,035	0,000
Lc	0,634	0,634	5,563	0,003
Lm	0,345	0,345	18,34	0,000
Li	0,764	0,764	2,973	0,047
Lp	0,604	0,604	6,329	0,001
Lz	0,410	0,410	13,88	0,000
Lmt	0,653	0,653	5,120	0,005
Lpt	0,741	0,741	3,376	0,031
Ao	0,532	0,532	8,474	0,000
CC+inc	0,516	0,516	9,051	0,000
Cca-PMO	0,454	0,454	11,59	0,000
BcCs	0,658	0,658	5,006	0,006

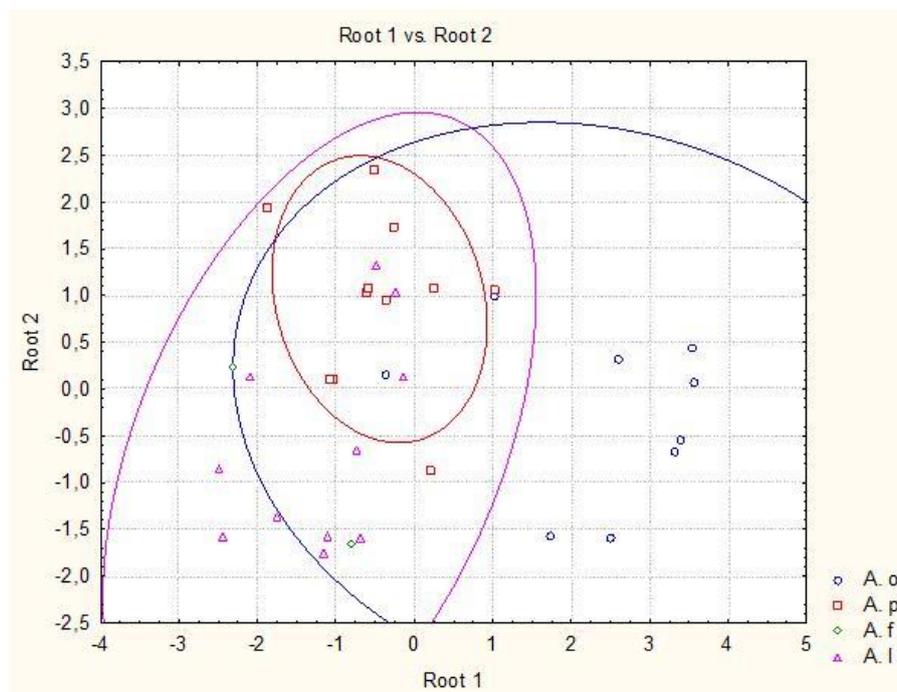
λ = Lambda wilk's; λ parcial = Lambda parcial de wilk's. Variáveis de maior poder discriminante ($p < 0,05$)

Tabela 7. Coeficiente padronizado para variáveis canônicas dos caracteres avaliados que mais contribuíram para função discriminante das espécies de *Artibeus* estudadas.

Variável	Raiz 1	Raiz 2
C-M2/3S	-0,479	0,183
1ª Fal.	-0,114	0,517
Pé	-0,330	0,525
Ant. D	-0,323	0,233
C-M2/3I	-0,246	0,036
B	-0,166	0,151
At. E	-0,299	0,282

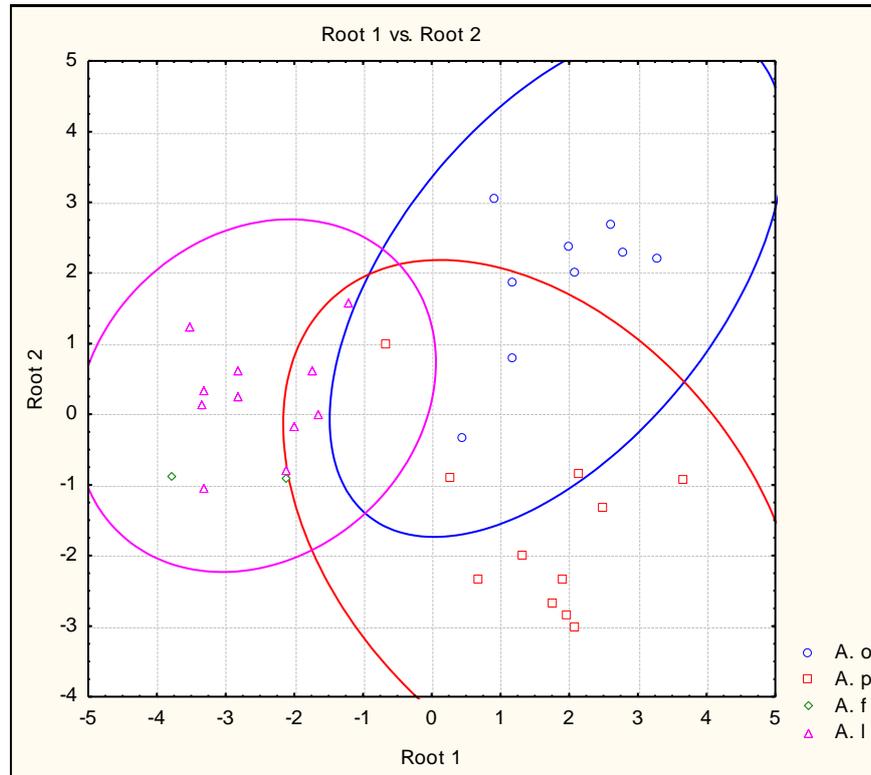
Tomando por base medidas cranianas e morfométricas das espécies analisadas, foi gerado mapas territoriais de dispersão. Diante da análise da morfometria, verificou-se sobreposição das medidas entre as espécies estudadas (Figura 5). Pela análise da craniometria percebeu-se, uma distinção entre as espécies analisadas com separação em: *A. lituratus*, *A. planirostris*, *A. fimbriatus* e *A. obscurus* (Figura 6). Observou-se através das variáveis selecionadas, que a espécie *A. obscurus* é que mais apresenta diferenciações em relação às demais espécies e que *A. lituratus* e *A. fimbriatus*, compartilham mais similaridade, pois estão agrupadas com mais proximidade.

Figura 5. Variáveis canônicas das variáveis morfométricas das espécies de *Artibeus* estudadas no Estado do Maranhão.



Af (*A. fimbriatus*); Ap (*A. planirostris*); Al (*A. lituratus*); Ao (*A. obscurus*)

Figura 6. Variáveis canônicas das variáveis cranianas das espécies de *Artibeus* estudadas no Estado do Maranhão.



Af (*A. fimbriatus*); Ap (*A. planirostris*); Al (*A. lituratus*); Ao (*A. obscurus*)

4.3 Análises Moleculares

Gene COI

Foram obtidas 30 sequências do gene COI do DNA mitocondrial, com 674 pares de bases para as espécies de morcegos do gênero *Artibeus* oriundas dos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses. Foram verificados 23 haplótipos, 605 sítios conservados, 69 sítios variáveis e 51 informativos para parcimônia. Para a identificação correta das espécies foram plotadas as sequências nucleotídicas obtidas no presente trabalho na plataforma *BOLD Systems (The Barcode of Life Data System)* que mostrou uma similaridade de 99,4% a 100% (Tabela 8)

Tabela 8. Similaridade de sequências obtidas das espécies do Gênero *Artibeus* do Maranhão com as disponíveis na plataforma BOLDSystems

Código Campo	Identificação Morfológica	Identificação Molecular/BOLD	Similaridade (%)
CEC 55	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 110	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 114	<i>A. lituratus</i>	<i>A. planirostris</i>	100
CEC 115	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 116	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 125	<i>A. fimbriatus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 126	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 133/177	<i>A. obscurus</i>	<i>A. obscurus</i>	99,69
RRM 25/137	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	100
RRM 71	<i>A. lituratus</i>	<i>A. planirostris</i>	100
RRM 150	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	99,53
RRM 160	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 113/74	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
RRM 130	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 120	<i>A. lituratus</i>	<i>A. lituratus</i>	100
CEC 169/013	<i>A. obscurus</i>	<i>A. obscurus</i>	99,69
RRM 103	<i>A. obscurus</i>	<i>A. obscurus</i>	99,81
Cx 08	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	99,4
RRM 129	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	99,84
RRM 29/138	<i>A. obscurus</i>	<i>A. planirostris</i>	99,69
CEC 117	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	99,84
RRM 127/55/21	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	99,53
RRM 139	<i>A. planirostris</i>	<i>A. planirostris</i>	99,84

Árvores filogenéticas foram obtidas e independentemente do método usado tiveram topologias bastante similares com as espécies agrupadas em três clados, o primeiro formado pela espécie *A. obscurus*, o segundo por *A. planirostris* e o terceiro agrupou *A. lituratus* e *A. fimbriatus* fortemente um indicativo de um *status* taxonômico (Figura 9).

A divergência genética intraespecífica para *A. lituratus*, variou de 0,1 a 1,7% quando foi considerado os espécimes CESC114 e RRM71 como *A. planirostris* e não *A. lituratus*; para *A. planirostris* a variação foi de 0,1 a 2,9%; para *A. obscurus* 0,9 a 1,4% quando foi considerado os espécimes RRM29 como *A. planirostris* e não *A. obscurus*. A divergência interespecífica entre *A. planirostris* e *A. lituratus* foi de 2,8 a 4,5 %; entre *A. lituratus* e *A. obscurus* 4,6 a 6,0%; entre *A. planirostris* e *A. obscurus* de 3,8 a 6,0% (Tabela 9).

Figura 7. Árvore filogenética pelo método Máxima Verossimilhança para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene COI. *A.lit* = *A. lituratus*; *A.fimb* = *A. fimbriatus*; *A.plan* = *A. planirostris*; *A.obsc* = *A. obscurus*. Cx = Caxias; CM = Cândido Mendes; Tu = Turiaçú; Cr = Carutapera; GV = Godofredo Viana. Os valores corresponde ao *bootstrap* de Máxima verossimilhança, Máxima parcimônia e Agrupamento de vizinhos da esquerda para a direita.

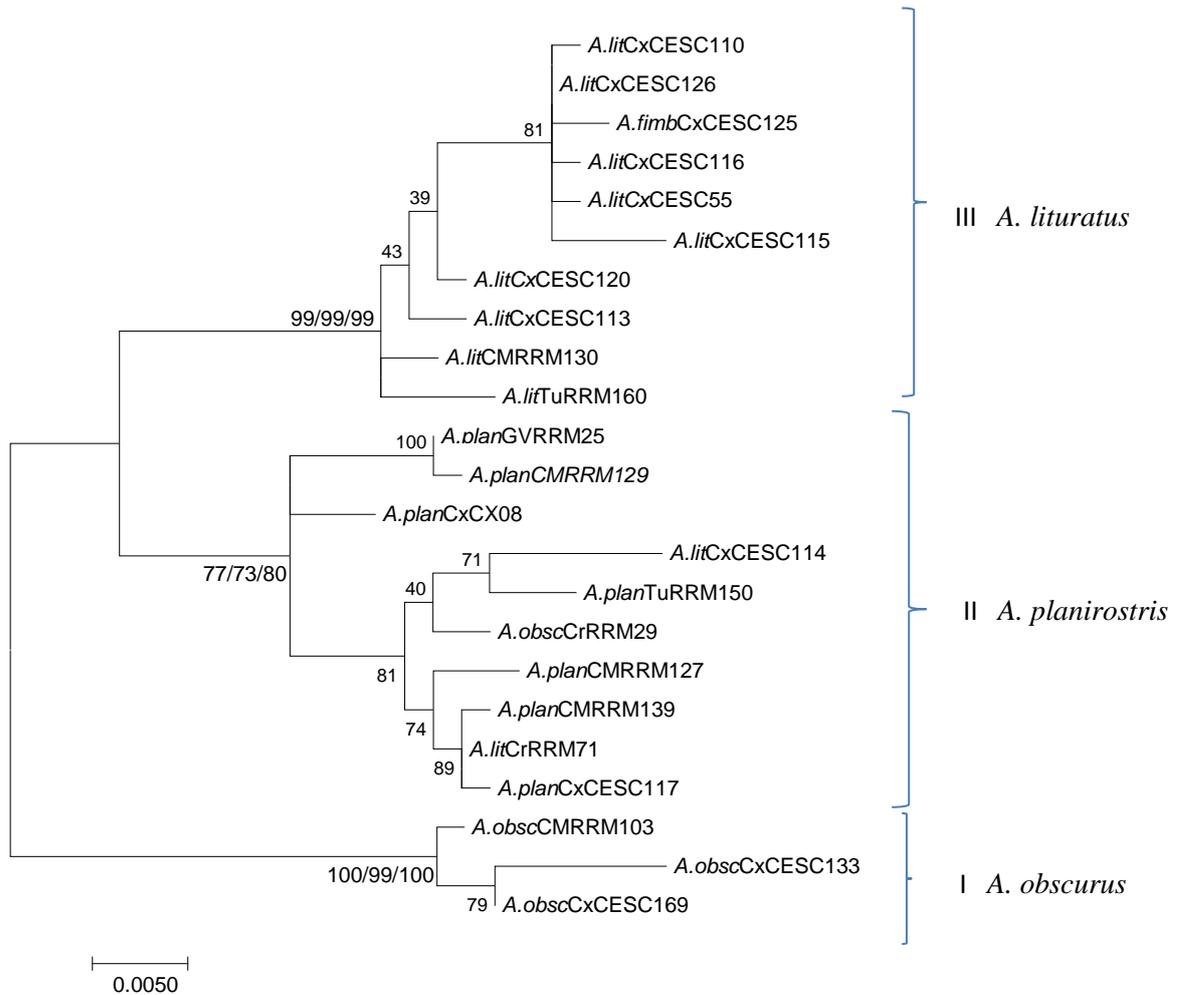


Tabela 9. Matriz de divergência nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura Nei para as espécies do gênero *Artibeus* de ocorrência em biomas maranhenses através do gene COI. *A.lit* = *A. lituratus*; *A.fimb* = *A. fimbriatus*; *A. plan* = *A. planirostris*; *A. obsc* = *A. obscurus*. Cx = Caxias; CM = Cândido Mendes; Tu = Turiaçu; Cr = Carutapera; GV = Godofredo Viana. Os valores corresponde ao *bootstrap* de Máxima verossimilhança, Máxima parcimônia e Agrupamento de vizinhos da esquerda para a direita

Espécies	Divergência Nucleotídica (%)																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1. <i>A.lit</i> CxCESC55	-																						
2. <i>A.lit</i> CxCESC110	0,3																						
3. <i>A.lit</i> CxCESC113	1,2	1,2																					
4. <i>A.lit</i> CxCESC114	3,9	3,9	4,2																				
5 <i>A.lit</i> CxCESC115	0,7	0,7	1,3	3,4																			
6 <i>A.lit</i> CxCESC116	0,3	0,3	1,2	3,9	0,7																		
7 <i>A.lit</i> CxCESC120	0,9	0,9	0,6	4,5	1,3	0,9																	
8 <i>A.lit</i> CxCESC126	0,1	0,1	1,0	3,7	0,6	0,1	0,7																
9 <i>A.lit</i> CrRRM71	4,4	4,4	3,4	1,7	4,2	4,0	3,7	4,2															
10 <i>A.lit</i> CMRRM130	1,2	1,4	0,7	4,4	1,2	1,4	0,7	1,2	3,6														
11 <i>A.lit</i> TuRRM160	1,7	1,7	1,0	4,7	1,5	1,7	1,0	1,5	3,9	0,9													
12 <i>A.plan</i> CxCESC117	4,5	4,5	3,6	1,8	4,3	4,2	3,9	4,4	0,1	3,7	4,0												
13 <i>A.plan</i> GVRRM25	3,7	4,0	3,4	2,7	3,9	3,7	3,4	3,9	1,7	3,1	3,5	1,8											
14 <i>A.plan</i> CMRRM127	4,3	4,3	3,4	2,0	4,2	4,0	3,7	4,2	0,6	3,5	3,9	0,7	2,0										
15 <i>A.plan</i> CMRRM129	3,9	4,2	3,6	2,9	4,0	3,9	3,6	4,0	1,8	3,2	3,7	2,0	0,1	2,1									
16 <i>A.plan</i> CMRRM139	4,5	4,5	3,6	1,8	4,3	4,2	3,9	4,4	0,1	3,7	4,0	0,3	1,8	0,7	2,0								
17 <i>A.plan</i> TuRRM150	4,5	4,5	3,6	1,3	4,5	4,5	3,9	4,3	1,2	3,9	4,2	1,4	2,3	1,5	2,4	1,4							
18 <i>A.plan</i> CxCX08	3,5	3,5	2,9	2,4	3,4	3,2	2,9	3,4	1,4	2,8	3,1	1,5	1,2	1,7	1,4	1,5	2,0						
19 <i>A.obsc</i> CxCESC133	5,3	5,3	6,0	4,5	4,8	5,3	6,0	5,2	5,3	5,8	6,0	5,5	5,0	5,0	5,1	5,5	6,0	5,1					
20 <i>A.obsc</i> CxCESC169	5,6	5,6	5,0	5,5	5,5	5,6	5,0	5,5	4,3	4,8	5,0	4,5	4,0	4,0	4,2	4,5	5,0	4,2	0,9				
21 <i>A.obsc</i> CrRRM29	4,2	4,2	3,2	1,5	4,0	4,2	3,5	4,0	0,7	3,4	3,7	0,9	1,8	1,1	2,0	0,9	1,0	1,5	5,4	4,5			
22 <i>A.obsc</i> CMRRM103	5,5	5,5	4,8	5,3	5,3	5,5	4,8	5,3	4,2	4,6	4,8	4,8	3,8	3,9	4,0	4,3	4,8	4,0	1,4	0,4	4,3		
23 <i>A.fimb</i> CxCESC125	0,4	0,4	1,4	3,7	0,9	0,4	1,0	0,3	4,2	1,5	1,8	4,3	4,2	4,2	4,3	4,3	4,3	3,7	5,2	5,5	4,0	5,3	-

rRNA 16S

Foram obtidas 34 sequências do gene rRNA 16S do DNA mitocondrial, com 546 pares de bases para as espécies de morcegos do gênero *Artibeus* oriundas dos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses. Foram verificados 462 sítios conservados, 84 sítios variáveis e 71 informativos para parcimônia.

As árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de Máxima Parcimônia (MP), Neighbor Joining (NJ) e Máxima Verossimilhança (MV) mostraram topologias similares com a formação de dois clados. Em um agrupou-se fortemente as espécies *A. lituratus* e *A. fimbriatus*, indicativo de um único *status* específico e no outro *A. planirostris* e *A. obscurus* (Figura 8).

A divergência genética intraespecífica para *A. lituratus*, variou de 0,2 a 1,1% quando foi considerado os espécimes CESC60 como *A. lituratus* e não *A. fimbriatus*; para *A. planirostris* a variação foi de 0,2 a 1,1% quando foi considerado os espécimes RRM29 como *A. lituratus* e não *A. obscurus*; *A. obscurus* alcançou 2,1%. A divergência interespecífica entre *A. planirostris* e *A. lituratus* foi de 1,7 a 2,7 %; entre *A. lituratus* e *A. obscurus* 1,3 a 2,5%; entre *A. planirostris* e *A. obscurus* de 1,7 a 2,3% (Tabela 10).

4.4 Vírus Rábico em Morcegos do gênero *Artibeus*

Os espécimes analisados foram negativos para o diagnóstico do vírus da raiva (Anexo III).

Figura 8. Árvore filogenética pelo método Máxima Verossimilhança para os morcegos coletados nos biomas Cerrado e Amazônia maranhenses através do gene RNA 16S. *A.lit* = *A. lituratus*; *A.fimb* = *A. fimbriatus*; *A. plan* = *A. planirostris*; *A. obsc* = *A. obscurus*. Cx = Caxias; CM = Cândido Mendes; Tu = Turiaçú; Cr = Carutapera; GV = Godofredo Viana. Os valores corresponde ao *bootstrap* de Máxima verossimilhança, Máxima parcimônia e Agrupamento de vizinhos da esquerda para a direita

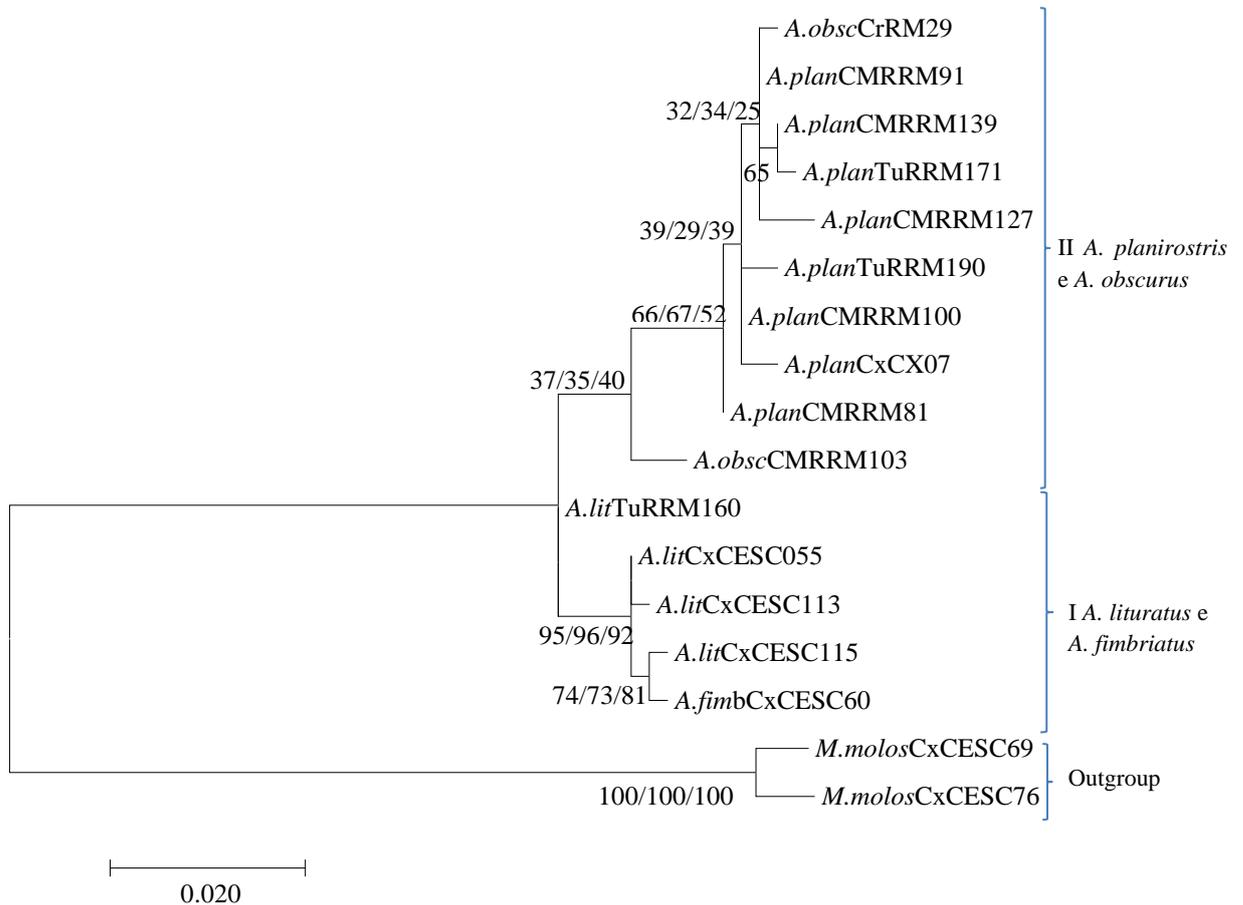


Tabela 10. Matriz de divergência nucleotídica gerada com o algoritmo Tamura Nei para as espécies do gênero *Artibeus* de ocorrência em biomas maranhenses através do gene RNA 16S. *A.lit* = *A. lituratus*; *A.fimb* = *A. fimbriatus*; *A. plan* = *A. planirostris*; *A. obsc* = *A. obscurus*. Cx = Caxias; CM = Cândido Mendes; Tu = Turiaguá; Cr = Carutapera; GV = Godofredo Viana. Os valores corresponde ao *bootstrap* de Máxima verossimilhança, Máxima parcimônia e Agrupamento de vizinhos da esquerda para a direita

Espécie	Divergência Nucleotídica (%)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>A.lit</i> CxCESC55	-																
2 <i>A.lit</i> CxCESC113	0,2																
3 <i>A.lit</i> CxCESC115	0,4	0,6															
4 <i>A.lit</i> TuRRM160	0,8	0,9	1,1														
5 <i>A.fimb</i> CxCESC60	0,4	0,6	0,4	1,1													
6 <i>A.obsc</i> CrRM29	1,9	2,1	2,3	1,9	2,3												
7 <i>A.obsc</i> CMRRM103	2,1	2,3	2,5	1,3	2,5	2,1											
8 <i>A.plan</i> CMRRM81	1,7	1,9	2,1	1,7	2,1	0,6	1,5										
9 <i>A.plan</i> CMRRM91	1,7	1,9	2,1	1,7	2,1	0,2	1,9	0,4									
10 <i>A.plan</i> CMRRM100	1,9	2,1	2,3	1,9	2,3	0,4	1,7	0,2	0,2								
11 <i>A.plan</i> CMRRM139	1,9	2,1	2,3	1,9	2,3	0,4	2,1	0,6	0,2	0,4							
12 <i>A.plan</i> TuRRM171	2,1	2,3	2,5	2,1	2,5	0,6	2,3	0,8	0,4	0,6	0,2						
13 <i>A.plan</i> TuRRM190	2,3	2,5	2,7	2,3	2,7	0,7	1,7	0,6	0,6	0,4	0,7	0,9					
14 <i>A.plan</i> CxCX07	2,3	2,5	2,3	2,3	2,3	0,8	2,1	0,6	0,6	0,4	0,8	0,9	0,7				
15 <i>A.plan</i> CMRRM127	1,9	2,1	2,3	1,9	2,3	0,8	2,5	0,9	0,6	0,8	0,8	0,9	1,1	1,1			
16 <i>M.Molos</i> CxCESC69	14,1	14,1	14,6	13,6	14,5	14,3	14,3	14,1	14,0	14,3	14,0	14,0	14,3	14,8	13,6		
17 <i>M.Molos</i> CxCESC76	14,1	14,3	14,6	13,6	14,6	14,2	14,3	14,1	14,0	14,3	14,0	14,0	14,3	14,8	13,5	1,1	

5 DISCUSSÃO

5.1 Abordagem morfológica

Os dados craniométricos são utilizados para classificação e mensuração na diferenciação das espécies. Nossos resultados evidenciaram que a medida do comprimento da série de dentes superiores (C-M2/3S) foi uma das variáveis discriminantes que mais diferenciou as espécies corroborando com estudos realizados por Silva (2016) que relata existir uma interação entre o hábito alimentar e as medidas de comprimento e largura da maxila superior e Jarr'in e Menendez-Guerrero (2011) que relataram que a variação da forma do crânio está relacionada com as flutuações ambientais. Segundo Heithaus e Fleming (1975) a ecologia alimentar de morcegos provê informações extremamente úteis para o entendimento dos mecanismos de partilha de recursos que regulam as relações tróficas, e que são responsáveis pela alta diversidade deste grupo nas regiões tropicais, como os Biomas estudados.

A craniometria mostrou-se mais útil na diferenciação morfológica das quatro espécies do gênero *Artibeus* do que a morfometria corroborando com Lim (1993). Nossos resultados mostraram grau de diferenciação morfológica para os morcegos do gênero, observou-se através das variáveis selecionadas que a espécie *A. obscurus* é a que apresenta maior diferenciação em relação às demais espécies e que *A. lituratus* e *A. fimbriatus* compartilham mais similaridades, pois o mapa territorial de dispersão, mostrou estas espécies agrupadas com mais proximidade, isto está de acordo com as filogenias morfológicas testadas por Marques - Aguiar (1994) e morfométricas de Guerrero et al. (2003).

A. lituratus é a maior espécie do grupo estudado, principalmente porque em relação a outras espécies apresenta maior tamanho das medidas cabeça-corpo e massa corpórea, seguida por *A. fimbriatus* que apresentou maiores médias para o antebraço, tíbia e comprimento total do crânio. Aeshita et al. (2006) inferem que a medida da massa corporal, e comprimento do antebraço são normalmente utilizadas como parâmetros pontuais para muitas considerações auto ecológicas, sendo por isso usadas também na comparação entre as espécies. Fialho (2009) em sua pesquisa com o gênero mencionou as maiores médias do antebraço e tíbia para *A. lituratus*, contrapondo-se com os resultados aqui encontrados, no entanto cabe salientar que somente análises morfométricas não são suficientes para diferenciar as espécies, pois é comum haver sobreposição de medidas para o gênero. Para o sudeste do Brasil existe uma gradação de tamanho entre as espécies do gênero *Artibeus* (TADDEI et al., 1998) onde *A. lituratus* é a maior espécie, seguida por *A. fimbriatus*, *A. planirostris* e *A. obscurus*, essa mesma ordenação das espécies foi encontrada neste estudo.

Pela análise do mapa territorial de dispersão evidencia-se que os caracteres morfométricos não foram suficientes para diferenciar as espécies, pois o mesmo demonstrou sobreposição das medidas, havendo melhor distinção quando a análise se estende para a craniometria, isto corrobora com Araújo et al. (2005) que ao analisarem a morfologia externa e craniana de quatro espécies de *Artibeus* de ocorrência na Paraíba e Pernambuco encontraram sobreposição para as medidas de *A. planirostris*, *A. fimbriatus*, *A. obscurus* e *A. lituratus*. Dias e Peracchi (2008) mencionaram a grande sobreposição de caracteres externos no tamanho entre as espécies de grandes *Artibeus* que vivem em simpatria e que por serem morfologicamente semelhantes elas são muitas vezes confundidas, levando a diagnósticos equivocados de muitas espécies. No entanto, neste estudo, a craniometria evidenciou diferenciação entre as espécies. As medidas “Lp”(largura pós-orbitária); “Lz” (largura zigomática), Lcx (largura da caixa craniana) e Lmt (largura mastóidea) se mostraram úteis para separação das quatro espécies, visto que estas não apresentaram sobreposição entre nenhum dos táxons. Outros autores já haviam apontado estes caracteres como úteis na identificação (KOEPCKE e KRAFT, 1984; TADDEI et al., 1998; RUI et al., 1999; ARAÚJO e LANGGUTH, 2010).

A espécie *A. planirostris* apresenta a maior variação geográfica, o que dificulta, muitas vezes, a identificação. Taddei et al. (1998) em um estudo para a região Nordeste do Brasil, registraram que esta espécie apresenta um menor porte, ocorrendo alta sobreposição nas suas medidas com *A. obscurus*. Já na região norte, onde não há registro de *A. fimbriatus*, *A. planirostris* apresentam maior tamanho, e é facilmente diferenciada de *A. obscurus*. Taddei et al. (1998) observou esta sobreposição ao comparar espécimes provenientes de São Paulo e Amazonas. Em algumas medidas, *A. fimbriatus* apresentou maiores médias que *A. lituratus*, o mesmo já foi observado por Rui et al. (1999); Araújo e Langguth (2010).

A. lituratus ocorre em praticamente todo o Brasil (25 estados mais o Distrito Federal), dentre as espécies de *Artibeus*, esta espécie apresentou caracteres morfológicos externos e cranianos exclusivos, sendo estes: coloração do corpo, distribuição de pelos no uropatágio, processos pré e pós-orbitais desenvolvidos, além das maiores medidas do terceiro metacarpo (IIIME) e quinto metacarpo (VME). Para Taddei e Uieda (2001) a variação no tamanho de morcegos em biomas distintos é um evento observado em diversas espécies com amplas faixas de distribuição. Neste estudo a média do comprimento do antebraço de *A. lituratus* foi 66,46 mm, sendo que na literatura há registro de antebraço ultrapassando 75 mm, e para a tíbia a média foi de 26,3 mm e para o terceiro metacarpo 69,9 mm e para o quinto metacarpo 64,7 mm, no entanto, Fialho (2009) em suas análises descreveu a maior medida do quinto

metacarpo para *A. obscurus*. A massa corporal para *A. lituratus* compreendeu a mínima de 52 g e a máxima de 76 g, estando dentro do padrão esperado e mencionado na literatura, pois de acordo com Reis et al. (2013) a massa corporal da espécie tem variação de 65 a 82 g. Tais características os classificam de médio a grande porte.

Em *A. fimbriatus* verificou-se para o comprimento do antebraço medidas que variaram de 67,1 a 69,6 mm. Os registros de Reis et al (2013) mostraram a variação de 60mm a 71mm para esta espécie, cabe salientar que, pequenas variações podem estar relacionadas a numerosos fatores bióticos, (interação intra e interespecíficas, hábitos alimentares, interações ecológicas) e abióticos (disponibilidade de recursos ambientais, mudanças climáticas, altitude e latitude) que interferem sobre tais características (VALENTIM, 2000). Neste estudo a coloração desta espécie mostrou-se acinzentada, com as extremidades dos pelos mais claros na região ventral. As listras claras faciais são pouco definidas, confirmando o que foi mencionado por Zortéa (2007) e Reis (2013). Entre as espécies aqui estudadas *A. fimbriatus* é a que apresenta a menor distribuição e de acordo com Marques-Aguiar (1994,2007); Taddei et al. (1998); Rui et al. (1999); Passos et al.(2010); Reis et al. (2011) não há registros desta espécie para o estado do Maranhão. No entanto em um trabalho recente realizadas por Olimpio et al, (2016) esta espécie foi registrada para o cerrado maranhense. Neste estudo não foi confirmado a ocorrência desta espécie para o Bioma Amazônia maranhense.

A. obscurus também possui ampla área de distribuição no Brasil (22 estados), Almeida et al. (2007), Dias et al. (2009) e Olímpio et al. (2016) registraram a ocorrência desta espécie para o Maranhão, mas tal registro não foi corroborado por Bernard et al. (2011) e Reis et al. (2013), mas corrobora nossos achados para os biomas Cerrado e Amazônia maranhense. A espécie obteve variações no tamanho, quanto a morfometria e a craniometria, sendo possível diagnosticar caracteres cranianos exclusivos referentes ao desenvolvimento dos processos orbitais. Taddei et al. (1998) sugere que a espécie possui variação geográfica e que esta pode estar ligada com a mudança de altitude e latitude. *A. obscurus* diferenciou-se de *A. planirostris* em vários caracteres: sendo menor; com pelagem escura quase negra, muito longa na região dorsal; listras faciais quase imperceptíveis, apenas uma mancha bem clara próxima ao olho. Esses caracteres foram também usados para diferenciá-las em Taddei et al. (1998).

A composição dentária das espécies *A. obscurus* e *A. planirostris*, deste estudo, apresentaram o mesmo número com a seguinte fórmula dentária: i 2/2, c 1/1, pm 2/2, m 3/3= 32 dentes, porém Simmons e Voss (1998) mencionaram que pode existir nestas espécies polimorfismo, com ausência do terceiro molar. Na espécie *A. lituratus* há registros de dentes

extranumerários, incluindo um terceiro molar, o que torna não confiável a utilização apenas deste caráter na separação das espécies (RUI e DREHMER, 2004).

A. planirostris também apresenta ampla distribuição dentro do território brasileiro (22 estados mais o Distrito Federal). Neste estudo o que diferenciou a espécie *A. planirostris* das demais foi o seu tamanho médio, pois, a média do comprimento do antebraço foi de 62,97 mm e a coloração observada que foi basicamente cinza escura, não apresentando muita variação. Ao contrário de *A. lituratus* não possuem listras brancas evidentes na cabeça. Com base nos caracteres crânio-dentários utilizados, *A. planirostris* e *A. fimbriatus* apresentaram crânios muito semelhantes, não sendo possível distinguir.

Quanto à morfologia externa, *A. planirostris* apresentou coloração ventral semelhante a *A. fimbriatus* e a *A. obscurus* variando do marrom ao cinza, corroborando com Azamor et al (2013) que observaram esta mesma coloração nestas espécies. Em nossos achados percebemos diferenças em relação a folha nasal, *A. fimbriatus* apresentou a borda inferior da folha nasal soldada ao lábio superior e *A. planirostris* mostrou a borda inferior da folha nasal livre

A sistemática das espécies do gênero *Artibeus*, baseada principalmente em dados morfométricos e morfológicos, ainda é motivo de muita controvérsia, há também muita discussão em nível específico, sendo assim tem sido usado ferramentas moleculares a fim de inferir quanto a sistemática do grupo.

5.2 Abordagem molecular a partir do gene COI e RNA 16S

As informações geradas por meio do gene COI ratificou a identidade para a maioria das espécies coletadas, no entanto, os espécimes de *A. fimbriatus* mostrou similaridade significativa com a espécie *A. lituratus*, com a divergência nucleotídica entre estas duas espécies muito baixa. *A. fimbriatus* é similar em tamanho e peso a *A. lituratus* e as características cranianas não foram capazes de separar as espécies dificultando assim a diagnose específica com o uso desses caracteres. Os dados moleculares apontam para um único *status*.

As relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Artibeus* proposta no presente trabalho são consistentes e corroboram em parte as propostas de Van Den Bussche et al. (1998), muito embora, não inclui todos os táxons analisados nestes trabalhos, pois em seus estudos apresentaram um clado monofilético formado por *A. planirostris* e *A. jamaicensis* e *A. obscurus* como grupos irmãos. Os resultados aqui obtidos também sugerem *A. planirostris* e *A. obscurus* como grupos irmãos. Baseado em dados morfométricos, Lim, (1997) propôs

que *A. planirostris* formam um grupo monofilético com *A. obscurus*, mas não fez nenhuma inferência sobre a relação deste clado com as demais espécies do gênero. Lim et al.(2004) propuseram uma filogenia, baseada em sequências do gene do citocromo b, que corroborou essa hipótese.

Nossos estudos apontam estas espécies como um complexo dentro do gênero, pois a identificação pela morfologia é muito difícil para a maioria. Um exemplo é o de *A. planirostris*, que possui grande variação em morfologia, e durante muito tempo foi considerado uma subespécie de *A. jamaicensis* e hoje, apesar de ser considerado como espécie separada, possui diversas subespécies, algumas em simpatria. A própria distinção das duas espécies não é ainda aceita por alguns autores (TAVARES, GREGORIN & PERACCHI, IN PRESS; SIMMONS, 2005) apesar das evidências morfológicas e moleculares (LIM, et al., 2004, GUERRERO et al., 2004).

Pela análise do gene COI a variação intraespecífica da divergência nucleotídica em *A. obscurus* variou de 0,9 a 1,4%; para *A. lituratus* 0,1 a 1,7%; para *A. planirostris* 0,1 a 2,9%. Os dados ratificam a identidade das três espécies coletadas considerando os critérios propostos por Bradley e Baker (2006) os quais sugerem que para o COI valores de divergência genética abaixo de 2% são indicativos de divergência intraespecífica e valores entre 2 a 11% são frequentemente indicativos de variação interespecíficas (CLARE et al. 2011).

Apesar dos numerosos esforços empregados na resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Artibeus*, Taddei et al. (1998) mostraram que a problemática persiste principalmente em relação à caracterização e variação geográfica das espécies brasileiras. Nossos resultados através dos genes COI e rRNA 16S, revelaram a presença das três espécies nos biomas maranhenses, no entanto a morfologia e craniometria não foram suficientes para distinguir as três espécies visto que as características tiveram sobreposição indicando alguns espécimes erroneamente. Sendo assim os resultados apresentados, embora não permitam inferências mais consistentes em relação à sistemática das espécies de *Artibeus*, indicam que a problemática envolvendo as relações filogenéticas ainda persiste, principalmente devido à falta de informações mais abrangentes sobre a distribuição e a variação geográfica.

A análise através dos genes revelou que a espécie *A. obscurus* é a basal do grupo, a análise morfológica mostrou que esta espécie constitui o extremo das espécies possuindo o menor tamanho entre estas. Esta separação foi mencionada por Redondo et al. (2008) que enfatizaram que esta espécie possui um potencial de isolamento maior do que *A. lituratus* e *A. planirostris*, que sobrevivem bem em qualquer tipo de ambiente.

As espécies *A. fimbriatus* e *A. lituratus* são morfologicamente semelhantes em vários aspectos e foram confundidas em suas áreas de ocorrência durante muito tempo. Dias e Peracchi (2008) enfatizaram que esta confusão pode ser devido á sobreposição de caracteres externos no tamanho entre as espécies que vivem em simpatria. Os dados moleculares aqui analisados corroboraram com Dias e Peracchi (2008) e reforçam o observado nos dados craniométricos, pois este demonstrou nos mapas territoriais de dispersão que essas espécies compartilham muitas similaridades dificultando assim a separação das espécies. Apesar da semelhança, Handley (1989) redescreveu *A. fimbriatus* diferenciando essas duas espécies.

5.3 Abordagem sobre a Transmissão do Vírus Rábico nas espécies do Gênero

Vários estudos associaram morcegos com agentes patogênicos e os classificaram como potenciais transmissores da raiva. Em nossos estudos, o resultado do teste de imunofluorescência direta mostrou diagnóstico negativo para o vírus da raiva nas espécies analisadas, corroborando com Póvoas et al. (2014) quanto aos morcegos não hematófagos do estado do Maranhão, mas diferindo dos hematófagos onde há registro de vírus. Os resultados aqui apresentados diferem dos trabalhos realizados por Cunha et al. (2005) que analisaram espécies pertencentes ao gênero *Artibeus* e mostraram resultados positivos para três espécies, entre elas: *A. lituratus*, *A. planirostris* e *A. jamaicensis* na cidade de São José do Rio Preto em São Paulo.

Os morcegos infectados pelo vírus rábico podem sofrer uma fase de excitabilidade seguida de paralisia, principalmente das asas, o que faz com que estes animais deixem de voar. Deve-se suspeitar, portanto, de morcegos (hematófagos ou não), encontrados em local e hora não habitual. Este fato é a base para o desenvolvimento das atividades da vigilância epidemiológica passiva da raiva nestes animais, que vem sendo desenvolvida no Brasil, particularmente em alguns estados do sudeste. Ressalta-se que durante a fase de paralisia dos morcegos não há paralisia do maxilar, o que permite que ele, uma vez manipulado, possa morder (MANUAL TÉCNICO DO INSTITUTO PASTEUR - SÃO PAULO, 2009). As características supracitadas não foram evidenciadas para nenhum espécime coletado neste estudo, sendo confirmada a ausência do vírus pelo diagnóstico laboratorial.

Práticas associadas às transformações ambientais com riscos para a saúde, como queimadas e desmatamento foram observadas nos Biomas analisados. Acredita-se que ações de controle dos morcegos hematófagos impactaram na redução da circulação do vírus rábico tanto nas espécies hematófagas quanto nas não hematófagas.

6. CONCLUSÃO

Diante das análises morfométricas, craniométricas e moleculares foi possível evidenciar:

Os dados morfológicos apontam para ocorrência de quatro espécies do gênero *Artibeus* para os Biomas estudados no estado do Maranhão: *A. lituratus*, *A. fimbriatus*, *A. obscurus* e *A. planirostris*. No entanto os dados moleculares indicam apenas três espécies: *A. lituratus*, *A. obscurus* e *A. planirostris*.

Das 14 medidas morfométricas e 25 craniométricas aferidas para as espécies do complexo *Artibeus* o comprimento do antebraço, o terceiro e quarto metacarpo, o comprimento total do crânio, da série de dentes superiores, do côndilo canino, a largura externa dos molares e a largura da caixa craniana foram a que mais contribuíram para a separação das espécies.

As informações geradas por meio do gene COI ratificou a identidade para a maioria das espécies, no entanto, tanto o gene COI, quanto o gene rRNA16 S, mostraram que os espécimes de *A. fimbriatus* mostraram similaridade significativa com a espécie *A. lituratus*, isso vai de acordo com a literatura que afirma que a diagnose entre *A. fimbriatus* e *A. lituratus* é bastante complexa.

As amostras de tecido encefálico submetidas ao teste para verificar a presença do vírus rábico em morcegos na área de estudo apresentaram resultados negativos e os casos de raiva humana ou em herbívoros que antes tinham sido notificados na área de estudo tem sido controlado.

REFERÊNCIAS

- ACHA P N ;A MALAGA-ALBA. Economic losses due to *Desmodus rotundus*. Pp. 207-214. In:Greenhall A M & U Schimdt (eds). **Natural history of vampire bats**. Roca Raton, CRC Press, 246p. 1988.
- AGUIAR, L.M.S. **Comunidades de Chiroptera em três áreas de Mata Atlântica em diferentes estádios de sucessão. Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1994.
- AGUIAR, L.M.S; BRITO D, Do current vampire bat (*Desmodus rotundus*) population control practices pose a threat to Dekeyser's nectar bat's (*Lonchophylla dekeyseri*) long-term persistence in the Cerrado? **Acta Chiropterologica** 12(2): 275-282. 2010.
- ANDRADE, F. A. G. Análise Morfométrica de espécie *Desmodus rotundus* (CHIROPTERA, PHYLLOSTOMIDAE) coletados no estado do Pará, Norte do Brasil. **Tese (Doutorado)**. Programa de pós-graduação Emilio Goelgi.152f., 2011.
- ARAÚJO, P.; LANGUTTH, A. Caracteres distintivos das quatro espécies de grandes Artibeus (Phyllostomidae) de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Chiroptera Neotropical** 16 (2): 715-722.2010.
- AESHITA, M.; WILSKE, B.; ZHAN-HUI, T.; CHEN, J. Occurrence and morphometric variability in the frugivorous bat species, *Cyneropterus sphinx* and *Rousettus leschnauti*, from a tropical rainforest Xishuangbanna, SW China, **Acta Chiropterologica**, v.8, n.2, p.417.2006.
- AZAMOR, L.; ALMEIDA, B.; AGUIEIRAS, M.; FONSECA, R.; GEISE, L. **Análise morfológica dos gêneros Artibeus Leach 1821 e Dermanura Gervais 1856 do vale do Rio Jequitinhonha, Minas Gerais.**, UERJ 2013,
- BAKER, R J.; SOLARI, S.; HOFFMANN, F. G. A new Central American species from the *Carollia brevicauda* complex occasional papers. **Museum of texas tech University** 217:1-12. 2002.
- BARROS, Marília Abero Sá de; MENEGHETI, João Oldair; FABIAN, Marta Elena. Estudo comparativo da folha nasal de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) e *Artibeus fimbriatus* Gray, 1838 (Chiroptera, Phyllostomidae). **Salão de Iniciação Científica (14: 2002: Porto Alegre). Livro de resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2002.
- BERNARD, E.; MACHADO, R.B.; AGUIAR, L.M.S. Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries? **Mammal. Rev.** 41 (1): 23-39. 2011.
- BERNARD, E.; TAVARES V.C; SAMPAIO E. Compilação atualizada das espécies de morcegos (Chiroptera) para a Amazônia Brasileira. **Biota Neotropical** 11: 35-46. 2011.
- BRADLEY, R. D.; BAKER, R. J. Speciation in mammals and the genetic Species concept. **J. Mammalogy.**, 87(4):643–662p. 2006.
- BRASS D A Rabies in Bats.Natural History and Public Health Implications.Livia **Press, Ridgefield**, 352p. 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. **Raiva humana transmitida por morcegos no Estado do Maranhão**. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS. 2009.

BREDT, A. et al. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde. **Ministério da Saúde**. 117 p. 1996.

BROWN E B. Vampiro: the vampire bat in factandfantasy. **High-Lonesome Books**, Silver City, 148p. 1994.

BURLAND TM, WILMER JW. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. **Biological Reviews**, 76, 389-409. 2001.

BUSSCHE, R.A. VAN DEN; J. L. HUDGEONS; R.J. BAKER. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*, p. 59-71. In: T.H. KUNZ & P.A. RACEY (Eds). **Bat biology and conservation**. Washington, Smithsonian Institution Press, 365p.1998.

BUSSCHE, R. A. V. D.; HOOFER, S R., Phylogenetic relationships among recent Chiropteran families and the importance of choosing appropriate out-group taxa. **Journal of Mammalogy**, 85(2):321–330. 2004.

CADRIN, S. X. Advances in morphometric identification of fishery stocks. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n.1, p. 91-112.2000.

CLARE EL, BARBER BR, SWEENEY BW, HEBERT PDN. FENTON MB. Eating local: influences of habitat on the diet of little brown bats (*Myotis lucifugus*). **Molecular Ecology**. 20:1772–1780. 2011.

CALISHER, Charles H. et al. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 531-545. 2006.

COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genetics** v. 19, n. 7, p. 370-75. 2003.

CONSTANTINE, D.G. Health precautions for bat researchers, 491-526p. In: KUNZ T.H. (Ed.). *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*, Washington D.C., London: **Smithsoni an Institution Press**, 533p. 1988.

COX, A. J.; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. **Mol. Ecol.** 10, 371–386. 2001.

CRUZ, L.D; MARTINEZ C; FERNANDES F. R. Comunidade de morcegos em habitats de uma Mata Amazônica remanescente na Ilha de São Luís, Maranhão. **Acta Amazônica** 37: 613-620. 2007.

CUNHA, E.M.S., LARA, M.C.C.S.H., NASSAR, A.F.C., SODRÉ, M.M., AMARAL, L.F.V., Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in the State of São Paulo, Brazil. *Revista de Saúde Pública*; 39: 683-4, 2005.

DATZMANN, T.; VON HELVERSEN, O.; MAYER, Frieder. Evolution of nectarivory in phyllostomid bats (Phyllostomidae Gray, 1825, Chiroptera: Mammalia). **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 165. 2010.

DEAN, D. J.; ABELSETH, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. 4.ed. Geneve: World Health Organization, p.88-95, 1996.

DIAS D; PERACCHI A.L. Quirópteros da Reserva Biológica do Tinguá: Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (mammalia: Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia** 25: 333-369. 2008.

DIAS, P.D., SANTOS, C.L.C., RODRIGUES, F.S., ROSA, L.C., LOBATO, K.S., REBÊLO, J.M.M., Parasitic flies (Diptera, Hippoboscoidea) on bats (Mammalia, Chiroptera) in Maranhão State, **Revista Brasileira de Entomologia**. vol.53 no.1 São Paulo, 2009.

DITCHFIELD, A.D. & BURNS, K.. DNA sequence reveal phylogeographic similarities of neotropical bats and birds. **Journal of Comparative Biology**, 3(2):164-169. 1998

DITCHFIELD, A.D. The comparative phylogeography of neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. **Molecular Ecology**. Oxford, 9(9):1307-1318. 2000.

FEIJÓ, A. R. A ; ALTHOFF, S.. New species of *Histiotus* (Chiroptera: Vespertilionidae) from northeastern Brazil, **Zootaxa**. 4048 (3):412-427. 2015

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **2000 Evolution**. 39: 783-791.1985.

FIALHO, F.S.F. **Análise Morfométrica, morfológica e citogenética de morcegos do gênero *Artibeus*, LEACH, 1821 (Chiroptera, Phyllostomidae) Brasília**. Dissertação (Mestrado- Biologia Animal). Centro de ciências Biológicas. Universidade Brasília. 2009.

FINDLEY, J. S. **Bats: a community perspective Cambridge University Press**, Cambridge.1993.

FREEMAN, P. W. Frugivorous and animalivorous bats (Microchiroptera): dental and cranial adaptations. **Biological Journal of the Linnean Society** 33: 249-272. 1988.

FREEMAN, P. W. Canine teeth of bats (Micro-chiroptera): size, shape, and role in crack propagation. **Biological Journal of the Linnean Society**, 45: 97-115. 1992.

FREEMAN, P. W., and W. N. WEINS.. Puncturing ability of bat canine teeth: the tip. Pp. 225-232, in *Life among the muses: papers in honor of James S. Findley* (T. L. YATES, W. L. GANNON, and D. E. WILSON, eds.). **University of New Mexico Press, Albuquerque**, 290 pp. 1997.

- FREEMAN, P. W. Macroevolution in Microchiroptera: recoupling morphology and ecology with phylogeny. **Evolution Ecology Research** [S.I.]v.2, p.317-335. 2000
- GREGORIN, RENATO; TADDEI, VALDIR A. Chave artificial para a identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). **Mastozoología Neotropical**, v. 9, n. 1, p. 13-32. 2002.
- GREENHALL, A.M.; JOERMANN, G. ; SCHMIDT, U. Desmodus rotundus. **Mamm Species** 202:1-6. 1983
- GUERRERO, J. A. et al. Morphometrics in the quantification of character state identity for the assessment of primary homology: An **analysis of character variation of the Linnean Society (S.I)**, v 80, n 1, p. 45-55. 2003.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and 204 analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic. Acids. Symp. Series**. 41:p. 95-98. 1999.
- HANDLEY, C. O. New species of mammals from Northern South America: fruit-eating bats, genus *Artibeus* Leach. *Fieldiana: Zoology*. Chicago, 39:163-172. 1987.
- HANDLEY, C. O., JR. The *Artibeus* of Gray, 1838. Pp. 443–468 in *Advances in Neotropical mammalogy* (K. H. Redford and J. F. Eisenberg, eds.). **Sandhill Crane Press**, Gainesville, Florida. 1989.
- HANLON, C. A.; I V KUZMIN, J. D. ;BLANTON, W. C.; J. S. MANANGAN; C. E. RUPPRECHT. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. **Virus Research**. 111: 44 – 54.2005.
- HANDLEY JR. C. O. The identity of *Phyllostoma planirostre* Spix, 1823 (Chiroptera: Sternodermatinae). **Bulletin American Museum Natural History** 206: 12-17. 1991.
- HEBERT, P.D.N., A; CYWINSKA, S.L; BALL; J.R. WAARD. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, B. Biological Sciences* 270: 313-332. 2003.
- HEITHAUS ER, FLEMING TH, OPLER PA. Foraging patterns and resource utilization in seven species of bats in a seasonal tropical forest. **Ecology** 56: 841–854. 1975.
- HEYER, W.R.; CODDINGTON, J.A.; KRESS, W.J.; Acevedo, P.; Cole, D.; Erwin, T.L. et al. Amazônian biotic data and conservation decisions. **Ciência e Cultura**, 51: 372-385. 1999.
- HILL, J.E. & SMITH, J.D. *Bats, a natural history*. 2^a ed. Dorchester, University of Texas Press & British. **Museum Natural History**. 243p. 1986.
- HOGAN, D. J.; CUNHA, J. M. C.; CARMO, R. L. Uso do solo e mudança de sua cobertura no Centro-Oeste do Brasil: consequências demográficas, sociais e ambientais. In: HOGAN, D. J.; HOGAN, D. J.; CARMO, R. L.; CUNHA, J. M. P.; BAENINGER, R. (org.). *Migração e ambiente no Centro-Oeste*. Campinas, NEPO/UNICAMP: **PRONEX**, p. 149-174. 2002.

HOLMES E C, C H WOELK, R KASSIS;H A BOURHY. **Genetic Constraints and the Adaptive Evolution of Rabies Virus in Nature.***Virology* 292: 247-257. 2002

HURTADO, N., and V. PACHECO. Analisis filogenético del género *Mimon* Gray, 1847 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) com la descripcion de um nuevo genero. **Therya**,5: 751–791. 2014

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Malha municipal do Estado do Maranhão. Resolução Nº 05 de 10 de outubro de 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2011

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.com.br>. Acesso em: 15 de maio de 2016.

JARRÍN P, MENENDEZ-GUERRERO PA. Environmental components and boundaries of morphological variation in the short-tailed fruit bat (*Carollia* spp.) in Ecuador. **ActaChiropterologica** 13:319–340. 2011

JENNINGS, N. B. *et al.* Echolocation calls and wing morphology of bats from the West Indies. **Acta Chiropterologica**, v. 6, n. 1, p. 75-90. 2004.

KOEPCKE J. e R. KRAFT. Cranial and external characters of the large fruit bats of the genus *Artibeus* from Amazonian Peru. **Spixiana** 7:75- 84. 1984.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test, chapter 6. *In* Anonymous (ed.). Laboratory techniques in rabies. **World Health Organization**, Geneva. 1996.

KOOPMAN, K.F. Order Chiroptera, p. 137-241. In: D. E. Wilson & D. M. Reeder (Eds.). **Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference**. Smithsonian Institution Press, Washington DC.1993.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054. 2016.

LIM, B. K e WILSON, D. E. Taxonomic status of *Artibeus amplus* (Chiroptera: Phyllostomidae) in northern South America. **J Mammalogy** 74: 763-768. 1993.

LIM, B.K.. Morphometric differentiation and species status of the allopatric fruit-eating bats *Artibeus jamaicensis* and *A. planirostris* in Venezuela. *Studies on Neotropical Fauna and Environments. Sz Lisse.* 32: 65-71. 1997.

LIM, B. K.; ENGSTROM, M. D.; LEE, T. E.; PATTON, J. C. & BICKHAM, J. W.. Molecular differentiation of large species of fruit eating bats (*Artibeus*) and phylogenetic relationships based on the cytochrome *b* gene. **Acta Chiropterologica** 6(1):1-12. 2004.

MAGURRAN, A. E.. **Medindo a diversidade biológica**. Curitiba, Editora UFPR. 261p. 2011.

MAHALANOBIS P.C. On the generalized distance in statistics. Proceedings of the National Institute of Sciences of India 2:49–55.1936.

MÁLAGA-ALBA, A. Vampire bat as a carrier of rabies. Am. J. Pub. **Health, Bat Rabies** 44: 909-918. 10. 1954.

MANUAL TÉCNICO DO INSTITUTO PASTEUR. Secretaria de Estado da Saúde. **Profilaxia da raiva humana** - São Paulo.2009.

MARQUES-AGUIAR, S.A. A systematic review of the large species of *Artibeus* Leach 1821 (Mammalia: Chiroptera) with some Phylogenetic inferences. **Boletim do museu Paraense Emílio Goeldi, Zoologia** 10: 3-83. 1994.

MARQUES-AGUIAR, S.A. **Genus *Artibeus***. In: Gardner, A.L. (Ed.). **Mammals of South America, Volume1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats**. Chicago, The University of Chicago Press. p. 301-321. 2007.

MARQUES- AGUIAR S.A. Genus *Artibeus* Leach, 1821. In: Mammals of South America, Volume I. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats (editado por Gardner A.L.), p.301-321. **The University of Chicago Press**, Chicago. 2008.

MARTINS F M. Filogeografia intraespecífica do morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Chiroptera, Phyllostomidae). **Tese** (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia – Genética. 153 p. 2008.

MARTINS, F.M.; TEMPLETON, A.R.; PAVAN, A.C.O.; KOHLBACH, B.C.;MORGANTE, J. S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): Marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. **BMC Evolutionary Biology**. 2009.

MARCHESIN, S. R.C. Divergência genética e relacionamento filogenético em espécies de morcegos das famílias Molossidae e Phyllostomidae baseado em análises de PCR-RFLP. **Tese**. São José do Rio Preto – SP. 2006.

MESLIN FX, KAPLAN MM. Na overview of laboratory techniques in the diagnosis and prevention of rabies and rabies research. In FX MESLIN, MM KAPLAN H KOPROWSKI (eds). Laboratory techniques in rabies, **World Health Organization**, Geneva, 4 th ed, p. 9-27. 1996.

MESSENGER, Sharon L. et al. Emerging pattern of rabies deaths and increased viral infectivity. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 2, p. 151-154.2003.

MITTERMEIER, R. A., ROBLES-GIL, P., HOFFMANN, M., PILGRIM, J. D., BROOKS, T. B., MITTERMEIER, C. G., LAMOREUX, J. L. & FONSECA, G. A. B.. Hotspots Revisited: Earths Biologically Richest and Most Endangered Ecoregions. **CEMEX**, Mexico City, Mexico 390pp. 2004.

MORATELLI, R., D. DIAS; C.R. BONVICINO. Estrutura e análise zoogeográfica de uma taxocenose de morcegos no norte do Estado do Amazonas, Brasil. *Chiroptera Neotropical*16(1): 661-671.2010.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858. 2000.
- MUÑOZ-ROMO, M Ethogram and diurnal activities of a colony of *Artibeus lituratus* (Phyllostomidae: Stenodermatinae). **Acta Chiropterologica**, v.8, p.231-238.2006.
- MURAKAMI, M.;YAMASHITA, Y.; FUJITANI, H. The complete sequence of Mitochondrial Genome from a Gynogenetic Triploid “Ginbuna” (*Carassius auratus langsdorfi*). **Zoological Science of Japan**. 15: p. 335-337.1998.
- NAEGELE, M. P.; DA COSTA, P. I.; ROSA, J. A. DA. Polymorphism of the ITS-2 region of the Ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 20, n. 4, p. 353–357. 2006.
- NEUWEILER, G. **The biology of bats**. *New York: Oxford University Press*, 310 p. 2000.
- NOGUEIRA, M. R.; LIMA, I. P.; PERACCHI, A. L.; SIMMONS, N. B. New genus and species of nectar-feeding bat from the Atlantic forest of southeastern Brazil (Chiroptera: Phyllostomidae: Glossophaginae). **American Museum Novitates**, (3747), 1-30. 2012.
- NOGUEIRA, M.R.; LIMA, I.P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V.C.; GREGORIN, R. ; PERACCHI, A.L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**. 10(4):808-821. 2014.
- NOWAK, R. M. Walker’s Bats of the World. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 287 p. 1994.
- OLÍMPIO, Ana Priscila Medeiros et al. Bat fauna of the Cerrado savanna of eastern Maranhão, Brazil, with new species occurrences. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 3. 2016.
- OLIVEIRA T. G.; SILVA J.S.; DIAS P.A.; QUEIXABA O.; GERUDE R. G.;GIUSTI M e PEREIRA A.P. Mamíferos da Amazônia Maranhense: diversidade e conservação. P 251-267. In: **Amazônia Maranhense: diversidade e conservação**. Belém. 2011.
- OLIVEIRA, J. A.; CRISPIM, B. A.; MARTINS, N. M.; SILVA, A. O.; DOURADO, P. L. R.; ROCHA, M. P.; GRISOLIA, A. B. Mitochondrial gene sequences for identification of animal species. **Rev. Colombiana cienc. Anim**. 5(2):396-407. 2013.
- OPAS - Organização Panamericana da Saúde, Organização Mundial da Saúde, Sistema de informação epidemiológica, históricos anuais, **data base**. 2014.
- OPREA, M. **O uso de ferramentas moleculares no estudo de morcegos**. Laboratório de Genética e Biodiversidade, Universidade Federal de Goiás/Instituto de Ciências Biológicas. UNB, p. 25, Abr. 2013.
- OWEN, R. D., Phylogenetic analyses of the bat subfamily Stenodermatinae (Mammalia Chiroptera)Spec. Publ. Mus. Texas Tech Vntv., 26: 1-65. 1987.

OWEN, R.D. The systematic status of *Dermanura concolor* (Peters, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae), with description of a new genus. **Bulletin American Museum of Natural History**, New York, **206**: 18-25.1991.

PASSOS, F.C.; MIRANDA, J.M.D.; BERNARDI, I.P.; KAKU-OLIVEIRA, N.Y. e MUSTER, L.C. . Morcegos da Região Sul do Brasil: análise comparativa da riqueza de espécies, novos registros e atualizações nomenclaturais (Mammalia, Chiroptera). **Iheringia, Série Zoologia**, 100(1): 25-34. 2010.

PEREIRA, C. B.; ALVIM, M. C. M. Manual para estudos craniométricos e cranioscópicos. **Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico**. Universidade Federal de Santa Maria. 2006.

PERES-NETO, Pedro. Introdução a análises morfométricas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 3, 1995.

PÓVOAS, D. CHAVES, N. BEZERRA, D. ALMEIDA, V. SARAIVA, L. **Raiva em herbívoros no estado do Maranhão: um estudo retrospectivo**.2014.

REDONDO, R. A. F.;BRINA, L. P. S.;SILVA, R. F.; DITCHFIELD, A. D.;SANTOS, R. F. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49 44–58.2008

REIS S.F.Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**. 4: 571-580.1988.

REIS S.F.L.M. Pessoa, e R.E. Strauss. Application of size free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. **Revista Brasileira de Genética** 13: 9-520. 1990.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. LIMA, I. P. (Ed.). **Morcegos do Brasil**. 2. ed. Londrina.2007.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A. LIMA, I. P. (Ed.). **Mamíferos do Brasil**. 2. ed. Londrina: UEL, p 439. 2011.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; FREGONEZI, M.N.; SHIBATTA, O.A. **Morcegos do Brasil: guia de campo**.1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, p 252. 2013.

ROZAS, J.; SANCHES-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DNA Polymorphism 220 analyses by coalescent and order methods. **Bioinformatics**. 19: 2496-2497. 2003.

RUI, A. M.; FABIÁN, M. E.; MENEGHETI, J. O. Distribuição geográfica e análise morfológica de *Artibeus lituratus* Olfers e de *Artibeus fimbriatus* Gray (Chiroptera, Phyllostomidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n.2, p.447-460. 1999.

RUI, A. M. DREHMER, C. J. **Anomalias e variações na formula dentaria em morcegos do gênero *Artibeus* Leach (Chiroptera: Phyllostomidae)**. *Revista Brasileira de Zoologia*. v 21. n. 3, p. 639-648.2004.

- SAWYER, D. População, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no cerrado. In: HOGAN, D. J.; CARMO, R. L.; CUNHA, J. M. P.; BAENINGER, R. (org.). Migração e ambiente no Centro-Oeste. Campinas, NEPO/UNICAMP: **PRONEX**, p. 279-299. 2002.
- SCHNEIDER, M.C., ROMIJN, P.C., UIEDA, W. TAMAYO, H., da SILVA, D.F., BELOTTO, A., da SILVA, J.B. & LEANES, L.F. Rabies transmitted by vampire bats to humans: Anemerging zoonotic disease in Latin America? **Pan. Am. J. Public Health** 25(3):260-269. 2009.
- SIMMONS, N.B. & VOSS, R.S. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland rainforest fauna. Part 1. Bats. **Bulletin of American Museum of Natural History**, 237: 1-/219. 1998.
- SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. In WILSON D.E; REEDER, D.M (Eds). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3.ed. v.1. **Baltimore: Johns Hopkins University Press**, p 3012- 52. 2005.
- SILVA, Tiago Ferraz da. **Diversificação craniofacial em morcegos filostomídeos: um estudo de associação genótipo-fenótipo através do gene RUNX2**. 2016.
- SPIX J.D.E. **Simiarum et Vespertilionum brasiliensium species novae**, p. 68. Monachii, 72 pp. 1823.
- SODRE, M.M.; GAMA, A.R.; ALMEIDA, M.F. Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 52, n.2, p. 75-81.2010.
- SOLARI, S.; V. MARTINEZ-ARIAS. Cambios recientes em la sistemática y taxonomía de murciélagos Neotropicales (Mammalia: Chiroptera). **Therya**, **5**: 167–196.2014.
- STÜPP DE SOUZA, D. A. Análise morfométrica de *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) no extremo sul do Brasil. **Monografia**, Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2008.
- STATSOFT INC. (Tulsa, Estados Unidos). STATISTICA 3.0. **Tulsa**, v. 1. 1993.
- TADDEI, V. A., C. A. Nobile; E. Morielle - Versute. "**Distribuição geográfica e análise morfométrica comparativa em Artibeus obscurus (Schinz, 1821) e Artibeus fimbriatus Gray, 1838 (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae)**." *Ensaio e ciência* 2.2: 71-127. 1998.
- TADDEI, V.A.; W. UIEDA. Distribution and morphometrics of *Natalus stramineus* from South America (Chiroptera, Natalidae). **Iheringia Série Zoológica** 91: 123-132. 2001.
- TAVARES, V.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. Sistemática: A diversidade de morcegos no Brasil. In: PACHECO, S. M.; MARQUES, R. V.; ESBERÁRD, C. E. L. (Org.) **Morcegos do Brasil: Biologia, Sistemática, Ecologia e Conservação**. Porto Alegre: USEB. 2008.

UIEDA, W, N M S HARMANI & M M S SILVA.. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, 29 (5): 393-397. 1995.

UIEDA, Wilson. Behavior of an albino vampire bat, *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy)(Chiroptera, Phyllostomidae), in captivity. ***Revista Brasileira de Zoologia***, v. 18, n. 2, p. 641-644. 2001.

WETTERER, A. L.; M, V. ROCKMAN E N. B.SIMMONS. Phylogeny of Phyllostomid Bats (Mammalia: Chiroptera): Data from Diverse Morphological systems, Sex, Chromosomes and Restriction Sites. ***Bulletin of the American Museum of the Natural History***, 248: 1-200. 2000.

WOO DK, et al. Multiple pathways of mitochondrial-nuclear communication in yeast: Intergenomic signaling involves ABF1 and affects a different set of genes than retrograde regulation. *Biochim Biophys Acta* 1789(2):135-45. 2009.

VALENTIN, J. L. ***Ecologia numérica: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos***. Ed. Interciência. p.117. 2000.

VIZZOTO, L. D.; TADDEI, V.A. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Revista da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. São José do Rio Preto– Boletim de Ciências*. n. 1, p. 1-72, São José do Rio Preto. 1973.

VOIGT, C.C.; KINGSTON, T. ***Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world***. Springer International AG, Cham. 2016.

VOSS, R.S.; L.H. EMMONS. Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. ***Bulletin of the American Museum of Natural History***, New York, 230: 1-115.1996.

ZORTÉA, M. & CHIARELLO, A.G. Observations on the big fruit-eating bat, *Artibeus lituratus*, in a urban reserve of south-east Brazil. *Mammalia* 58(4): 665-670. 1994.

ZORTÉA, M. Subfamília Stenodermatinae, p.107-128. In: REIS, N.R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Org.). ***Morcegos do Brasil***. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, p 253.2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Área de coleta nos Biomas Cerrado e Amazônia Maranhenses



Fonte: GENBIMOL

APÊNDICE B - Arqueamento das redes de neblinas na área de coleta



APÊNDICE C - Morcegos capturados em rede de neblina



Fonte: GENBIMOL

ANEXO

ANEXO I

EXTRAÇÃO DE DNA KIT PROMEGA

O protocolo foi adaptado para microtubos de 1,5 ml contendo as seguintes etapas:

- ✓ Retirou-se um fragmento de 20mg tecido e colocou em um microtubo de 1,5 ml;
- ✓ Preparou-se uma solução composta de EDTA (60 µl) e Nuclei Lysis Solution (250 µl), foi feita em quantidade proporcional as amostras;
- ✓ Misturou-se a solução manualmente;
- ✓ Levou-se a solução ao freezer por 5 minutos (proporcional à quantidade dos reagentes), tomando-se o cuidado para não congelar;
- ✓ Para cada µl de cada amostra, usou-se 300 µl da solução preparada para cada um dos tubos;
- ✓ Colocou-se 15 µl de proteinase K e deixou-se as amostras em banho Maria a 65° C até degradar todo o tecido (mais ou menos três horas, dependendo do tipo de tecido);
- ✓ Adicionou-se 10 µl de RNase e levou-se os tubos à estufa a 37° C por 30 minutos;
- ✓ Após retirar as amostras da estufa adicionou-se 150 µl do reagente Protein Precipitation.
- ✓ Agitou-se delicadamente os tubos;
- ✓ Agitou-se no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes;
- ✓ Colocou-se no freezer por cinco minutos, tomando o cuidado para não congelar;
- ✓ Centrifugou-se por 10 min. a 15.000 rpm;
- ✓ Adicionou-se 600 µl de isopropanol (para precipitar o DNA) em um novo tubo.
- ✓ Retirou-se o tubo da centrífuga e retirou-se o sobrenadante; colocando-o junto com isopropanol;
- ✓ Agitou-se (homogeneizou-se) gentilmente os tubos;
- ✓ Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- ✓ Descartou-se o isopropanol e colocou-se o tubo em papel absorvente;
- ✓ Em seguida adicionou-se 500 µl de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar-se o pellet de DNA;
- ✓ Centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm;
- ✓ Descartou-se o álcool;
- ✓ Submeteu-se as amostras a um spin;
- ✓ Retirou-se o excesso de álcool com a ponteira branca, tomando cuidado para não remover o pellet;
- ✓ Colocou-se o tubo aberto na estufa por 10 minutos;

- ✓ Colocou-se 50 µl de solução DNA rehydratation ou TE;
- ✓ O DNA foi visualizado por meio de um sistema de eletroforese em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3 µl do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol). A concentração do DNA extraído também foi analisado através de quantificação no espectrofômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

AMPLIFICAÇÃO GENICA POR PCR E SEQUENCIAMENTO

Para o isolamento e amplificação dos fragmentos gênicos do DNA mitocondrial empregou-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com primers específico e condições específicas conforme descrito na Tabela 1. Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose a 1% e sendo positivo foram purificados usando o kit ExoSap IT conforme fabricante. Para o gene rRNA 16S utilizou-se os primers descritos por Palumbi et al. (1991) e para o COI o descrito por Folmer et al. (1994).

Tabela 11. Condições de PCR para isolamento dos genes: rRNA 16S e COI.

GENE	PRIMERS	Condições de PCR
rRNA 16S	16S-L1987 5' GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC 3'	94°C por 5' (Desnaturação inicial) 30 ciclos: 94°C por 30'' (Desnaturação)
	16S-H2609 5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'	50°C por 1' (<i>Anealling</i>) 72°C por 2' (Extensão) 72°C por 7' (Extensão final)
COI	LCO-14905' GTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'	94°C por 5' (Desnaturação inicial) 30 ciclos 94°C por 45'' (Desnaturação)
	HCO-21985' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA3'	55°C por 50'' (<i>Anealling</i>) 72°C por 1'' (Extensão) 72°C por 10' (Extensão final)

As PCRS foram realizadas em um volume final de 25 µL utilizando os seguintes reagentes:

- 4µL de DNTPs (1,25 M) (nucleotídeos);
- 2,5 µL de solução tampão (10X);

- 0,5 µL de solução de MgCl₂ (50 mM);
- 1 µL de DNA (250 ng/ µL);
- 0,25 µL de cada primer (200 ng/ µL);
- 0,2 µL da enzima Taq polimerase (5U/ µL);
- Água de injeção para completar o volume final da reação.

Os produtos de PCRs purificados foram submetidos à reação de sequência pelo método de Sanger et al. (1977) com os seguintes reagentes e parâmetros:

- 4µL de H₂O;
- 1,5 µL de Buffer;
- 2µL de Primer (0,8 pmol/µL);
- 1,5 µL de DNA;
- 1µL de Big Dye.

Uma temperatura inicial de 96° C por 1 minuto, 35 ciclos com 96° C por 15 segundos, 50° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos. Os produtos da reação de sequência foram precipitados seguindo as etapas abaixo:

- Submeteu a placa a um spin (centrífuga de placa);
- Adicionou 2,5 µL de EDTA (125 mM);
- Vedou a placa e submeteu-se a um spin;
- Adicionou 30 µL de Etanol 100%;
- Vedou a placa e misturar invertendo 4-5x;
- Envolveu a placa em papel alumínio e deixar em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C);
- Centrifugou a 4.000 rpm por 30 minutos;
- Inverteu bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugou a placa invertida por 15s a 1.150 rpm;
- Adicionou 30 µL de Etanol a 70%;
- Vedou a placa;
- Centrifugou a 3.440 rpm por 15 s (centrífuga refrigerada 4° C);
- Inverteu bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente;
- Centrifugou a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm;
- Deixou a placa na estufa a 37° C por aproximadamente 10 minutos para evapora o excesso de álcool;

- Colocou Formamida (10 μ L) e levou a placa a 94° C por cerca de 3 minutos e colocou a placa no sequenciador automático de DNA (ABI 3500/Life Technologies) onde ocorreu a eletroforese.

ANEXO II

TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

- Fez-se duas impressões de lâmina;
- Fez-se um esfregaço do encéfalo com auxílio de um palito;
- Colocou-se as lâminas imersas em acetona por 30 minutos;
- Retirou-se da acetona deixa secar por 10 minutos;
- Adicionou-se o CVS/CCN em cada uma das impressões;
- Colocou-se na estufa por 30 minutos;
- Colocou-se na câmara úmida por 10 minutos;
- Lavou- se com SST duas vezes, sendo que na segunda lavagem deixa-se por 10 minutos;
- Lavou-se duas vezes com água destilada;
- Colocou-se para secar a temperatura ambiente;
- Gotejou-se glicerina em cada uma das marcações;
- Colocou-se a lamínula.
- Realizou-se a leitura no microscópico em luz ultravioleta.

ANEXO III

RESULTADO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZOOSE

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3334
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 160
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Dr. Hamilton Perreira Santos
Chefe LD/CRMV 0423/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZONOSES

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3360
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 71
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Chefe LDI-GRMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZOOSESES

PROCOLO / UEMA Nº: 3367
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO: CESC/UEMA/ RRM 21
ENDEREÇO: ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


J. J. Pereira Santos
CRMV 0123/MA
UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZOOSESES

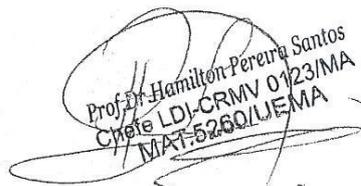
PROTOCOLO / UEMA Nº: 3371
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 100
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Cofe LDI-CRMV 0123/MA
MAT-5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZONÓSES

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3375
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO: CESC/UEMA/ RRM 103
ENDEREÇO: ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLOURESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Chefe LDI-ORMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZOOSESES

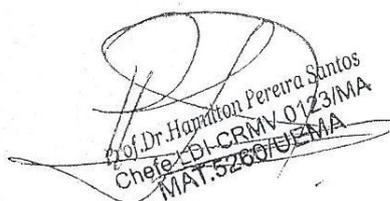
PROCOLO / UEMA Nº: 3336
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 150
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga)_____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

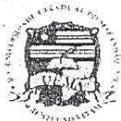
R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Perera Santos
Chefe - DI CRMV 0131MA
MAT. 52001UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZONÓSES

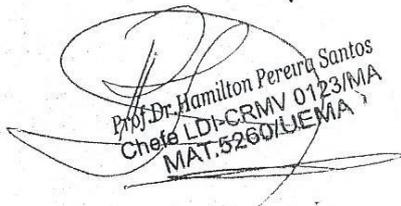
PROTOCOLO / UEMA Nº: 3338
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 171
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Chefe LDI-CRMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZOOSESES

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3350
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 55
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga)_____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016

Prof. Dr. Edmilson Pereira Santos
Chefe LCH/CRMV 0123/MA
MAT. 5280/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZONÓSES

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3361
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 20
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLOURESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Dr. Jamilton Pereira Santos
Chefe do Núcleo - CRMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZOOSE

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3378
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 91
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga)_____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLOURESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Perreira Santos
Chefe LDI-GRMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZONÓSES

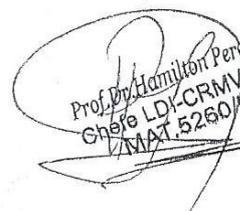
PROTOCOLO / UEMA Nº: 3380
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 29
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLUORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Chefe LDI-CRMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NÚCLEO DE ESTUDOS DE ZONNOSES

PROTOCOLO / UEMA Nº: 3385
DATA DO RECEBIMENTO: 11/07/2016
MATERIAL RECEBIDO: CEREBRO
CONSERV. /MATERIAL: GELO
ESPÉCIE: MORCEGO
PROPIETÁRIO CESC/UEMA/ RRM 25
ENDEREÇO ROTA DO VÍRUS NO MA
CIDADE/ESTADO - Caxias-MA
TELEFONE/FAX: -----
AMOSTRA-
MÉDICO VETERINÁRIO: Maria Claudene Barros (Bióloga) _____
DOENÇA SUSPEITA: RAIVA

R E S U L T A D O

1ª PROVA: IMUNOFLORESCÊNCIA NEGATIVO

2ª PROVA: BIOLÓGICA: A SER REALIZADA

SÃO LUÍS, 12/07/2016


Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
C.R.M.V. LDJ/CRMV 0123/MA
MAT. 5260/UEMA