

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biodiversidade e Saúde

PEQUENOS MAMÍFEROS EM FLORESTAS DO ACRE E SUAS TAXAS
DE INFECÇÃO POR AGENTES ZONÓTICOS ASSOCIADOS

CHARLE FERREIRA CRISÓSTOMO

Rio de Janeiro
Maio de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

CHARLE FERREIRA CRISÓSTOMO

Estudos sobre a fauna de pequenos mamíferos em florestas do Acre e suas taxas de infecção por agentes zoonóticos associados

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

Orientador (es): Prof. Dr. Paulo Sérgio D'Andrea
Prof. Dr^a Elba Sampaio de Lemos

RIO DE JANEIRO

Maio 2018

Ferreira Crisóstomo, Charle .

Estudos sobre a fauna de pequenos mamíferos em florestas do Acre e suas taxas de infecção por agentes zoonóticos associados / Charle Ferreira Crisóstomo. - Rio de Janeiro, 2018.

137 f.; il.

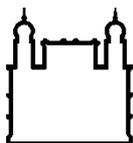
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2018.

Orientador: Paulo Sérgio D'Andrea.

Co-orientadora: Elba Sampaio de Lemos.

Bibliografia: f. 01-105

1. Amazônia. 2. Roedores. 3. Marsupiais. 4. Zoonoses. 5. Diversidade. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: CHARLE FERREIRA CRISÓSTOMO

ESTUDOS SOBRE A FAUNA DE PEQUENOS MAMÍFEROS EM FLORESTAS DO ACRE E SUAS TAXAS DE INFECÇÃO POR AGENTES ZONÓTICOS ASSOCIADOS

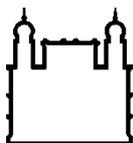
ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Paulo Sérgio D'Andrea
Prof. Dr^a. Elba Sampaio de Lemos

Aprovada em: 29/05/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Darcílio Fernandes Baptista - IOC/FIOCRUZ	(Presidente)
Prof. Dr ^a . Rosângela Rodrigues e Silva – IOC/FIOCRUZ	(Membro)
Prof. Dr ^a . Luciana dos Santos Medeiros – UFAC/AC	(Membro)
Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira – IOC/FIOCRUZ	(Suplente)
Prof. Dr ^a . Natalie Olifiers - UVA/RJ.	(Suplente)

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Charle Ferreira Crisóstomo**, sob orientação do Dr. Paulo Sergio D'Andrea e coorientado pela Dr^a. Elba Regina Sampaio de Lemos, foi aprovado em 29/05/2018, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **"ESTUDOS SOBRE A FAUNA DE PEQUENOS MAMÍFEROS EM FLORESTAS DO ACRE E SUAS TAXAS DE INFECÇÃO POR AGENTES ZONÓTICOS ASSOCIADOS"**, área de concentração: Saúde Ambiental e Humana. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Darclio Fernandes Baptista - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr^a. Rosângela Rodrigues e Silva - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Luciana dos Santos Medeiros - UFACIAC e como suplentes: Dr. Cleber Galvão Ferreira - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Natálie Olifiers - UVA/RJ.

A Pós-graduação Stricto sensu em Biodiversidade e Saúde (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Parecer n^o 162/2011 do CNE/ICES, de 15 de agosto de 2011, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 4 (quatro) segundo Ofício CTC n^o 231-5/2010 da Capes na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2018

Dr. Cleber Galvão Ferreira
Matricula SIAPE 464109
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob n^o DCE-7346/17 no livro n^o II, folha 16 em 29/05/2018

Aos meus avós, Apolinário Ferreira Campos e Edithe Ferreira Lima que em meio aos desafios dos longínquos seringais do Acre conseguiram transpor dificuldades na busca do sustento da família, sem perder de vista a importância de imprimir nos filhos o caráter necessário para formação de homens e mulheres do bem, motivos pelos quais mantenho eterna gratidão.

(Em memória)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela materialização da Fé.

À família, especialmente à esposa Erneida Dourado Crisóstomo que pacientemente acompanhou este processo, algumas vezes suportando momentos difíceis.

Aos filhos Ayrton e Adriana pela compreensão e carinho com que sempre me trataram mesmo em momentos onde não pude oferecer-lhes a melhor companhia.

Ao Instituto Federal do Acre (IFAC) e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelo firmamento do Termo de Cooperação Interinstitucional que deu origem ao Programa Especial de Doutorado.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) pela infraestrutura através dos Programas de Pós-graduações, em especial o Programa de Pós-graduação, Doutorado em Biodiversidade e Saúde.

Ao Coordenador do Programa de Doutorado em Biodiversidade e Saúde, Dr. Cleber Galvão e toda sua equipe docente.

Ao Orientador, Dr. Paulo Sérgio D'Andrea pelo aceite em participar deste Projeto, bem como pela seriedade na condução dos trabalhos, amizade desenvolvida e paciência nos processos de transferência do conhecimento, essenciais na minha capacitação.

Ao Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, coordenador do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, pelos incentivos, acolhida e disponibilidade de infraestrutura, incluindo apoio logístico e de pessoal, em especial a servidora, Msc. Michele Santos e demais colaboradores daquele setor.

A Dr^a Elba Lemos, coordenadora do Laboratório de Hantavirose e Rickettsiose pela co-orientação, bem como disponibilidade de toda sua equipe, em especial aos colegas Cristiane, Rafael, Liana, Renata, Adriana e Maria os quais agradeço o auxílio nos trabalhos de bancada e de diagnósticos.

A Dr^a. Ana Jansen, Coordenadora do Laboratório de Tripassomatídeos, e demais servidores em especial ao Dr. André Roque e Dr^a Samantha pelas orientações e acolhida em ocasiões que necessitei realizar tarefas utilizando aquela infraestrutura.

A Dr^a Rosângela Rodrigues, Coordenadora do Laboratório de Helmintos e toda sua equipe, pela recepção no curso de Pré-doutoramento e demais atividades realizadas durante os trabalhos de campo.

Aos amigos e colaboradores Dr. Bernardo Teixeira, Msc. Thiago Cardoso e Dr^a Rosana Gentile, pelo auxílio na elaboração deste projeto desde o planejamento de campo até as valiosas contribuições na redação da tese.

Aos amigos do LBPMSR, bolsistas, mestrandos e doutorandos entre os quais agradeço ao Dr. Sócrates Neto, Msc. Camila Lúcio, Msc. Jonathan Gonçalves, pela ajuda na capacitação das primeiras experiências de campo, bem como pelo auxílio nas expedições realizadas no Acre.

Aos colaboradores da Universidade Federal do Acre (UFAC), por meio do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza (CCBN), na pessoa do Coordenador Professor Dr. Carlos Garção e demais professores deste centro, Dr. Armando Calouro, Dr^a Luciana Medeiros, Dr. Moisés Souza, pelo apoio logístico e metodológico.

Ao Coordenador do Núcleo do PPbio no Acre, Dr. Marcos Silveira e toda sua equipe, especialmente aos mestrandos Daniel Costa, Martins Acosta, Juliano e João Paulo, pelo trabalho realizado na ocasião da instalação do sistema de armadilhamento, em todas as áreas do estudo.

A Coordenadora do Parque Zoobotânico (PZ/UFAC), Prof^a Cristina Boaventura e toda sua equipe, pela acolhida ao projeto e apoio logístico nos trabalhos de campo.

Aos alunos e professores do IFAC na pessoa dos Professores Paulo Ferlini e André Botelho e dos estimados bolsistas e alunos, José Wagner de Souza Cavalcante Filho, Jaime Marques Brito, Allan Drumond Almeida e Silva, Cleilson Rezende da Silva, Arbson Fernandes de Souza, Ridson Gabriel Wanderley de Melo, Letícia Braz de Souza, Jamille dos Santos Souza, Marinez Sales Ferreira e

Lansdelon de Silva Negreiros que muito me ajudaram, tanto nos trabalhos de bancada, como nas árduas expedições nas florestas do Acre.

Aos especialistas que me auxiliaram na identificação dos pequenos mamíferos, em especial a Professora Dr^a Cibele Bonvicino, Dr. Roberto Vilela, Dr. Bernardo Teixeira, Dr^a Daniele Dias, Dr^a Fabiana, MSc Tatiana Freitas e seus respectivos bolsistas Sarah Valle e Vanessa Brandão.

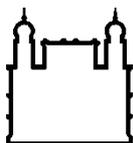
A bolsista Pibic Karine Diniz pelo especial empenho e dedicação nas exaustivas tentativas de extração e purificação de DNA de algumas espécies de *Proechimys*, trabalho que foi fundamental para chegarmos na identificação específica de algumas dessas espécies.

Aos amigos presentes da turma especial de doutoramento, pelos momentos de compartilhamento de idéias, bem como a colaboração em trabalhos de campo, em especial aos colegas Francisco Charles Santos e Paulo Ferlini.

A Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Acre, em especial as servidoras Marilene Vasconcelos e Cristinana de Lacerda, pelas vezes em que fui prontamente atendido.

A banca examinadora pelas valiosas contribuições.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDOS SOBRE A FAUNA DE PEQUENOS MAMÍFEROS EM FLORESTAS DO ACRE E SUAS TAXAS DE INFECÇÃO POR AGENTES ZONÓTICOS ASSOCIADOS

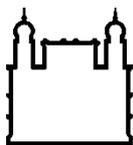
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Charle Ferreira Crisóstomo

Perturbações na dinâmica das populações de mamíferos silvestres reservatórios estão associadas à emergência e/ou re-emergência de várias zoonoses, em nível global. Esta tese teve como objetivo realizar um estudo sobre a fauna de pequenos mamíferos e seus agentes zoonóticos associados, em sete áreas de florestas com diferentes graus de conservação, no estado do Acre. Três destas áreas (Floresta do Parque Zoobotânico-FPZ, Reserva Florestal Humaitá-RFH e Floresta do Seringal Cachoeira-FSC) foram selecionadas para estudos comparativos sobre a composição da fauna e a preferência de habitat, bem como a utilização do estrato vegetal pelos pequenos mamíferos. Os animais foram capturados a partir de oito expedições entre os anos de 2013 a 2016. Foram capturados 534 espécimes de mamíferos, representando 7 ordens e 11 famílias, em particular, 321 espécimes de roedores, pertencentes a quatro famílias e 20 espécies, e 202 espécimes de marsupiais. Entre os roedores, as análises moleculares e cariotípicas indicaram que as espécies aqui chamadas de *Proechimys* aff. *gardneri* e *Oecomys* sp. podem representar unidades taxonômicas distintas. Além disso um novo cariótipo foi encontrado para *Neacomys* chamado nesse estudo de *Neacomys* aff. *musseri*. Entre os marsupiais, foi ampliada a distribuição da espécie *Monodelphis peruviana* para as terras baixas da Amazônia do oeste brasileiro, no estado do Acre. Dois dentre 88 roedores apresentaram sororeatividade para hantavírus (*Hylaeamys yunganus* e *Neacomys spinosus*), ambos já reportados com hantavírus na Amazônia peruana. Este é o primeiro registro de infecção por *Bartonella* spp. em marsupiais (*Marmosops ocellatus*), bem como nos

roedores *Euryoryzomys macconnelli*, *Neacomys spinosus* e *Proechimys aff. gardneri*. Apenas a espécie *H. yunganus* já havia sido reportada infectada por *Bartonella* no Peru. As análises também forneceram o primeiro registro de infecção por *Bartonella* em marsupiais (*Marmosops ocellatus*), bem como os roedores *Euryoryzomys macconnelli*, *Neacomys spinosus* e *Proechimys aff. Gardneri*. A *Bartonella* só havia sido registrada anteriormente em *H. yunganus*, do Peru. Pequenos mamíferos foram mais diversificados e abundantes em áreas com menor perturbação antropogênica (FSC e RFH), e menos diversificada e abundante na FPZ, a área mais perturbada. A perturbação humana parece estar mudando a biodiversidade encontrada no FPZ. Este estudo confirma o alto valor biológico e complexidade taxonômica das diversas espécies de pequenos mamíferos do Acre, além de apontar para a necessidade de mais estudos sobre a transmissão de hantavírus e bartonelas na Amazônia Ocidental.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDIES OF THE SMALL MAMMAL FAUNA OF FORESTS IN THE BRAZILIAN STATE OF ACRE AND INFECTION RATES BY ASSOCIATED ZONOTIC AGENTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Charle Ferreira Crisóstomo

The disturbance of the population dynamics of a mammalian reservoir may result in the emergence and/or re-emergence of a zoonosis at a global level. This thesis investigated the small mammal fauna and its associated zoonotic agents in seven forested areas in the Brazilian state of Acre, representing varying degrees of conservation. Three of these areas (the Zoobotanical Park Forest-FPZ, Humaitá Forest Reserve-RFH and Seringal Cachoeira Forest-FSC) were selected for comparative studies of the species composition of the small mammals and their habitat preferences, as well as the use of the different forest strata. The mammals were captured during eight field excursions between 2013 and 2016. We captured a total of 534 specimens, representing 7 orders and 11 families, including 321 rodents, belonging to four families and 20 species, and 202 marsupials. Molecular and karyotype analyses of two rodents, denominated here as *Proechimys* aff. *gardneri* and *Oecomys* sp., indicate the possible existence of distinct taxonomic units. A new karyotype was also recorded for *Neacomys*, with the specimens being designated *Neacomys* aff. *musseri*. The data on the marsupials indicated an expansion of the geographic distribution of *Monodelphis peruviana* to the lowland Amazon region of western Brazil (Acre state). Two of the 88 rodents tested presented seroreactivity for the hantavirus, as reported previously for both species (*Hylaeamys yunganus* and *Neacomys spinosus*) in the Peruvian Amazon. The analyses also provided the first record of infection by *Bartonella* spp. in marsupials (*Marmosops ocellatus*), as well as the rodents *Euryoryzomys macconnelli*, *Neacomys spinosus* and *Proechimys* aff.

gardneri. Bartonella had only been recorded previously in *H. yunganus* from Peru. Small mammals were more diverse and abundant in areas with least anthropogenic disturbance (FSC and RFH), and least diverse and abundant in the FPZ, the most disturbed area. Human disturbance appears to be changing the biodiversity found in the FPZ. This study confirms the high biological value and taxonomic complexity of several species of small mammals in Acre, besides pointing to the need for further studies on the transmission of hantavirus and bartonella in the Western Amazon.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Diversidade de Pequenos Mamíferos Não-voadores.....	24
1.2 Fauna de Pequenos mamíferos não-voadores do Acre.....	24
1.3. Participação de pequenos mamíferos no ciclo de transmissão de zoonoses	26
2. BREVE REVISÃO SOBRE AS ZONNOSES DO ESTUDO.....	29
2.1 Hantavirose.....	29
2.1.1 Agente etiológico.....	29
2.2 Bartonelose.....	32
2.2.1 Agente etiológico.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 O Estado do Acre.....	35
4.2. Seleção das áreas de estudo.....	36
4.3 Descrição das áreas do estudo.....	39
4.3.1 Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ).....	39
4.3.2. Floresta do Seringal Cachoeira (FSC).....	42
4.3.3. Reserva Florestal do Humaitá (RFH).....	44
4.3.4. Ramal Prof ^a . Lucila, Rodovia AC-10, Km20.....	45
4.3.5. Floresta Experimental Catuaba (FEC).....	47
4.3.6. Projeto Assentamento Nova Cintra (PNC).....	47
4.3.7 Capixaba.....	47

4.3.8	Brasiléia.....	48
4.4	Logística das expedições e esforço de captura	48
4.5	Desenho Amostral.....	50
4.5.1	Distribuição das armadilhas e técnicas de armadilhamento	50
4.6	Coleta das variáveis ambientais para comparação das três áreas de estudo (RFH, FPZ e FSC)	51
4.6.1	Análise dos dados para as variáveis ambientais e diversidade de espécies	53
4.6.2	Comparação entre as três áreas de estudo (RFH, FPZ e FSC)	53
4.7	Captura e procedimentos com os animais	55
4.7.1	Tipos de iscas.....	55
4.7.2	Transporte, contenção e coleta biométrica.....	55
4.8	Coleta do material biológico	56
4.9	Estabelecimento da Coleção Científica dos Pequenos Mamíferos	57
4.10	Biossegurança	58
4.11	Considerações Éticas.....	59
4.12	Taxonomia: Técnicas utilizadas para identificação dos espécimes	59
4.12.1	Morfologia externa e craniana	59
4.12.2	Cariotipagem	59
4.12.3	Análise molecular da diversidade de espécies de roedores do estado do Acre.....	60
4.12.4	Análise molecular da diversidade de espécies de marsupiais do gênero <i>Monodelphis</i> spp do estado do Acre	62
4.13	Testes de infecções associadas aos pequenos mamíferos	65
4.13.1	Análise sorológica para detecção de infecção por hantavírus.....	65
4.13.2	Análise molecular para detecção de infecção por <i>Bartonella</i> spp.....	67
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1	Estabelecimento da coleção científica de pequenos mamíferos para o estado do Acre.....	69

5.2	Técnicas de identificação das espécies	75
5.3	Levantamento de espécies de mamíferos.....	78
5.3.1	Roedores	79
5.3.2	Marsupiais	87
5.4	Diagnóstico de infecção por Hantavirus	92
5.5	Diagnóstico de infecção por <i>Bartonella</i>	94
5.6	Comparaçãõ da abundância, riqueza e equitabilidade dos pequenos mamíferos, sobre a influência do habitat, nas três áreas comparáveis (FPZ, RFH e FSC)	98
6.	CONCLUSÃO	108
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8.	ANEXOS.....	130
8.1	Formulário para coleta de informações sobre Micro e Meso Habitat	130
8.2	Licença Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ)	131
8.3	Licença Permanente para captura em território nacional	132
8.4	Formulário para coleta de dados biométricos e material biológico ...	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de hantavírus não-patogênicos ou de patogenicidade desconhecida (em azul) e patogênicos (em vermelho) descritos nas Américas Os hantavírus identificados em *Soricomorpha* (musaranhos e toupeiras) estão sublinhados (Hjelle & Torres-Pérez 2010).

Figura 2. Localização do estado do Acre e suas Regionais Geopolíticas, na América do Sul e Brasil.

Figura 3. Localização geográfica, por municípios e localidades, das oito áreas selecionadas para o estudo dos pequenos mamíferos no estado do Acre. (1) Áreas que fizeram parte do estudo comparativo; (2) Áreas inseridas para compor o levantamento de espécies de pequenos mamíferos.

Figura 4. Floresta do Parque Zoobotânico, UFAC, com a localização dos transectos para coleta dos pequenos mamíferos (A, B, C D e E).

Figura 5. Principais tipologias florestais da Floresta do Parque Zoobotânico, UFAC: (A) floresta ombrófila aberta de palmeiras; (B) floresta ombrófila aberta de palmeiras, com bambú dominado; e (C) floresta ombrófila aberta com bambú dominante.

Figura 6. Floresta do Seringal Cachoeira - FSC, com a localização dos transectos para coleta dos pequenos mamíferos (A, B, C D e E).

Figura 7. Reserva Florestal Humaitá - RFH, com a localização dos transectos para coleta dos pequenos mamíferos (A, B, C D e E).

Figura 8. Projeto de Assentamento Dirigido Humaitá, com a localização do Ramal Prof. Lucinda – km 20.

Figura 9. Transecto linear. Distribuição e caracterização das armadilhas utilizadas no estudo. SH = Sherman G. (43 x 12,5 x 14,5cm); Sh = Sherman P. (30 x 8 x 9cm); Tw = Tomahawk (40 x 12 x 12cm).

Figura 10. Instalação das armadilhas do tipo live traps, em transectos lineares nos diferentes estratos da vegetação, para captura de pequenos mamíferos. A = dossel (sherman G); B= sub-bosque (sherman P) e C= solo (tomahawk).

Figura 11. Utilização de armadilhas Pitfall em formato radial (Y), instaladas ao fim de cada transecto de armadilhas live traps, para captura de pequenos mamíferos.

Figura 12. Utilização do instrumento para medição da porcentagem de obstrução foliar vertical (OFV) observada na cobertura de dossel

Figura 13. Preparo da isca composta por uma mistura de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim, utilizada na captura dos pequenos mamíferos.

Figura 14. A) Instalações do laboratório de campo para eutanásia dos pequenos mamíferos capturados e obtenção das amostras biológicas; B) Contenção de um roedor; e C) Anestesia de um roedor.

Figura 15. Procedimentos realizados no laboratório de campo nos pequenos mamíferos capturados. A= Punção Cardíaca, B= Retirada de órgãos e tecidos para diagnóstico de infecções, e C= Coleta de amostras de fígado para obtenção de DNA dos pequenos mamíferos.

Figura 16. Taxidermia e preparação dos esqueletos dos pequenos mamíferos. (A) Preenchimento das peles com algodão hidrofóbico; (B) Preparação de esqueletos para limpeza em colônia de Dermestes sp.; (C) Secagem de peles de marsupiais após processo de taxidermia.

Figura 17. Utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) nível 3 de biossegurança utilizados no manuseio e nas necropsias dos pequenos mamíferos, realizados nos laboratórios estabelecidos no campo. (A) Máscara de pressão positiva; (B) Jaleco impermeável; (C) Filtro P3 de ar motorizado; e (D) Luvas de látex para procedimento.

Figura 18. Localização dos espécimes utilizados nas análises moleculares sobre a diversidade de espécies de *Monodelphis* spp. que ocorrem no Acre. (1) *M. glirina*, *M. peruvia* e *M. emiliae*; (2) *Monodelphis peruviana*; (3) *M. glirina*; (4) *M. glirina* e *M. emiliae*; (5) *M. glirina*

Figura 19. Coleção científica do LABPMR, IOC/FIOCRUZ onde está depositado o acervo de espécimes de mamíferos provenientes do Acre. A) Armários para acomodações de peles e esqueletos; B) Gaveta com peles e esqueletos de roedores organizados por gênero.

Figura 20. Mamíferos coletados no estado do Acre, no período de 2013 a 2016, de acordo com as sete ordens identificadas no estudo.

Figura 21. Roedores coletados no estado do Acre, no período de 2013 a 2016, de acordo com as quatro famílias identificadas.

Figura 22. Técnicas utilizadas na identificação em nível específico dos pequenos mamíferos capturados no estado do Acre, período de 2013 a 2016. MF (Morfologia), MO (análise molecular), CA (análise citogenética).

Figura 23. Cariótipos de (A) *Mesomys hispidus* $2n=60$ e $NFa=116$, Macho LBCE18470 de Porto Acre/AC, (B) *Oligoryzomys microtis* $2n=64$ e $NFa=66$, Macho LBCE18403 de Porto Acre/AC, (C) *Neacomys aff. musseri* $2n=36$ e $NFa=62$, Macho LBCE18429 de Xapuri/AC, (D) *Proechimys brevicauda* $2n=28$ e $NFa=48$, Macho LBCE18406 de Porto Acre/AC, (E) *Proechimys simonsii* $2n=32$ e $NFa=56$, Fêmea LBCE18374 de Rio Branco/AC, (F) *Proechimys aff. gardneri* $2n=36$ e $NFa=58$, Fêmea LBCE18425 de Xapuri/AC.

Figura 24. Cariótipos de (A) *Oecomys bicolor* $2n=80$ e $NFa=134$, Macho LBCE18487 de Porto Acre/AC, (B) *Oecomys* sp. $2n=90$ e $NFa=104$, Macho LBCE18519 de Xapuri/AC, (C) *Hylaeamys perenensis* $2n=52$ e $NFa=62$, Fêmea LBCE 18427 de Xapuri/AC, (D) *Neacomys spinosus* $2n=64$ e $NFa=68$, Macho LBCE 18840 de Porto Acre/AC, (E) *Proechimys aff. gardneri* $2n=38$ e $NFa=58$, Macho LBCE 19813 de Porto Acre/AC.

Figura 25. Distribuição do número de espécimes, por espécie, de roedores coletadas no estado do Acre, no período de 2013 a 2016.

Figura 26. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta FastTree 2.1 implementada no programa Geneious 9 com o modelo evolutivo GTR+G) de sequências completas do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Proechimys simonsi*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

Figura 27. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta FastTree 2.1 implementada no programa Geneious 9 com o modelo evolutivo GTR+G) de sequências completas do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Proechimys brevicauda*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

Figura 28. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta FastTree 2.1 implementada no programa Geneious 9 com o modelo evolutivo GTR+G) de sequências completas do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Proechimys gardneri*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

Figura 29. Distribuição do Gênero *Neacomys* no estado do Acre e variação cariotípica da espécie capturada no leste do estado (*Neacomys* aff. *musseri* ($2n = 36$ e $NFa = 62$) comparada a espécie *N. musseri* ($2n=34$ e $NFa=64-68$), encontrada por Patton *et al.*, 2000 no oeste do Acre.

Figura 30. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta PHYML implementada no programa PHYML com o modelo evolutivo HKY+I+G) de sequências parciais do gene mitocondrial da citocromo *b* do gênero *Oecomys*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste aLRT/SH-like (approximate likelihood ratio test). Em

destaque em vermelho: Clado representando *Oecomys* sp., *Oecomys bicolor* e o grupo irmão *Oecomys cleberi*.

Figura 31. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta PHYML implementada no programa PHYLIP com o modelo evolutivo HKY+I+G) de sequências parciais do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Oecomys gr. bicolor* e *Oecomys* sp.. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste aLRT/SH-like (approximate likelihood ratio test). Em destaque em vermelho: Clado representando a provável nova espécie *Oecomys* sp..

Figura 32. Distribuição do número de espécimes, por espécie, de marsupiais coletados no estado do Acre, no período de 2013 a 2016.

Figura 33. Topologia de máxima verossimilhança de *Monodelphis* com sequências do citocromo *b*, baseada no modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985), distribuição gama e sítios invariáveis.

Figura 34. Registro e ampliação da distribuição de *M. peruviana*, para as terras baixas da Amazônia do oeste brasileiro, no estado do Acre. RFH – Reserva Florestal Humaitá, Porto Acre; FPZ – Floresta Parque Zoobotânico, Rio Branco; PE – Peru; BO– Bolívia; BR – Brasil.

Figura 35. Topologia de Máxima Verossimilhança (implementado na ferramenta PhyML com o modelo evolutivo T92+G) da sequência parcial do gene *gltA* (731pb) de *Bartonella* spp. Números próximos aos nós indicam o valor do suporte por bootstrap (1.000 réplicas). Em negrito as sequências geradas no presente estudo.

Figura 36. Curvas de acúmulo de espécies por rarefação individual considerando: A = As 3 áreas: Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaitá (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri; B = FPZ; C = RFH e D = FSC.

Figura 37. Análise da diversidade de espécies de pequenos mamíferos através de Escalonamento Multidimensional não Métrico (nMDS) para os transectos de cada área estudada: Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, no Estado do Acre, Brasil.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Esforço utilizado na captura dos pequenos mamíferos no período de 2013 a 2016, nas áreas de estudo no estado do Acre. Amardilhas/noite: SL= solo; SB= sobosque; DS= dossel; PT= pitfall.

Tabela 01. Lista das espécies de mamíferos capturadas, no período de 2013 a 2016, discriminando a quantidade de espécimes encontrada nos sete municípios de estudo no estado do Acre.

Tabela 02. Espécies de pequenos mamíferos cariotipadas, do estado Acre, discriminando o número cromossômico diplóide ($2n$), número fundamental autossômico (NFa), cromossomo sexual feminino (X), cromossomo sexual masculino (Y), morfologia dos cromossomos (dois braços (M), um braço (A)). Localidade de coleta XA =Xapuri; PO=Porto Acre; SG=Senador Guiomard; RA=Rodrigues Alves; RB=Rio Branco.

Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva (%) sobre pares de seqüências entre grupos (Gp). O número de diferenças de base por site da média de todos os pares de seqüências entre grupos é mostrado.

Tabela 4. Lista das espécies analisados para infecção por Hantavirus, discriminando a localidade de captura no estado do Acre, quantidade de espécimes analisados e resultados das análises moleculares (PCR)

Tabela 5. Lista das espécies analisados para infecção por *Bartonella* spp., discriminando a localidade de captura no estado do Acre, quantidade de espécimes analisados e resultados das análises moleculares (PCR)

Tabela 6. Espécies capturadas e número de indivíduos de pequenos mamíferos por estação do ano, estrato vertical da vegetação em três áreas florestais, no Estado do Acre, Brasil.

Tabela 7. Índices de Riqueza (S), abundância (A) e equitabilidade (E) de espécies de pequenos mamíferos por estação do ano e estrato da vegetação, em três áreas florestais: Floresta Parque Zoobotânico, Rio Branco (FPZ), Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, estado do Acre, Brasil.

Tabela 8. Valores da estimativa de riqueza de espécies de pequenos mamíferos por Jackknife de primeira ordem para as áreas da Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, e para o total, no Estado do Acre, Brasil.

Tabela 9. Modelos Lineares Generalizados para investigação dos efeitos do habitat na abundância e riqueza de pequenos mamíferos em três localidades do Estado Acre, Brasil. AICC – Critério de Informação de Akaike corrigido, $\Delta AICc$ – diferença entre o AICc do modelo em questão para o melhor modelo, AICcWt – peso do AICc, K – parâmetros. Foram considerados modelos plausíveis os que apresentaram $\Delta AICc < 2$.

Tabela 10. Índices de heterogeneidade e complexidade do habitat calculados para cada transecto de cada área estudada: Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, no Estado do Acre, Brasil.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARAV-N:	Nucleocapsídeo do hantavírus Araraquara
CCB:	Centro de Ciências Biológicas
DO:	Densidade ótica
DS:	Dossel
EPI:	Equipamentos de proteção individual
FEC:	Floresta Experimental Catuaba
FIOCRUZ:	Fundação Oswaldo Cruz
FPZ:	Floresta do Parque Zoobotânico
FSC:	Floresta do Seringal Cachoeira
HCPS:	Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus
HFRS:	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
IFAC:	Instituto Federal do Acre
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
INCRA:	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
INPA:	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IOC:	Instituto Oswaldo Cruz
LABPMR:	Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios
LMIV	Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária
LHR:	Laboratório de Hantavirose e Rickettsiose
MFC:	Manejo Florestal Comunitário
MT-CYB:	Gene mitocondrial da citocromo b
nMDS:	Análise de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico
OFV:	Obstrução Foliar Vertical

PAD:	Projeto de Assentamento Dirigido Humaitá
PAECM:	Projeto de Assentamento Agroextrativista Chico Mendes
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
PFNM's:	Produtos Florestais não madeireiros
PNC:	Projeto de Assentamento Nova Cintra
PPBio:	Programa de Pesquisa em Biodiversidade
PT:	Pitfall
PZ:	Parque Zoobotânico
RAINFOR:	Rede Amazônica de Inventários Florestais
RFH:	Reserva Florestal do Humaitá
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SB:	Sub-bosque
SETEM:	Setor de Uso da Terra e Mudanças Climáticas
SH:	Sherman
SL:	Solo
TW:	Tomahawk
UEL:	Universidade Estadual de Londrina
UEM:	Universidade Estadual de Maringá
UFAC:	Universidade Federal do Acre
UFRJ:	Universidade Federal do Rio de Janeiro
ZEE/AC:	Zoneamento Ecológico Econômico do Acre

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diversidade de Pequenos Mamíferos Não-voadores

A última compilação sobre a fauna de mamíferos no planeta apresenta o Brasil como o país com a fauna mais rica do mundo, com mais de 701 espécies conhecidas em todo território nacional (Paglia *et al.*, 2012). As condições climáticas, a história geológica da América do Sul e a variedade de fisionomias vegetais estão diretamente associadas a essa grande diversidade (Patterson e Costa 2012). Entretanto, a diversidade de mamíferos no Brasil não se apresenta homogênea. Entre as ordens de mamíferos, por exemplo, a ordem Rodentia é a mais diversificada e constitui 34,7% das espécies brasileiras, seguida da ordem Chiroptera com 24,8%, Primatas 16,8% e Didelphimorphia 7,9% (Paglia *et al.*, 2012).

Entre os biomas brasileiros, a Amazônia é a mais diversa, sendo o berço de quase 400 espécies de mamíferos, dos quais 231 são endêmicas (Paglia *et al.*, 2012). As florestas neotropicais mantêm as comunidades mais ricas de mamíferos do mundo e, entre elas, a floresta da Amazônia ocidental que provavelmente é a mais rica desse bioma (Voss e Emmons, 1996; Patton *et al.*, 1997, 2000; Voss *et al.*, 2001). Atualmente 113 espécies de pequenos mamíferos não-voadores já foram registradas na Amazônia brasileira, sendo 39 marsupiais e 74 roedores das famílias Cricetidae e Echimyidae (Mendes-Oliveira *et al.*, 2015).

1.2 Fauna de Pequenos mamíferos não-voadores do Acre

O estado do Acre, localizado no sudoeste da bacia amazônica, abriga alta diversidade para muitos taxons como por exemplo, palmeiras, borboletas, sapos, pássaros, entre outros (Souza *et al.*, 2003). Nesse contexto, o Acre é considerado uma das regiões Neotropicais de alta importância para a conservação da biodiversidade, com alta prioridade para levantamentos da vida silvestre (Souza *et al.*, 2003; Souza 2009). Entretanto, sobre a investigação da mastofauna na região, ainda são poucos os estudos que permitam a compreensão e a evolução dos ecossistemas e da sua biodiversidade. De acordo com Souza *et al.*, 2003, a maioria dos estudos sobre a fauna local pode ser caracterizada como estudos pontuais na condução de processos para consolidação de unidades de conservação (Alho, 1990; Imac, 1992; Ferreira, 1996; Nogueira, et al., 1997; Funtac, 1997; Chaves, 1999; Calouro, 1999) ou investigação do impacto da caça de subsistência em áreas de comunidades

tradicionais (Martins, 1993; Calouro, 1995, Medeiros, 1998; Rosas *et al.* 2009). Seguindo linha semelhante, trabalhos como o de Botelho *et al.*, (2012) e Borges *et al.*, (2015) investigaram a abundância e a riqueza de mamíferos de médio porte, capturados em áreas de florestas primárias, em relação à lista de animais ameaçados de extinção. Outros trabalhos como o de Taddei *et al.* (1990), Nogueira *et al.* (1997) e Calouro *et al.* (2010) focaram no levantamento de espécies de quirópteros em fragmentos de florestas urbanas.

Com relação à fauna específica de pequenos mamíferos, poucos são os estudos até agora desenvolvidos no Acre. Os primeiros registros são descritos por Vieira (1952) e por Carvalho (1957) em expedições realizadas pelos Museus Emílio Goeldi e Museu Nacional do Rio de Janeiro, respectivamente. Entre os estudos com maior robustez metodológica e densidade amostral, encontra-se o inventário realizado por Patton *et al.*, (2000) ao longo do Rio Juruá. Além desses, trabalhos mais recentes (Bernarde e Machado, 2008; Prado e Percequillo, 2013; Freitas *et al.* 2013; Nunes-Lavocat *et al.*, 2015; Abreu-Junior *et al.*, 2016) apontam para a lacuna de amostragem existente e para a necessidade de novos estudos na região, sobretudo ao leste do Acre, onde supostamente a riqueza faunística diminui, quando comparada a regiões mais a oeste do estado (Abreu-Junior, *et al.*,2016).

Conforme apontado por Vivo (1996), levantamentos faunísticos são a única maneira de avaliar de forma sistemática e com precisão a diversidade de espécies locais. Tais estudos contribuem para o conhecimento das distribuições das espécies e fornecem informações fundamentais para compreensão da variação morfológica e da história evolutiva de determinados taxons. Os levantamentos “in loco”, especialmente em áreas ainda não muito estudadas (parques, reservas extrativistas, florestas primárias, entre outras), desempenham um papel essencial na conservação da biodiversidade (Peres 2005; Silva, 2005). Conforme destacado por Peres (2005), as estratégias de conservação e gerenciamento de áreas naturais exigem uma compreensão da funcionalidade do ecossistema e, portanto, um conhecimento aprofundado da diversidade de espécies locais. No contexto deste trabalho, considera-se que o estudo das comunidades silvestres de pequenos mamíferos, além de importante ferramenta para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação de áreas naturais, também pode auxiliar em questões de saúde pública, como por exemplo, a participação desses animais no ciclo de transmissão de zoonoses.

1.3. Participação de pequenos mamíferos no ciclo de transmissão de zoonoses

Zoonoses são doenças infecciosas naturalmente transmitidas entre homens e outros animais vertebrados (WHO, 2011). Suas emergências ou reemergências, na maioria das vezes estão associadas às alterações ambientais pelo contínuo processo de interiorização das atividades humanas, muitas vezes associado ao desmatamento e à fragmentação da paisagem (Schmidt, 2007; Aguirre e Tabor, 2008). Estes eventos têm provocado grandes mudanças nos habitats naturais, afetando diretamente a estrutura das comunidades e demografia de animais e plantas (Pardini *et al.*, 2005).

Desta forma, as diversas agressões que o homem vem sistematicamente praticando contra o meio ambiente, tem produzido condições para a disseminação de patógenos e a existência de ambientes perturbados e degradados, propícios ao aparecimento de novas doenças. Perturbações ambientais, principalmente nas áreas de interface entre ambientes peri-urbanos, rurais e ambientes silvestres, têm alterado os padrões de diversidade e abundância das espécies, possibilitando, em sequência, o incremento das densidades de espécies generalistas e/ou oportunistas; e assim influenciando a dinâmica natural dos ciclos silvestres de parasitas (Schmidt e Ostfeld, 2001; Keesing *et al.*, 2010). Com isso, há um aumento da probabilidade de contato das populações humanas com enzootias e/ou epizootias, antes restritas apenas a ambientes silvestres (Kruse *et al.*, 2004). Este processo de emergência de novas doenças ou recrudescimento de outras previamente controladas (reemergência), principalmente de origem zoonótica, é em grande parte relacionado a mamíferos silvestres (Mills e Childs, 1998; Sutherst, 2004).

No caso dos pequenos mamíferos, destaca-se que muitos desses animais, mesmo sendo silvestres, desenvolvem certo grau de “domesticação”, também conhecida como sinantropia, que é a capacidade de algumas espécies se adaptarem ao peridomício. Essa característica potencializa o contato desses animais com animais domésticos, bem como o risco de infecção de eventuais zoonoses e sua transmissão para humanos. Este fenômeno é observado frequentemente em zonas rurais, áreas de interface urbana/silvestre e ou áreas de florestas habitadas, uma das principais características das florestas descritas neste estudo (Acre, 2006).

A literatura relata várias espécies de roedores silvestres considerados como potenciais reservatórios de diversas zoonoses, como a peste (Carvalho *et al.*, 2001; Moraes *et al.*, 2003) esquistossomose (Rodrigues-Silva *et al.*, 1992; D’Andrea *et al.*,

2000), leishmaniose (Brandão-Filho *et al.*, 2003), a doença de Chagas, (Vaz *et al.*, 2007), hantavíroses (Lemos *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2011; Firth *et al.*, 2012), bartoneloses (Gonçalves *et al.*, 2016; Rozental *et al.*, 2017), entre outras.

De modo geral, a proximidade de humanos com áreas silvestres potencializa transmissão de zoonoses. Fatores como o tipo de uso e ocupação do solo têm uma importância considerável na dinâmica dessas doenças, sobretudo nos estados da Amazônia Legal, merecendo assim mais estudos que possam analisar não somente o perfil do agravo na região, mas também a sua dinâmica no espaço e tempo (Santos *et al.*, 2012)

No estado do Acre, a expansão da agropecuária extensiva, a construção de estradas e, por último, a construção de hidrelétricas em sua vizinhança, têm impulsionado o avanço do desmatamento na região especialmente ao leste do estado onde se concentra a maior parte da população. Segundo Santos *et al.*, (2012), esses fenômenos contribuem para aumentar a ocorrência de zoonoses, sendo uma tendência já observada para região norte (Sinan, 2017). Segundo Pignatti (2004), os habitats que foram alterados pelas atividades humanas ou naturais são mais vulneráveis, pois quando predadores e competidores são eliminados, oportunidades para novas espécies se instalarem são criadas.

A atual expansão mundial da malária e, particularmente no Brasil, a reemergência da febre amarela são alguns dos vários exemplos de zoonoses emergentes e reemergentes que possuem correlação direta ou indireta comprovada com alterações ambientais, situação essa, que se apresenta ao mesmo tempo como um risco à saúde humana e um desafio sem precedentes (Schmidt, 2007; Aguirre e Tabor, 2008). Em alguns municípios do Acre essa realidade tem se tornado um problema de saúde pública. Em Mâncio Lima, um município com cerca de 16 mil habitantes, a malária, considerada uma zoonose com menor índice de letalidade, registrou mais de 9 mil casos no ano 2017 (Barbosa, 2018). A emergência de outras zoonoses como a bartonelose, ou outras com maiores taxas de morbidade e letalidade, como a hantavirose, poderiam agravar ainda mais este quadro epidemiológico, dada a falta de experiência prévia dos profissionais de saúde com essas doenças e a semelhança de seus sinais e sintomas com diferentes doenças endêmicas e de elevada prevalência

Apesar do Acre não ter notificado, até o momento nenhum caso clínico de bartonelose e hantavirose, é um estado que apresenta condições adequadas para

acelerar suas disseminações, após sua emergência. Cabe enfatizar que o território do Acre é formado por 85% de florestas nativas e apesar da maior parte da sua população concentrar-se em áreas urbanas (66,6%), parte significativa da população vive em zona rural, ou residem na interface de ecossistemas nativos, fazendo uso dos produtos dessas florestas (Acre, 2006). Além disso, é pertinente considerar que a espécie do roedor silvestre sigmodontíneo, *Oligoryzomys microtis*, principal reservatório do genótipo de hantavírus Rio Mamoré (RIOMV), que ocorre nos estados do Amazonas e Rondônia (Firth *et al.*, 2012), foi identificada recentemente como sororreagente no estado do Acre (Nunes-Lavocat, *et al.*, 2015), evento que reforça a necessidade de estudos com abordagens ecoepidemiológicas.

A proposta principal do trabalho foi realizar um estudo sobre a diversidade de pequenos mamíferos no estado do Acre, apresentando os principais problemas taxonômicos das espécies observadas e, assim, quando possível, contribuir com a biogeografia destas espécies. Não obstante, espera-se que outras questões relacionadas à sistemática e à taxonomia de pequenos mamíferos na Amazônia possam ser apontadas neste trabalho, com aumento do nosso conhecimento quanto à identificação de novos táxons de hospedeiros e os potenciais agentes etiológicos associados.

Assim sendo, diante da hipótese de que hantavirose e bartonelose sejam zoonoses com potencial para emergência no Acre, e cujo ciclo de transmissão envolve pequenos mamíferos, a investigação de hantavírus e bartonelas será objeto de estudo neste trabalho. Nessa perspectiva, se vislumbra que resultados sobre a taxonomia dos animais capturados, bem como a presença desses agentes infecciosos nestes vertebrados nas áreas em estudo possam auxiliar nas tomadas de decisões sobre ações de prevenção e de controle de zoonoses no estado, bem como na construção do conhecimento sobre a diversidade da fauna nas áreas estudadas, com possibilidade de usar os pequenos mamíferos como indicadores do estado de conservação dessas áreas e de risco de emergência de zoonoses.

2. BREVE REVISÃO SOBRE AS ZONOSSES DO ESTUDO

2.1 Hantaviroses

Entre as zoonoses emergentes, cujo ciclo de transmissão envolve pequenos mamíferos, uma das mais importantes registradas no Brasil é a hantavirose. A hantavirose é uma doença emergente de ampla distribuição pelo mundo, que pode apresentar diferentes quadros clínicos. Alguns membros do gênero *Hantavirus* não são patogênicos ao homem, mas muitos causam graves doenças como a febre hemorrágica com síndrome renal (HFRS) no Velho Mundo, e a síndrome pulmonar por hantavírus (SPH), também identificada como síndrome cardiopulmonar por hantavirus (HCPS) no continente americano. A primeira identificação de hantavírus em roedores no Brasil ocorreu em 1982 no estado do Pará e o roedor infectado era da espécie *Rattus norvegicus* (LeDuc *et al.*, 1985) e os primeiros casos de HCPS ocorreu em São Paulo no ano de 1993 (Silva, *et al.*, 1997). Embora um número crescente de HCPS venha sendo diagnosticado no Brasil, desde a primeira descrição, ainda há muito a se conhecer sobre os possíveis reservatórios de hantavírus (Oliveira *et al.*, 2011). Até a presente data, foram notificados mais de 2061 casos da SPH em 16 unidades federativas brasileiros, entre os quais Amazonas e Rondônia, fronteira com o Acre, com 813 óbitos, uma letalidade média de 40% (Brasil, 2018; Santos *et al.*, 2012).

2.1.1 Agente etiológico

O agente causador das hantaviroses pertence à família Bunyaviridae, e compreende mais de 300 vírus distintos incluídos nos gêneros *Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Hantavirus*. A maioria destes vírus é transmitida por mosquitos, carrapatos ou flebótomos e mantida na natureza como enzootias, com exceção dos hantavirus que são transmitidos por roedores (LeDuc, *et al.*, 1985; Iversson *et al.*, 1994; Mills *et al.*, 1995; Schmaljohn e Hjelle, 1997; Morelli *et al.*, 2004;; Padula *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004). Os hantavírus causadores da SPH e FHSR determinam uma infecção crônica, persistente e aparentemente assintomática nos roedores, tornando-os reservatórios em habitats ecológicos distintos (LeDuc, 1987; Tsai, 1987; Calderón *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2004; Padula *et al.*, 2004). Após a descoberta dos casos da SPH no continente americano, outros hantavírus associados com

roedores passaram a ser identificados, possibilitando o reconhecimento de novos vírus e novas espécies de reservatórios amplamente distribuídas nas Américas, incluindo musaranhos e topeiras, até a presente data sem associação com doença humana (Figura 2.1).



Figura 1. Distribuição de hantavírus não patogênicos ou de patogenicidade desconhecida (em azul) e patogênicos (em vermelho) descritos nas Américas. Os hantavírus identificados em Soricomorpha (musaranhos e toupeiras) estão sublinhados (Torres-Pérez *et al.*, 2010).

No Brasil, além do vírus Seoul, associado à FHSR já foram identificados cinco hantavírus associados com doença humana: os hantavírus Juquitiba e Araraquara relacionados aos roedores *Oligoryzomys nigripes* e *Necromys lasiurus* respectivamente; Anajatuba associado à espécie *Oligoryzomys fornesi*; Castelo dos Sonhos no roedor da espécie *Oligoryzomys utiaritensis*, Laguna Negra no roedor *Calomys callidus* e o hantavírus Rio Mamore em roedores da espécie *Oligoryzomys microtis*. Dois hantavírus ainda sem associação com doença humana foram adicionalmente identificados no território brasileiro: o Rio Mearim em *Holochilus sciureus* e o hantavírus Jabora em roedores da espécie *Akodon montensis*.

Diante da diversidade de biomas e da extensão continental do Brasil, a identificação de roedores dos gêneros *Akodon*, *Necromys* (= *Bolomys*), *Oligoryzomys*, entre outros, detectados em diferentes regiões como reservatórios de hantavírus, reforça a necessidade de mais estudos, já que uma das características em comum destes táxons é o fato de serem muito abundantes na natureza.

Quanto à doença humana, a transmissão está relacionada à inalação de partículas virais presentes nas excretas de animais infectados, especialmente na urina (LeDuc, 1987; Tsai, 1987; Mills *et al.*, 1995; Romano-Lieber *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Morelli *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Padula *et al.*, 2004), embora excepcionalmente transmissão pessoa-pessoa com o hantavírus Andes tenha sido descrita na Argentina e Chile (Enria *et al.*, 1996; Padula *et al.*, 1998).

Entre os roedores, a forma de transmissão ocorre a partir da transmissão horizontal, seja por mordidas e agressões e, menos frequentemente, por aerossóis. Estes animais, considerados reservatórios, uma vez infectados manterão e liberarão os vírus durante toda a vida. A exposição acidental do homem às excretas de roedores, secreções, material de necropsia, ingestão de partículas são vias de transmissão (Mills *et al.*, 1995; Romano-Lieber *et al.*, 2001).

A maioria dos casos de hantavirose relatados mostrou que os pacientes tinham contato com o meio rural. Apesar do risco, não é comum a infecção de trabalhadores que se expõem ao vírus (Oliveira *et al.*, 2004). De fato, todos os roedores devem ser considerados potencialmente infectados desde que relatos demonstraram infecções por hantavírus em populações de pequenos mamíferos mesmo sem caso de detecção da doença em humanos (Lemos *et al.*, 2004).

2.2 Bartoneloses

Bartoneloses são zoonoses causadas por bactérias pouco conhecidas no Brasil que são mantidas em diversas espécies de vertebrados, especialmente mamíferos e vários artrópodes transmissores como os flebotomíneos, o piolho do corpo humano, as pulgas do gato e potencialmente os carrapatos.

Atualmente mais de 30 espécies e subespécies causadoras de doenças em humanos e animais têm sido identificadas e as mais importantes para a saúde pública são: (i) *Bartonella bacilliformis* - agente da febre de Oroya/ doença de Carrion e da verruga peruana, restrita à região andina, (ii) *Bartonella henselae* - agente da doença da arranhadura do gato, angiomatose bacilar, peliose bacilar e das endocardites e (iii) *Bartonella quintana* - agente da febre das trincheiras, angiomatose bacilar, bacteremia e endocardites (Angelakis e Raoult, 2014; Breitschwerdt et al., 2010, Mogollon-Pasapera et al., 2009).

Embora não seja identificada no Brasil, considerando que a infecção por *B. bacilliformis*, comum nos vales andinos em altitudes acima de 800m, vem atingindo áreas mais extensas do Peru, incluindo altitudes mais baixas, a possibilidade de sua ocorrência não pode ser subestimada, principalmente diante da notificação de casos em 2003 no Departamento de Loreto, fronteira com o estado do Amazonas e a confirmação, em 2004, de 19 pessoas em Madre de Diós, na fronteira do Peru com Acre e Bolívia (Cesario e Cesario, 2005)

2.2.1 Agente etiológico

Bartonelas são bactérias gram-negativas, intracelulares, parasitas de eritrócitos e de células endoteliais, fastidiosas, anaeróbias eventuais, classificadas na ordem Rhizobiales, família Bartonellaceae e que mantém relação filogenética estreita com membros da ordem Rickettsiales (Brenner, 1993). Até 1993, *B. bacilliformis* era considerada a única bactéria do gênero *Bartonella* causadora de doença humana, a doença de Carrion, restrita às regiões da Colômbia, Equador e Peru. A partir de 1993, com nova classificação taxonômica, com base na análise filogenética, foi possível identificar novas espécies e, atualmente, mais de doze foram associadas com a doença humana, além de *B. bacilliformis*: *B. quintana* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii*

subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. washoensis* e, recentemente, *B. koehlerae* (Breener *et al.*, 1993, Maureen *et al.*, 2012).

Algumas espécies, em especial *B. henselae* e *B. quintana*, são transmitidas aos humanos através de contato direto com cães e gatos, embora exista especulação da participação dos ectoparasitas (Lemos, 2013; Morick *et al.*, 2011). Os principais reservatórios são vertebrados domésticos como cães e gatos (Jacomo *et al.*, 2002), roedores sinantrópicos, como *Rattus rattus*, *R. norvegicus* e *Mus musculus* (Costa *et al.* 2014; Hayman *et al.*, 2013) e diversas espécies de roedores silvestres (Buffet *et al.* 2013; HOLMBERG *et al.* 2003). No Brasil, aproximadamente 20 espécies de roedores silvestres foram descritas como hospedeiras de *Bartonella* spp. (Sousa *et al.*, 2018; Rozental *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2016), entretanto a ecologia da transmissão ainda é pouco conhecida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da fauna de mamíferos do estado do Acre abordando aspectos de sua ecologia e sua associação com agentes zoonóticos.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Realizar um levantamento faunístico identificando em nível específico as espécies de pequenos mamíferos nas áreas de estudo;
- II. Comparar a diversidade, riqueza, abundância e equitabilidade de pequenos mamíferos entre as florestas do Parque Zoobotânico (FPZ), Reserva Humaitá (RFH) e Floresta do Seringal Cachoeira (FSC), considerando, estações do ano e estratos de vegetação;
- III. Investigar a relação entre a abundância e riqueza de espécies de pequenos mamíferos com variáveis ambientais de habitat nas três áreas comparadas (PZ, RH e FSC);
- IV. Estimar os índices de heterogeneidade e complexidade e investigar a relação destes com a abundância e riqueza de mamíferos, nas três áreas comparadas (PZ, RH e FSC);
- V. Determinar as taxas de infecção por hantavírus em amostras de roedores sigmodontíneos, nas distintas áreas de estudo;
- VI. Determinar as taxas de infecção por *Bartonella* spp. em amostras de pequenos mamíferos capturados nas áreas de estudo;
- VII. Estabelecer uma coleção de referência de espécies testemunhos da fauna de pequenos mamíferos do estado do Acre.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 O Estado do Acre

O estado do Acre, antes território pertencente à Bolívia, foi incorporado ao Brasil em 1903, com a assinatura do Tratado de Petrópolis. Está situado no extremo sudoeste da Amazônia brasileira, entre as latitudes de 07°07'S e 11°08'S, e as longitudes de 66°30'S e 74°00'W. Sua superfície territorial é de 164.221,36 Km² (16.422.136 ha), correspondente a 4% da área amazônica brasileira e a 1,9% do território nacional (IBGE, 2005). Sua extensão territorial é de 445 Km no sentido norte-sul e 809 Km entre seus extremos leste-oeste. O referido estado faz fronteiras internacionais com o Peru e a Bolívia e, nacionais com os estados do Amazonas e de Rondônia (Figura 2).

O relevo é composto, predominantemente, por rochas sedimentares, que formam uma plataforma regular que desce suavemente em cotas da ordem de 300m nas fronteiras internacionais para pouco mais de 110m nos limites com o estado do Amazonas. No extremo ocidental situa-se o ponto culminante do estado, onde a estrutura do relevo se modifica com a presença da Serra do Divisor, uma ramificação da Serra Peruana de Contamana, apresentando uma altitude máxima de 734m. Os solos acreanos, de origem sedimentar, abrigam uma vegetação natural composta basicamente de florestas que são divididas em dois tipos: Tropical Densa e Tropical Aberta, caracterizadas por sua heterogeneidade florística, constituindo-se assim, de grande valor econômico para o estado (ACRE, 2006).

O clima é do tipo equatorial quente e úmido, caracterizado por altas temperaturas, elevados índices de precipitação pluviométrica e alta umidade relativa do ar. A temperatura média anual está em torno de 24,5°C, enquanto a máxima fica em torno de 32°C, aproximadamente uniforme para todo o estado. Sua hidrografia é bastante complexa e a drenagem bem distribuída. É formada pelas bacias hidrográficas do Juruá e do Purus, afluentes da margem direita do rio Solimões. A população do estado é de 733.559 habitantes (IBGE, 2010) que atualmente (66%) está concentrada nas áreas urbanas, notadamente na região do Baixo Acre, em função da capital, Rio Branco. O estado do Acre divide-se, politicamente, em regionais de desenvolvimento: Alto Acre, Baixo Acre, Purus, Tarauacá/Envira e Juruá (Figura 2).

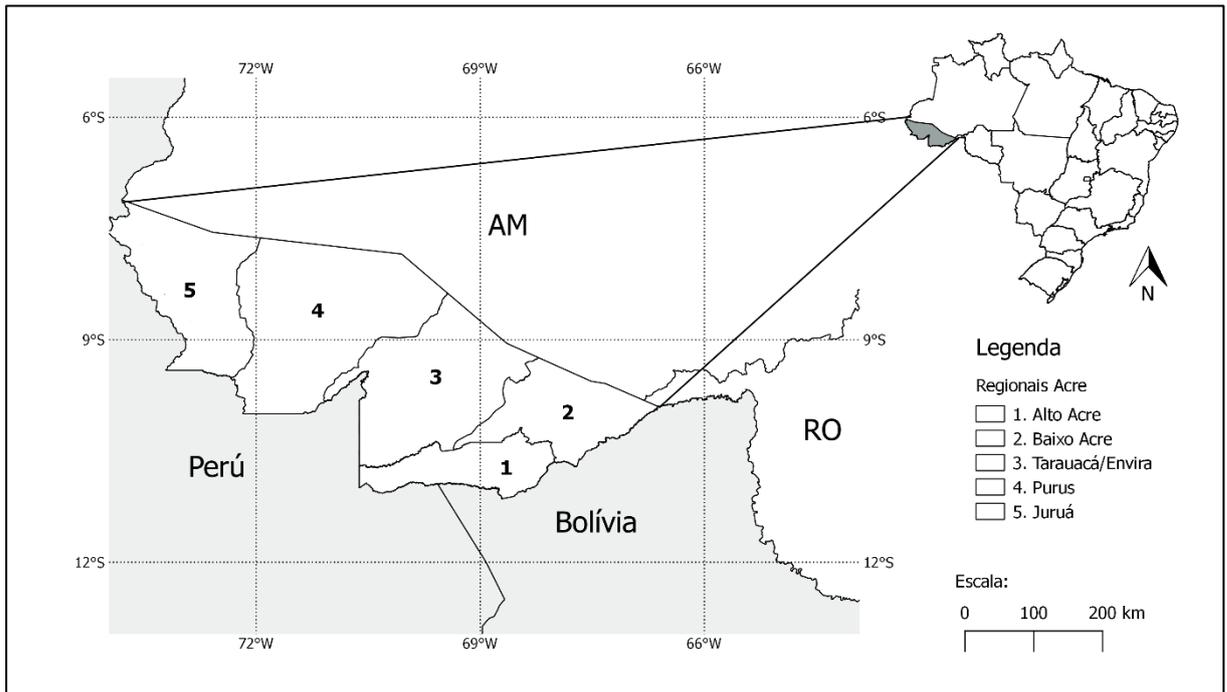


Figura 2. Localização do estado do Acre e suas Regionais Geopolíticas, na América do Sul e Brasil. Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

4.2. Seleção das áreas de estudo

A seleção das áreas deste estudo foi definida visando atender diferentes interesses de investigação, tanto por parte dos laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), especialmente os Laboratórios de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LBPMSR) e o Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses (LHR) que conduziram este projeto de tese, como pelos demais parceiros institucionais da Universidade Federal do Estado do Acre (UFAC). Dessa forma, foram priorizadas áreas de florestas do leste do Acre com diferentes usos e níveis de conservação, as quais pudessem ser comparadas e que oferecessem melhores condições e possibilidades logísticas. As parcerias firmadas com o Núcleo Regional do Programa de Pesquisa em Biodiversidade (PPBio), com os Laboratórios de Microbiologia e Imunologia Veterinária (LMIV) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) e Parque Zoobotânico (PZ), ambos da UFAC, foram fundamentais na consecução dos trabalhos de campo.

Nessas condições, quatro áreas de florestas em municípios do Acre foram inicialmente selecionadas e amostradas visando à realização de expedições de captura: (1) Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ) no município de Rio Branco, (2)

Reserva Florestal do Humaitá (RFH) nos municípios de Porto Acre, (3) Floresta do Seringal Cachoeira (FSC) no município de Xapuri e (4) Floresta Experimental Catuaba (FEC) no município de Senador Guimard. Amostras de outra área do município de Porto Acre (Ramal Profa. Lucila, rodovia AC-10, Km20), e dos municípios de Brasiléia e Capixaba, foram em seguida incorporadas no estudo, a partir da cooperação estabelecida com o Instituto Evandro Chagas (IEC), o qual cedeu espécimes provenientes destas três localidades (Figura 3). Posteriormente, o LABPMR/IOC realizou, em cooperação com o Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos LABTRIP/IOC, uma expedição ao município de Rodrigues Alves (Projeto de Assentamento Nova Cintra) para atendimento a um surto de doença de Chagas, cujos animais capturados também foram incorporados a este estudo.

Considerando a padronização do desenho amostral e esforço de captura, apenas as áreas situadas nos municípios de Rio Branco (FPZ), Xapuri (FSC) e Porto Acre (RFH) foram utilizadas para o estudo comparativo sobre composição de espécies e uso do habitat pelos pequenos mamíferos e sua relação com as variáveis ambientais (ver coleta das variáveis ambientais), bem como a determinação das taxas de infecção por agentes zoonóticos. As áreas pertencentes aos municípios de Rodrigues Alves, Senador Guimard, Capixaba e Brasiléia foram oportunamente incorporadas ao estudo para compor exclusivamente o levantamento de espécies da fauna de pequenos mamíferos para o estado do Acre.

Para os estudos comparativos, as três áreas selecionadas (FPZ, RFH e FSC) foram classificadas, de acordo com a situação de uso e ocupação do solo, e categorizadas considerando situações ecoepidemiológicas distintas e definidas como indicadoras do “estado da conservação”. conforme brevemente descrito a seguir e mais detalhado ao longo da metodologia.

- 1) *Floresta alterada*: ambiente formado por um fragmento de floresta, em diferentes estágios de sucessão, em uma paisagem urbana com algum tipo de ação antrópica, cercado por bairros e uso da terra destinado a atividades diversas (trilhas, pesquisa, recreação e laser). Para esta situação foi amostrado um fragmento de floresta urbana, no município de Rio Branco, denominada Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ)
- 2) *Floresta preservada*: ambiente formado por um grande fragmento de floresta, com remanescente de floresta primária em uma paisagem rural, com moderada ação antrópica, cercada por fazendas, rodovias e rio, com destinação para

atividades de pesquisas. Para esta situação foi amostrado um fragmento de floresta primária, no município de Porto Acre, denominado Reserva Florestal do Humaitá (RFH)

- 3) *Floresta conservada*: ambiente formado por floresta primária de mata contínua, com médio impacto antrópico e uso da terra destinado a atividades tradicionais de extração de látex e castanha-do-brasil, onde o acesso é restrito, distante de plantações e domicílios. Para esse tipo de situação foi selecionada uma área de floresta primária no município de Xapurí, denominada de Floresta do Seringal Cachoeira (FSC).

Sobre o potencial risco de transmissão de zoonoses, vale ressaltar que a finalidade da categorização das áreas foi analisar o risco do contato humano com pequenos vertebrados silvestres potenciais reservatórios, em cada situação ecoepidemiológica, numa situação onde os resultados pudessem apontar diferentes taxas de infecção dos animais.

Em relação ao levantamento faunístico, as oito áreas levantadas neste estudo foram indicadas pelo Zoneamento Ecológico Econômico (ZEE/AC), para que pudessem ser realizados os levantamentos com a prioridade de identificar os indicadores da diversidade local (ACRE, 2006).

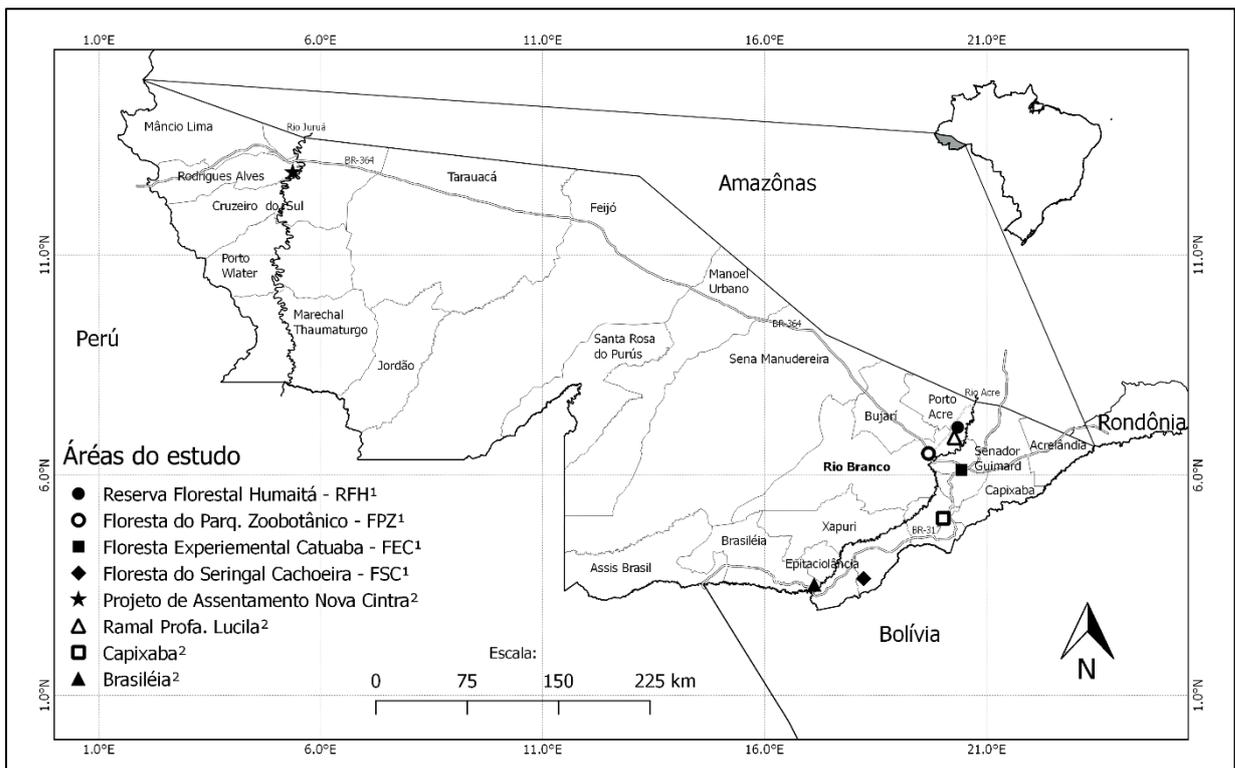


Figura 3. Localização geográfica, por municípios e localidades, das oito áreas selecionadas para o estudo dos pequenos mamíferos no estado do Acre. (1) Áreas que fizeram parte do estudo comparativo; (2) Áreas inseridas para compor o levantamento de espécies de pequenos mamíferos. Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

4.3 Descrição das áreas do estudo

4.3.1 Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ)

A Floresta do Parque Zoobotânico - FPZ (9°57'S e 67°52'W), mais conhecida como PZ, possui cerca de 114ha. Classificada como Parque Urbano (Oliveira & Jesus 2011) a FPZ integra o Campus da Universidade Federal do Acre (UFAC), no município de Rio Branco (9°57'S e 67°52'W; Figura 4). O clima na FPZ é do tipo Equatorial Quente e Úmido e se caracteriza por uma temperatura média anual muito elevada (24,5 °C), assim como por elevados índices de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (Köppen-Geiger). Na região ocorrem dois períodos climáticos distintos: uma estação chuvosa entre o período de outubro e abril, e uma estação seca entre os meses de abril e outubro (ACRE, 2006).

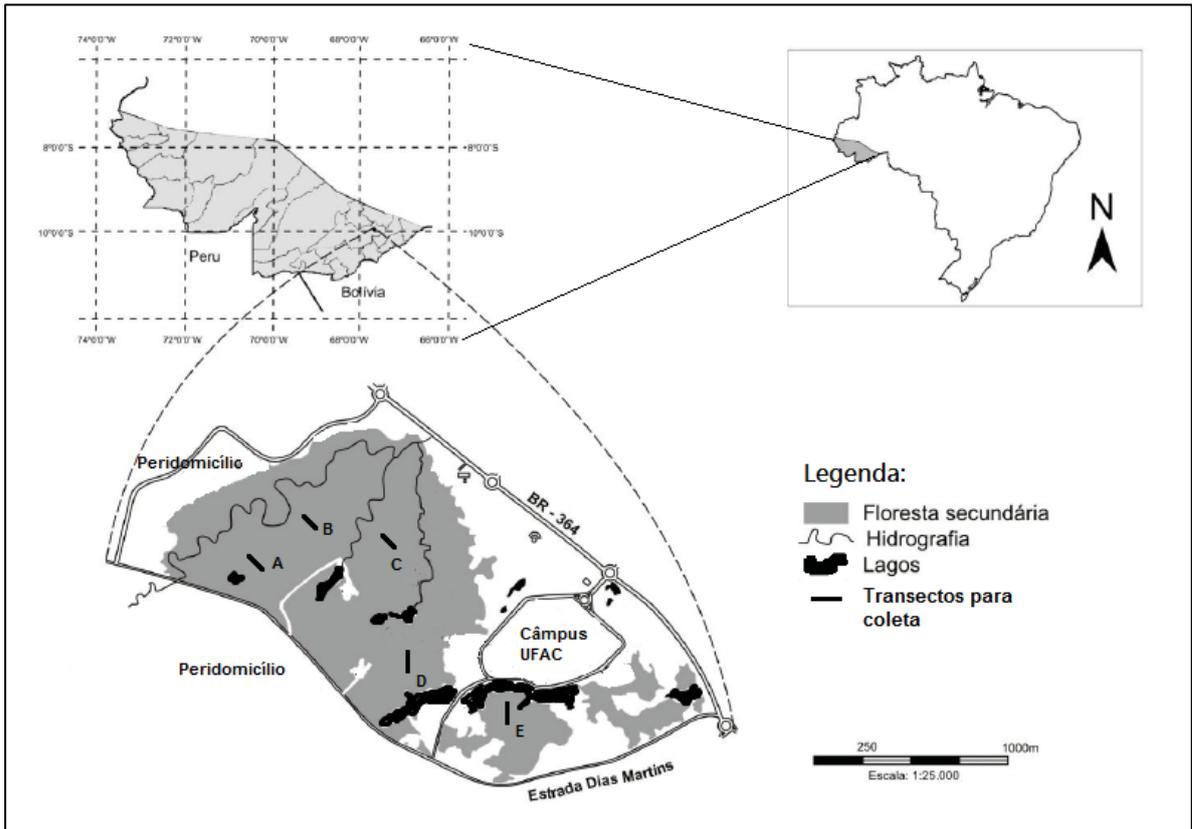


Figura 4 – Floresta do Parque Zoobotânico, UFAC, com a localização dos transectos para coleta dos pequenos mamíferos (A, B, C D e E). Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

A vegetação da FPZ é formada por florestas em diferentes estágios sucessionais, gerados pelas mortandades simultâneas de maciços de bambus nativos, especialmente *Guadua weberbaueri*, com mortandade simultânea registrada a cada 32 anos (Silveira, 2005). Os tipos florestais existentes na FPZ podem se apresentar em mosaicos com transições pouco perceptíveis na estrutura da vegetação e composição florística, formando contínuos vegetacionais com sub-bosque denso. De maneira geral a dinâmica populacional do bambu na FPZ gerou três tipos básicos de formação vegetal (Silveira, 2005): floresta ombrófila aberta de palmeiras, floresta ombrófila aberta de palmeiras com bambú dominado e floresta ombrófila aberta com bambú dominante, conhecido localmente como tabocal (Figura 4C).



Figura 5. Principais tipologias florestais da Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ), UFAC: (A) floresta ombrófila aberta de palmeiras; (B) floresta ombrófila aberta de palmeiras, com bambú dominado; e (C) floresta ombrófila aberta com bambú dominante

O tabocal é uma tipologia florestal natural da região, porém sua ocorrência e dispersão em uma área podem ser beneficiadas pela atividade antrópica, já que o bambú (*G. weberbaueri*) cresce rapidamente em condições de maior luminosidade. No caso da FPZ, que é um fragmento florestal urbano, esse tipo de vegetação ocorre principalmente nas áreas que estão sob o efeito de borda (com maior luminosidade) e, por ser uma espécie competitivamente eficiente, isto é, uma espécie de rápido crescimento e inibidora da regeneração de outras espécies, domina a paisagem na FPZ até 100m a partir da borda do fragmento.

O tabocal também ocorre no interior do fragmento, mas em pequenas manchas de cerca de 30 a 40m de raio (Calouro *et. al.*, 2010). Devido à dinâmica natural do bambu, cuja mortandade simultânea ocorre a cada 32 anos, existe um mosaico de vegetação na FPZ que é consequência desse fenômeno, o que permite considerar toda a área como Floresta Secundária (Silveira, 1995).

Nos anos de 1940 a área onde se encontra a FPZ fazia parte de um Seringal nativo conhecido como “Empresa”. As atividades antrópicas realizadas nessa época eram basicamente extrativistas e não existe qualquer registro histórico de retirada de madeira ou a presença de incêndio desde a inauguração do campus em 1976 (Meneses-Filho *et al.*, 1995).

Como entidade pública, o Parque Zoobotânico (PZ) é uma unidade de pesquisa e extensão ligada administrativamente à reitoria da UFAC criada no início da década de 1980 a partir da desapropriação de várias pequenas propriedades agrícolas dedicadas ao cultivo de culturas anuais e perenes e de pequenas criações

de gado (Oliveira *et al.*, 1985). Com o abandono dessas áreas antropizadas, a floresta remanescente que recobria uma pequena parte do local se regenerou e formou o fragmento florestal atual.

Na área que se insere à FPZ, estão instaladas edificações que abrigam a administração do PZ e seus setores, sendo eles um viveiro de produção de mudas, um herbário, os laboratórios de Sementes Florestais e de Entomologia, além de outros setores de estudos como o Setor de Uso da Terra e Mudanças Climáticas (SETEM), o Setor de Educação Ambiental, o 'Projeto Arboreto' e a sede, no Acre, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). No interior da FPZ, existem aproximadamente 4,5 km de trilhas utilizadas em atividades de pesquisa, extensão e educação ambiental. Em 2015 foi registrada a visitação de cerca de 1.300 pessoas/ano, considerando diferentes públicos desde acadêmicos da própria UFAC a outros usuários da rede pública de ensino (Silva *et al.*, 2016).

4.3.2. Floresta do Seringal Cachoeira (FSC)

O Seringal Cachoeira é uma denominação popular de um antigo seringal nativo, durante o “boom” da borracha no estado do Acre. Situa-se em área de floresta contínua e atualmente pertence ao Projeto de Assentamento Agroextrativista Chico Mendes (PAECM), delimitado pelo INCRA nos anos de 1989 (Incra, 2007). Constitui-se de Unidades Familiares de Produção Extrativista (UFPE), caracterizadas por pequenas propriedades no interior da floresta (média de 3ha a 4ha), conhecidas regionalmente como “Colocações”. As colocações obedecem uma demarcação peculiar, onde a fronteira de uma colocação com a outra é definida pelas trilhas utilizadas para coleta do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*) ou trilhas de castanheiras (*Bertholletia excelsa*) existentes em cada área. Dessa forma, o tamanho de cada colocação é estimado pela quantidade de trilhas existentes na colocação, sendo comum a definição de que a “área de uma trilha”, em média, é igual a 1ha. A área de floresta amostrada no Seringal Cachoeira - que para efeito de análise será tratada daqui pra frente como *Floresta do Seringal Cachoeira (FSC)* – constitui-se como Floresta Ombrófila Densa, de mata contínua e está localizada na Colocação Retiro I, entre as coordenadas 10°49S e 68°21W, aproximadamente a 30 quilômetros da sede do município de Xapuri (Figura 5).

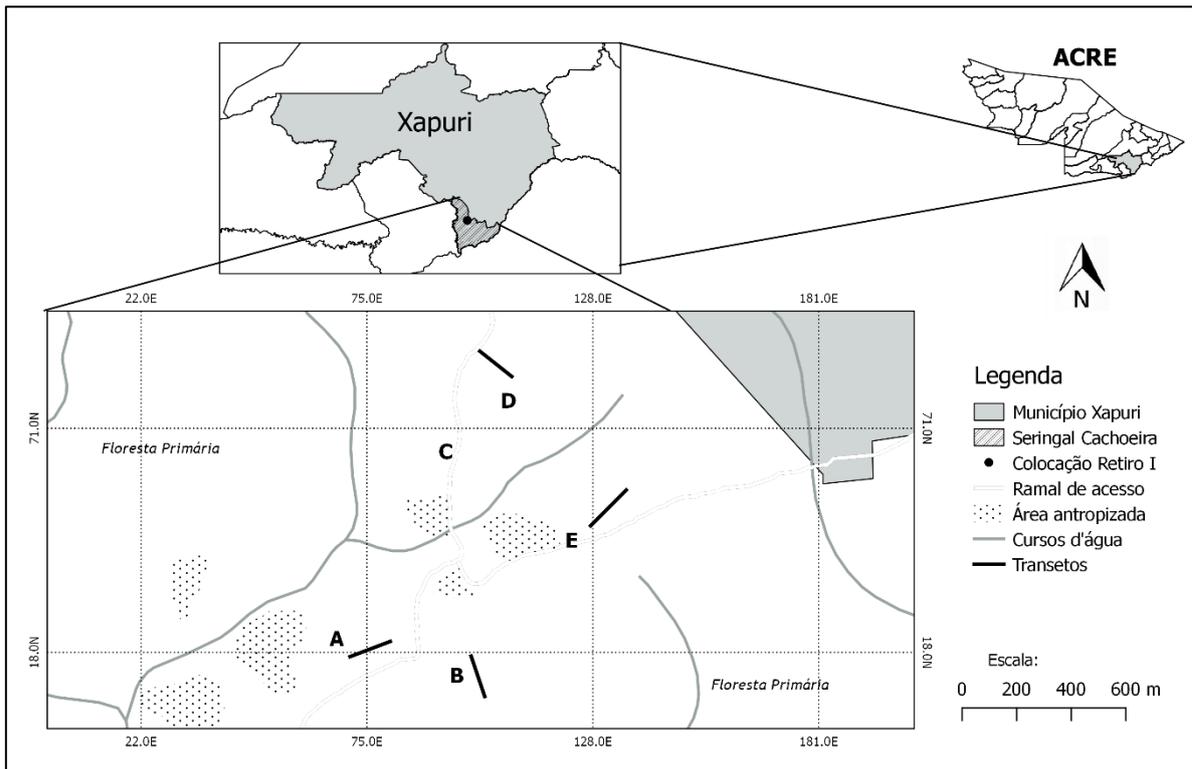


Figura 6. Floresta do Seringal Cachoeira - FSC, com a localização dos transectos para coleta dos pequenos mamíferos (A, B, C D e E). Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

O sistema produtivo desenvolvido pelas Colocações é baseado em diferentes atividades econômicas que combinam desde a extração de produtos florestais não madeireiros (PFNMs), com destaque para a castanha-do-brasil e o látex, a outras atividades como caça e pesca de subsistência, pequenas criações (aves, porcos e/ou gado), além da produção agrícola em pequena escala, complementando a renda dos moradores. Ao todo, a FSC possui 24,2 mil hectares, com aproximadamente 318 moradores em 86 famílias assentadas (Incra, 2017). A maioria das pessoas que vive na FSC são castanheiros e seringueiros por tradição (ou descendentes) e residentes antigos da área (Stone-Jovicich, 2007). As famílias têm fortes laços de parentesco entre si e a maioria das pessoas pertence a um pequeno número de famílias numericamente grandes. Esse aspecto confere a localidade grande coesão e bom gerenciamento dessa área, no que concerne à participação da comunidade nas políticas de desenvolvimento local.

Até os anos de 2006 a castanha-do-brasil e a extração do látex eram considerados os principais produtos na composição da renda das famílias. Outras

importantes fontes de renda adicionais incluem: aposentadorias, serviços prestados (diarista, meeiro) e salário como funcionário público (Stone-Jovicich, 2007).

A partir de 2006, a extração de madeira manejada, através da implementação de um Projeto de Manejo Florestal Comunitário (MFC) se tornou a maior fonte de renda na região (Franco & Esteves, 2008). A extração “manejada” de madeira na FSC é fundamentada em uma forte aliança entre comunidade, governo e entidades não governamentais (Stone-Jovicich, 2007).

4.3.3. Reserva Florestal do Humaitá (RFH)

A Reserva Florestal do Humaitá (RFH) é uma área que pertence à Universidade Federal do Acre (UFAC). Trata-se de um remanescente florestal inserida em meio a um grande Projeto de Assentamento gerenciado pelo INCRA, denominado Projeto de Assentamento Dirigido Humaitá (PAD-Humaitá), localizado no município de Porto Acre (detalhado na próxima descrição). A RFH situa-se entre as coordenadas 9°43S e 67°48W e possui uma área de aproximadamente 2.000ha, com altitudes que variam entre 130 a 170m. Limita-se a leste com o Rio Acre e a oeste com a Rodovia AC-10, que liga o município de Porto Acre à capital Rio Branco. A área está cercada por propriedades rurais, que em sua maioria realizam atividades ligadas à agropecuária. Segundo a classificação de Köppen, a RFH apresenta clima tropical úmido e temperatura média anual de 26° C, com pluviosidade média anual de 1940 (± 228 mm) e umidade relativa média anual do ar de 85% (Duarte, 2005). A formação vegetal dominante na RFH é floresta aberta com bambu (*Guadua weberbaueri*) e floresta aberta com palmeiras (Barroso *et al.*, 2011), região esta, onde foi instalada a grade do Ppbio, da qual foram disponibilizadas cinco do total de parcelas existentes para as análises comparativas do presente estudo (Figura 6).

Nos últimos sete anos, o local tem acolhido pesquisas integradas, envolvendo a participação de pesquisadores da própria UFAC e de outras instituições de ensino ou pesquisa do Brasil e do exterior, como Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Estadual de Maringá (UEM), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), University of Exeter (Inglaterra), New York Botanical Garden e University of Florida. Mais recentemente, a RFH abriga estudos do PPBio, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), da Rede Amazônica de Inventários Florestais (Rainfor), bem como parcelas permanentes de monitoramento de área de queimadas e projetos de mestrado (Ufac, 2015).

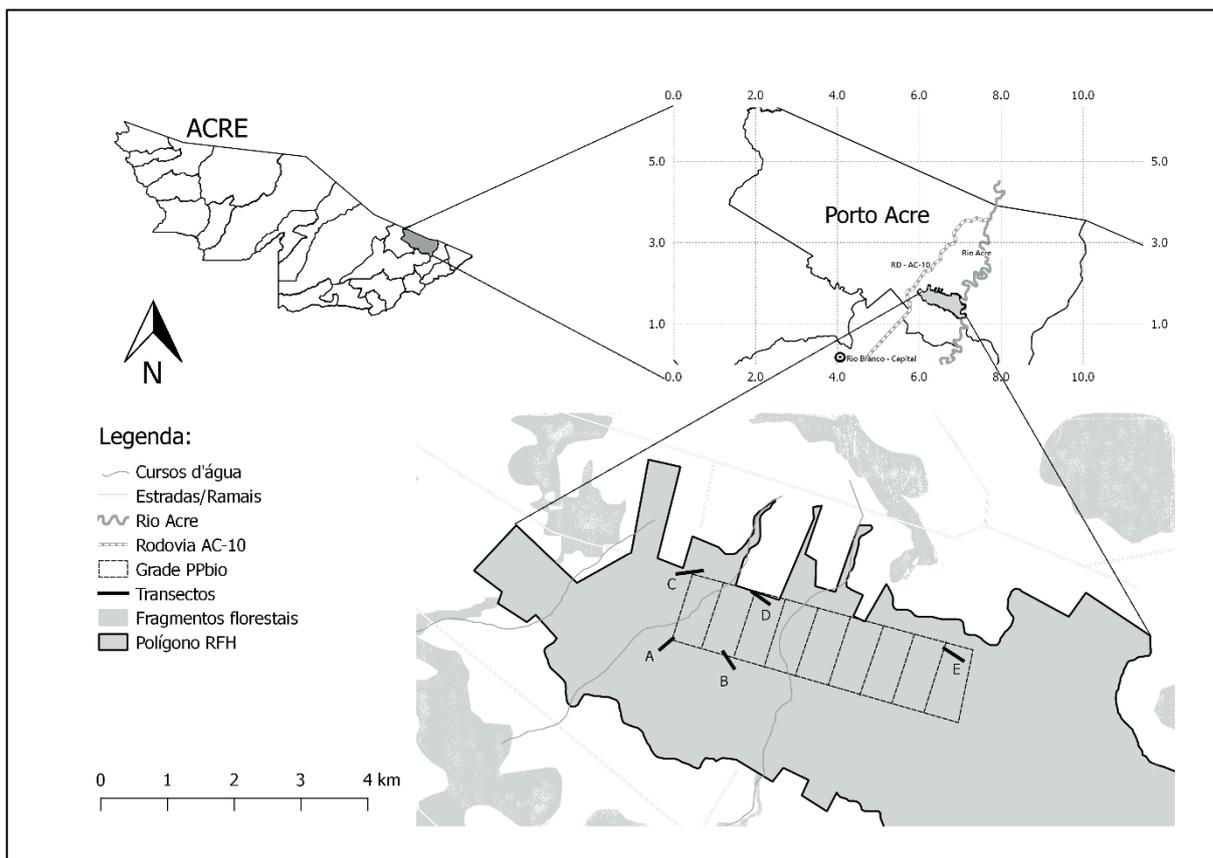


Figura 7. Reserva Florestal Humaitá - RFH, com a localização dos transectos para coleta dos pequenos mamíferos (A, B, C D e E). Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

4.3.4. Ramal Prof^a. Lucila, Rodovia AC-10, Km20

O Ramal Prof^a Lucinda está localizado no Projeto de Assentamento Dirigido Humaitá – PAD-Humaitá. O PAD Humaitá, que abrange uma área de 63.861 há, foi criado em 08 de agosto de 1981, através da Resolução 117 do INCRA. . Conforme mencionado no item anterior, localiza-se no município de Porto Acre, distante cerca de 30 quilômetros da capital Rio Branco (Figura 7). É tangenciado por uma rodovia federal, a BR-317, que está diretamente ligada à rodovia AC-10, possuindo uma via de acesso natural, que é o rio Acre, importante via de escoamento da produção agrícola familiar para os produtores que residem na região banhada por esse rio (Souza, 2012).

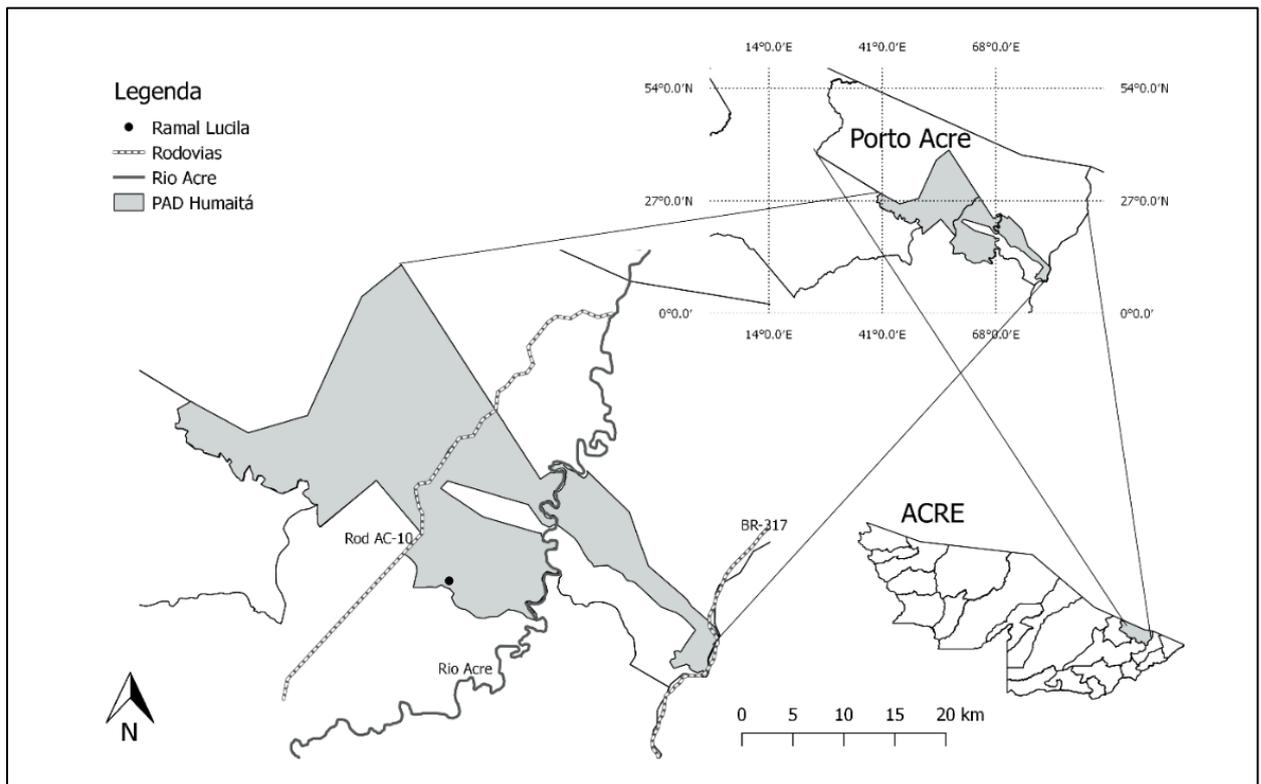


Figura 8. Projeto de Assentamento Dirigido Humaitá, com a localização do Ramal Prof. Lucinda – km 20. Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

O PAD Humaitá foi um dos maiores produtores de grãos, garantindo boa parte da demanda de alimentos da capital do estado, Rio Branco. Estudos realizados nesse assentamento comprovaram que parcelas significativas de suas terras são indicadas para agricultura, exigindo apenas medidas quanto à conservação e manutenção de suas propriedades. Atualmente, a principal exploração econômica do assentamento é a pecuária de corte com baixos índices zootécnicos (Moreira, 2007). A maioria dos moradores do PAD-Humaitá é proveniente do Paraná – os desabrigados da hidrelétrica de Itaipu – ou são ex-seringueiros residentes da periferia das cidades ou da própria localidade (Moreira, 2007).

4.3.5. Floresta Experimental Catuaba (FEC)

A Fazenda Experimental Catuaba - FEC (10°04'S, 67°37'W), é uma unidade de pesquisa da Universidade Federal do Acre (UFAC) localizada no km 23 da BR-364, sentido Rio Branco-Porto Velho, no município de Senador Guiomard (Figura 3). A FEC possui uma área com cerca de 850 hectares, e sua vegetação se constitui por floresta tropical aberta de terra firme com bambus e palmeiras, floresta densa, florestas secundárias e pastagens cultivadas. O relevo local é suavemente ondulado, influenciado pela rede de drenagem formada por pequenos cursos de água (Souza e Cardoso, 1996). A temperatura média anual na região varia entre 22 a 24°C e a precipitação média anual é de 1.973 mm, com as chuvas mais concentradas no mês de janeiro (Mesquita, 1996).

4.3.6. Projeto Assentamento Nova Cintra (PNC)

O Projeto de Assentamento Nova Cintra (PNC) encontra-se distante cerca de 650 km da capital do Acre, seguindo o curso do rio Juruá situado no município de Rodrigues Alves, entre as coordenadas 7°48'S e 72°40'W. Esta é a única área de estudo na região Oeste do Acre (Figura 3). Até a sede do PNC são percorridos 16 km, saindo de Rodrigues Alves. O tamanho médio das propriedades no PNC varia de 15 a 100 ha, com predomínio de assentados pelo INCRA (Acre, 2011). A localidade do estudo apresenta ligação por via terrestre com as cidades de Rodrigues Alves e Cruzeiro do Sul através de um ramal com entrada na rodovia AC-407.

4.3.7 Capixaba

O Município de Capixaba, (10°33'S, 67° 41'W), localiza-se a 60 km da capital Rio Branco, o qual possui uma população de aproximadamente 8.798 habitantes, sendo a décima sexta população do estado acreano, ocupando o 21º lugar em área. Sua economia gira em torno do extrativismo vegetal, da madeira, da castanha do Brasil, da pecuária, da agricultura de subsistência e do cultivo de cana para a usina de álcool que se instalou no município (AMAC, 2017). Limita-se ao norte e nordeste, com o município de Rio Branco; ao sul, com a Bolívia; a leste, com o município de Plácido de Castro e a Bolívia e a oeste, com o município de Xapuri. O acesso ao

município é feito por meio rodoviário através da BR-317 (Figura 3). A captura de amostras de roedores silvestres nesta área ocorreu em julho de 2015, ao longo da Rodovia AC-10, Km 20, Ramal Prof^a. Lucila, Chácara da Dona Arlete, entre as coordenadas S 09°48'43,1" e W 67°42'37,2", em ambientes rurais (cultura de cana-de-açúcar, área de pastagem, áreas de capim-braquiária e no peridomicílio de residências rurais e áreas de floresta nativa (Nunes-Lavocat *et al*, 2015).

4.3.8 Brasiléia

O município de Brasiléia (10°56'S, 68°44'W) limita-se ao norte e a leste, com o município de Xapuri; ao sul, com a Bolívia; a oeste, com o município de Assis Brasil; a noroeste, com o município de Sena Madureira e a sudeste, com o município de Epitaciolândia. A cidade possui uma grande influência econômica do comércio praticado pela Zona Franca do lado boliviano e pela capital Rio Branco.

A ligação com a cidade boliviana é feita através da Ponte da Amizade, que liga os dois países e incrementa o intercâmbio cultural e comercial na zona de livre comércio de Cobija entre brasileiros e bolivianos. Nos finais de semana a cidade recebe um grande fluxo de turistas que vão fazer compras na Zona Franca de Cobija. O Município ocupa o sexto lugar em número de população e o décimo quarto em tamanho de área (AMAC, 2017). O acesso ao município de Brasiléia pelo lado brasileiro é feito por meio rodoviário através da BR-317. Sua economia baseia-se no comércio, na pecuária leiteira e de corte, na agricultura de subsistência e no extrativismo vegetal. Com a possibilidade da “Estrada do Pacífico” que liga o Brasil ao Perú integrando esta região aos países vizinhos, há grande esperança no crescimento econômico do município, principalmente a partir de iniciativas como o abatedouro de aves que está sendo implementado às margens da estrada.

As coletas de roedores realizadas em Brasiléia, ocorreram no mês de maio e setembro de 2013, ao longo da BR-317, Estrada do Pacífico, entre linha 7 e linha 1 na Colônia Buriti, entre as coordenadas S 10°51'00" e W 68°45'00".

4.4 Logística das expedições e esforço de captura

Nas localidades da FPZ, RFH e FSC foram realizadas oito expedições com esforço de captura padronizado. As expedições nessas três áreas foram realizadas

entre os meses de março e agosto de 2014 (seca) e novembro e dezembro de 2015 (chuvas), durante um período de cinco noites de capturas.

Simultaneamente às expedições na RFH, quatro transectos de captura adicionais foram estabelecidos para atender aos objetivos do PPbio. Os animais capturados nestes transectos e os provenientes das expedições nos municípios de Rodrigues Alves (PNC) e Senador Guiomard (FEC) foram adicionadas ao trabalho com a finalidade de compor a lista das espécies dos pequenos mamíferos, um dos objetivos desse estudo. Assim sendo, duas expedições foram realizadas na FEC, sendo a primeira em novembro de 2013, com duração de sete noites de capturas e, a segunda em dezembro de 2016, com cinco noites de capturas e esforço total de 1500 armadilhas/noite. A última expedição foi realizada no mês de maio de 2016, no período chuvoso na área de estudo do PNC e teve duração de quatro 4 noites de captura (Quadro 1).

O esforço de captura em cada expedição/localidade variou de 900 a 2.000 armadilhas/noites. O Quadro 1 apresenta o quantitativo do esforço de captura total nas diferentes áreas de estudos, detalhado pelo sistema de armadilhas empregado nos diferentes estratos da vegetação e tipo de armadilha utilizada.

Quadro 1 – Esforço utilizado na captura dos pequenos mamíferos no período de 2013 a 2016, nas áreas de estudo no estado do Acre. Amardilhas/noite: SL= solo; SB= sobosque; DS= dossel; PT= pitfall.

Município	Localidades	Esforço de Captura	
		Sistema de armadilhamento	Total (armadilhas/noite)
Porto Acre	RFH ¹	1000SL/500SB/500DS/400PT	2400
Rio Branco	FPZ ¹	1000SL/500SB/500DS/400PT	2400
Xapuri	SCA ¹	1000SL/500SB/500ds/400PT	2400
Porto Acre	RFH ²	800SL/400SB/400DS/400PT	2000
Senador Guiomard	FEC ²	1500SL	1500
Rodrigues Alves	PNC ²	900SL	900
Brasiléira	Colônia Buriti ²	1300SL	1300
Porto Acre	Ramal Prof ^a Lucila ²	1300SL	1170

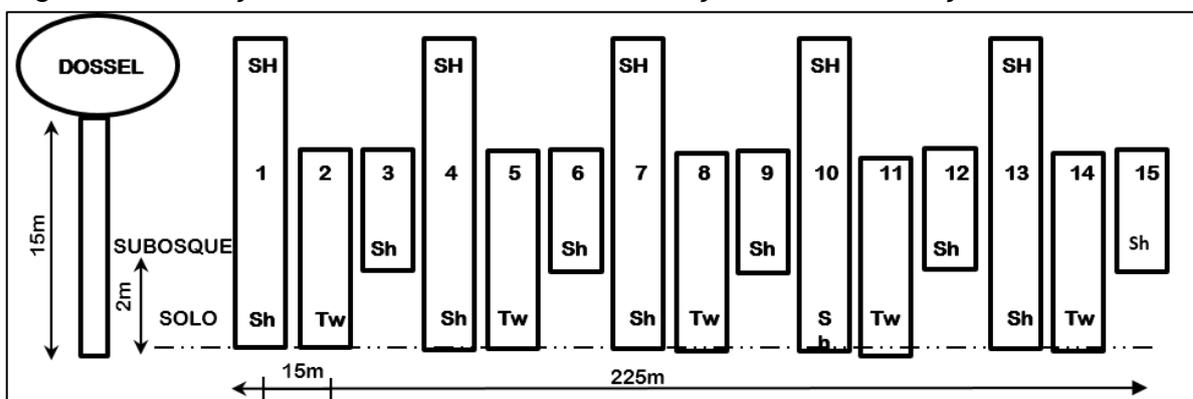
(1) Áreas comparáveis do estudo; (2) Áreas incorporadas para compor o levantamento.

4.5 Desenho Amostral

4.5.1 Distribuição das armadilhas e técnicas de armadilhamento

Em cada área foram estabelecidos transectos lineares de 225m cada. Ao longo de cada transecto foram instaladas 15 estações de captura com uma combinação de armadilhas Sherman® e Tomahawk® dispostas, de forma a amostrar os estratos do solo, sub-bosque e dossel (Figura 9). Cada estação de captura foi instalada a uma distância de 15m uma da outra. O sub-bosque foi amostrado a uma altura de 2m e o dossel a cerca de 15m (Figura 09 e 10B). As armadilhas distribuídas no dossel foram instaladas com auxílio de cordas e uma plataforma de madeira (Figura 10A).

Figura 9. Ilustração do transecto linear. Distribuição e caracterização das armadilhas



utilizadas no estudo. SH = Sherman G. (43x12,5x14,5cm); Sh = Sherman P. (30x8x9cm); Tw = Tomahawk (40x12x12cm). Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo



Figura 10. Instalação das armadilhas do tipo live traps, em transectos lineares nos diferentes estratos da vegetação, para captura de pequenos mamíferos. A = dossel (Sherman G); B= sub-bosque (Sherman P) e C= solo (Tomahawk). Imagens: Charle F. Crisóstomo.

Ao final de cada transecto, a uma distância de 10m da última estação de captura, foram instaladas quatro armadilhas de queda (*pitfall*). Para confecção das *pitfalls* foram utilizados baldes de plástico de 60 litros, com largura da boca igual a 60 cm. Os baldes foram enterrados e interligados por uma cerca guia, de lona, a uma distância de 10 metros um do outro em forma de “Y” (Figura 11).

Figura 11. Utilização de armadilhas Pitfall em formato radial (Y), instaladas ao fim de



cada transecto de armadilhas live traps, para captura de pequenos mamíferos. Imagens: Charle F. Crisóstomo.

4.6 Coleta das variáveis ambientais para comparação das três áreas de estudo (RFH, FPZ e FSC)

Para a caracterização das áreas de florestas e sua associação com as espécies de pequenos mamíferos, foram medidas diversas variáveis quantitativas e qualitativas (Anexo 8.1). As variáveis foram medidas de modo a caracterizar a estrutura horizontal e vertical das florestas, nas 15 estações de capturas existentes em cada uma das cinco trilhas instaladas nas três áreas de estudo, considerando as quatro direções - norte, sul, leste e oeste – a uma distância de 1,5m do ponto central de cada estação de captura, formando uma área de 9m² ao redor das armadilhas, sendo este considerado o micro-habitat das espécies.

Como instrumento de medição da Porcentagem de Obstrução Foliar Vertical (OFV), foi utilizado um quadrado de 1m² (0,5 x 0,5 m) dividido em 100 quadrados menores, confeccionados com arame de modo a formar uma tela (Figura11) de acordo com Freitas *et al.* (2002). As medições foram realizadas pela quantificação do número de obstruções desses quadrados, tendo como centro da medição o centro de cada estação de captura ao longo de cada trilha. Foram considerados visualmente obstruídos aqueles quadrados menores com mais de 50% de obstrução visual.

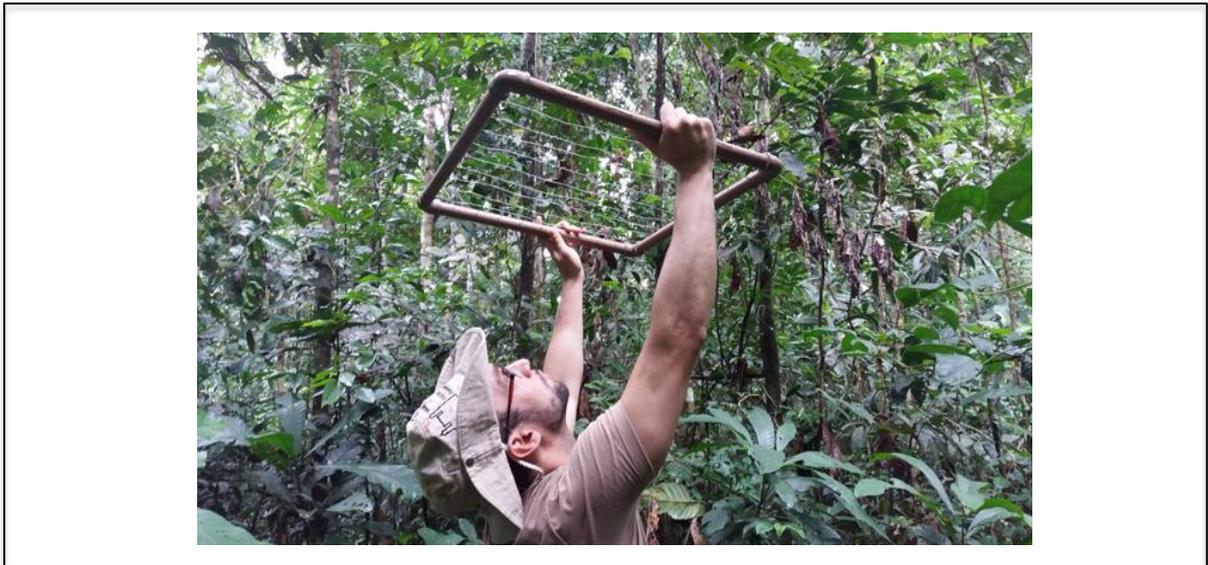


Figura 12 – Utilização do instrumento para medição da porcentagem de obstrução foliar vertical (OFV) observada na cobertura de dossel. Imagem: Charle F. Crisostomo.

As seguintes medições foram quantificadas: Porcentagem de Obstrução Foliar Vertical (OFV) na altura de 50 cm a 1m, Porcentagem de Cobertura do Dossel (DOSSEL), Altura do Dossel (ALT), Número de Árvores com diâmetro na altura do peito entre 10 e 39 cm (ARV1), Número de Árvores com diâmetro na altura do peito \geq 40 cm (ARV2) e Área Basal, com Número de Buracos no solo e Número de Componentes da Flora, incluindo plantas indicadoras de perturbação e de preservação, conforme informações contidas nos formulário para coleta de variáveis para Micro e Meso-Habitat (Anexo 8.1). Além destas variáveis, foram tomadas variáveis categóricas caracterizadas por presença e ausência, ou classificadas em pouco, regular e muito: *conectividade do dossel* (CONNECT), *grau de abertura do subosque* até 5 metros (SUB1), entre 5 e 10 metros (SUB2) e acima de 10 metros (SUB3), *perfil do ambiente* variando de clareira a mata fechada (AMBIENTE), *presença de árvores múltiplas e altura do fuste* (FUSTE), *presença de cursos d'água* (ALAGAMENTO), *presença de criadouros de animais* (CRIADOUROS), *presença de trilhas/estradas* (TRILHAS), *existência de plantações* nos arredores, *tipo de textura do solo* variando de solo rochoso a solo alagado, e *espécies peculiares da vegetação*. Também foi avaliado o tipo de Intervenção humana no ambiente em cada transecto sendo considerados os tipos de atividades como sendo: *atividade de ensino e/ou*

pesquisa (ENS/PESQ), *atividade extrativista* (EXTRAT) e *atividade de recreação* (RECREA), sendo 0 – ausência da atividade, 1 – pouca atividade e 2 – muita atividade.

4.6.1 Análise dos dados para as variáveis ambientais e diversidade de espécies

Foram estimadas a riqueza e abundância dos pequenos mamíferos para cada área de estudo, considerando-se a estação do ano e o estrato vertical da vegetação no qual foram estabelecidas as armadilhas (solo, sub-bosque e dossel). A riqueza de mamíferos foi considerada como sendo o número de espécies e a abundância como o número de indivíduos de cada espécie por área de estudo.

4.6.2 Comparação entre as três áreas de estudo (RFH, FPZ e FSC)

A equitabilidade foi calculada através do índice de Pielou (J) (Ludwig & Reynolds, 1988). Foi construída uma curva de acúmulo de espécies pelo método de rarefação de modo a avaliar se o esforço de captura foi suficiente para amostrar toda comunidade de pequenos mamíferos, considerando a riqueza de espécies e sua abundância, para cada área de estudo e para as três áreas somadas. Um índice de riqueza total de espécies foi estimado pelo método Jackknife 1 (Smith & Van Belle, 1984).

A diversidade de espécies foi comparada entre as três áreas de estudo em relação à sua composição de espécies através de uma Análise de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS). Esta análise permite representar as relações de ordenação entre objetos, considerados aqui como transectos, em um determinado número reduzido de eixos (Boccard *et al.*, 2011). Sendo assim, foi analisada a distância entre as áreas em relação à sua dissimilaridade de espécies, utilizando os valores de abundância de cada espécie por transecto. Foi utilizado o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para gerar a matriz de distância usada na NMDS.

A relação entre a riqueza e a abundância de espécies de pequenos mamíferos com o habitat foi investigada conforme a descrição seguir. As variáveis quantitativas de habitat foram transformadas em uma unidade de área padrão de acordo com Cerqueira & Freitas (1999), de forma a uniformizar sua quantificação. Considerando o número elevado de variáveis ambientais, foram realizadas seleções de variáveis *a priori*, de modo a evitar colinearidade e a interpretação final dos resultados. Inicialmente, variáveis de habitat correlacionadas foram excluídas, bem como aquelas

variáveis com pouca variação ao longo dos transectos entre as áreas. As correlações foram analisadas através do coeficiente de Spearman e a variação de cada variável ao longo dos transectos foi testada utilizando-se ANOVA – One Way ou Kruskal Wallis, de acordo com a normalidade dos dados. As variáveis selecionadas nesta etapa foram: OFV, SUB2, ARV1, ALT, ARV2, CIPO, PALMEIRA, BAMBU, CONECT, TRILHAS, AREA-BASAL, ESTRAT, RECREA, ENS/PESQ. A partir dessas variáveis, foi realizada uma terceira seleção de variáveis a priori, através de correlação de Spearman, entre a riqueza e a abundância de espécies de pequenos mamíferos com as variáveis de habitat acima, sendo selecionadas apenas as variáveis que apresentaram $p \leq 0,05$. Finalmente, a relação entre a riqueza e a abundância de espécies de pequenos mamíferos com o habitat foi analisada através de modelos lineares generalizados (GLM), onde os melhores modelos foram escolhidos utilizando o critério de informação de Akaike corrigido (AICc), considerando o valor de Delta (Δ) $AICc \geq 2$. Nesta análise, foram utilizadas as variáveis ARV1, ARV2, ENS/PESQ e EXTRAT para a riqueza de espécies e ENS/PESQ e EXTRAT para a abundância. Para a GLM foram utilizadas as médias das variáveis de habitat quantitativas e categóricas de cada transecto. Para as variáveis, presença de atividade extrativista, recreação e ensino/pesquisa, foram utilizados os valores brutos, uma vez que estas medidas foram feitas para cada transecto.

Foram calculados índices de heterogeneidade e complexidade do habitat para cada transecto a partir das variáveis de habitat selecionadas. A influência da heterogeneidade e da complexidade na riqueza e abundância das espécies foi investigada utilizando-se correlação de Spearman. As variáveis utilizadas para o cálculo do índice de heterogeneidade e que representam uma estrutura horizontal do habitat, foram: OFV, SUB2, CIPO, PALMEIRA, BAMBU, TRILHAS, AREA-BASAL. As variáveis utilizadas para o cálculo do índice de complexidade, que representam uma estrutura vertical do habitat, foram: ALT, CONECT, ARV1 e ARV2. Os índices de heterogeneidade e complexidade foram calculados como sendo os escores do eixo 1 das análises de componentes principais (PCA) utilizando-se os dados de suas respectivas variáveis (August, 1983).

O nível de significância considerado nos testes de hipótese foi de 5% em todas as análises. Para a ANOVA e Kruskal Wallis foi utilizado o pacote stats (R Core Team, 2016), a correlação foi feita com o pacote Hmisc (Harrel Jr., 2016) e a nMDS e as GLM com o pacote vegan (Oksanen *et al.*, 2017) do software RStudio versão 1.0.36. As

análises de curva de rarefação e estimador de riqueza foram realizadas no software PAST versão 2.17c.

4.7 Captura e procedimentos com os animais

4.7.1 Tipos de iscas

A isca utilizada para a captura dos pequenos mamíferos foi uma mistura generalista composta de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim (Figura 13), preparada para atrair pequenos mamíferos de hábitos frugívoros, granminívoros e carnívoros/insectívoros. Durante todo o período de capturas, as armadilhas (exceto as *pitfalls*) foram iscadas no final da tarde e visitadas na manhã seguinte para checar a presença de animais capturados. Sempre que necessário, as iscas eram repostas (checagem diária), e substituídas completamente a cada dois dias.



Figura 13 – Preparo da isca composta por uma mistura de bacon, aveia, banana e pasta de amendoim, utilizada na captura dos pequenos mamíferos. Imagens: Charle F. Crisóstomo.

4.7.2 Transporte, contenção e coleta biométrica

Nas checagens diárias matinais, as armadilhas contendo os animais capturados foram transportadas imediatamente para uma base laboratorial de campo (Figura 14A) onde sequencialmente os animais foram contidos (Figura 14B) e anestesiados (Figura 14C), conforme orientação veterinária, atendendo às normas estabelecidas pela Resolução nº. 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 20 de junho de 2002 e condições requeridas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz, Licença LW-39/14 (Anexo 8.2). Em seguida, dados binômicos como peso corpóreo, medida do corpo, cauda, pés e orelha, foram registrados no formulário de campo (Anexo 8.4). Além desses, também foram

registrados no formulário observações sobre o sexo, estado reprodutivo, presença de ectoparasitas e dentição, para estimativa etária, no caso dos marsupiais. O estado ou atividade reprodutiva foi constatado pela ocorrência de gestação nas fêmeas de roedores (presença de embriões) e pela ocorrência de lactação nas fêmeas de marsupiais, com presença de filhotes no marsúpio ou pelo intumescimento das tetas indicando presença de leite e desmame recente. Também foi observada, como indicador de atividade reprodutiva nas fêmeas de roedores, a condição externa da vagina (fechada ou aberta e presença de secreção).



Figura 14. A) Instalações do laboratório de campo para eutanásia dos pequenos mamíferos capturados e obtenção das amostras biológicas; B) Contenção de um roedor; e C) Anestesia de um roedor. Imagens: Charle F. Crisóstomo.

4.8 Coleta do material biológico

A coleta de material biológico dos pequenos mamíferos incluiu amostra de sangue, de órgãos específicos e medula óssea (Figura 15). O sangue foi coletado por punção cardíaca (seringas de 1-3 ml de acordo com o tamanho do animal) para análises sorológicas de investigação quanto à infecção por hantavírus (Figura 15A). Amostras de órgãos (rim, fígado, baço, pulmão e coração) foram preservadas em Trizol para posterior diagnóstico molecular e confirmação da infecção por hantavírus e bartonelas (Figura 15B).

Para auxiliar na identificação taxonômica dos roedores, foram coletadas amostras de medula óssea do fêmur, com a finalidade de extrair o material genético de suas células, que foram preservadas em suspensão no fixador Carnoy, para realização de análise cariotípica. Com o mesmo fim, amostras de fígado foram fixadas e preservadas em etanol para estudos moleculares (Figura 15C).

A eutanásia dos animais previamente sedados, após a extração dos dados bionômicos, foi realizada preferencialmente, por exanguinação cardíaca total. Nos casos de impossibilidade de sua realização foi feita inoculação intracardíaca de cloridrato de ketamina, numa superdosagem (acima de 50 mg/Kg de peso), conforme descrito em Rivera, 2007.



Figura 15. Procedimentos realizados no laboratório de campo nos pequenos mamíferos capturados. A= Punção Cardíaca, B= Retirada de órgãos e tecidos para diagnóstico de infecções, e C= Coleta de amostras de fígado para obtenção de DNA dos pequenos mamíferos. Imagens: Charle F. Crisóstomo.

4.9 Estabelecimento da Coleção Científica dos Pequenos Mamíferos

Todos os espécimes de pequenos mamíferos (pequenos roedores e marsupiais) coletados, bem como os doados pelo IEC/PA, tiveram suas peles preparadas em meio seco (taxidermia) (figura 16 A e C). Os crânios/esqueletos foram também preparados, sendo sua musculatura retirada com auxílio de larvas de *Dermestes* sp. (Coleoptera: Dermestidae), em colônia estabelecida no LABPMR (figura 16B). Além destes, espécimes de outras taxa (grandes roedores, cingulatas, cervídeos, tayassuídeos, felídeos e primatas) provenientes de doações de moradores locais e/ou recolhidos em estradas, vítimas de atropelamentos, foram também preparados e incorporados ao acervo. Após preparação dos espécimes, todos foram etiquetados com as seguintes informações padrão: identificação taxonômica, data e local de captura, identificação e número de livro do coletor, sexo, peso, medidas corporais (tamanho do corpo, cauda, orelha e pata traseira), e observações gerais, quando necessárias. Todos os espécimes foram depositados na coleção do LBPMR/IOC e formam acervo testemunho das espécies de mamíferos do estado do Acre.



Figura 16. Taxidermia e preparação dos esqueletos dos pequenos mamíferos. (A) Preenchimento das peles com algodão hidrofóbico; (B) Preparação de esqueletos para limpeza em colônia de *Dermestes* sp. (C) Secagem de peles de marsupiais após processo de taxidermia. Imagens: Charle F. Crisóstomo.

4.10 Biossegurança

Considerando a possibilidade da captura de roedores infectados por hantavírus, e por ser este um agente biológico pertencente à classe de risco nível 3, toda equipe foi treinada para observar os protocolos de biossegurança no manuseio de animais silvestres, preconizados pela Comissão de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz (Lemos & D’Andrea, 2014), incluindo treinamento para a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) e de proteção respiratória que contempla filtros de ar motorizados, máscaras com pressão positiva, jaleco, luvas e botas. A Figura 17 apresenta alguns destes equipamentos.



Figura 17. Utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) nível 3 de biossegurança utilizados no manuseio e nas necropsias dos pequenos mamíferos, realizados nos laboratórios estabelecidos no campo. (A) Máscara de pressão positiva; (B) Jaleco impermeável; (C) Filtro P3 de ar motorizado; e (D) Luvas de látex para procedimento. Imagens: Charle F. Crisóstomo.

4.11 Considerações Éticas

Todos os procedimentos realizados neste projeto de pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ) sob o número LW-39/14 (Anexo 8.2). As expedições realizadas de coleta de animais estão de acordo com licença de captura para todo o território nacional (ICMBIO/IBAMA, licença permanente nº 13373 (Anexo 8.3).

4.12 Taxonomia: Técnicas utilizadas para identificação dos espécimes

4.12.1 Morfologia externa e craniana

A identificação em nível específica dos espécimes de pequenos mamíferos foi realizada no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios LABPMR/FIOCRUZ em parceria com o Laboratório de Genética do Instituto Nacional do Câncer INCA/RJ, com a participação de colaboradores especialistas nos diversos taxa coletados, sob a coordenação geral da Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino.

Inicialmente, no campo, se recorreu a técnicas morfológicas baseadas em análises das características externas dos animais. Com essas técnicas todos os espécimes coletados foram identificados em nível de gênero, sendo possível a identificação em nível específico, apenas para algumas poucas espécies.

A identificação específica da maioria das espécies só foi possível, no laboratório, pela aplicação de técnicas citogenéticas e moleculares, como cariotipagem e sequenciamento de DNA.

4.12.2 Cariotipagem

Com a técnica de cariotipagem (Citogenética) foi possível determinar o número cromossômico diplóide e fundamental de alguns espécimes dos diferentes gêneros de roedores e associar cada complemento cromossômico aos caracteres morfológicos de cada espécie, confirmando a identificação morfológica. Para tanto, células em suspensão foram obtidas por cultura de medula óssea por 2 horas a 37°C realizadas em campo com meio estéril previamente preparado em tubos de prolipropileno de 15

ml contendo RPMI1640 (80%), soro bovino fetal (20%), colchicina (10⁻⁶M) e brometo de etídio (5µg/ml). Após incubação os tubos foram centrifugados por 5-10 minutos e re-suspendido em 10 ml de solução hipotônica fresca (KCl 0,075M). Após 30 minutos de hipotonização à temperatura ambiente uma fixação inicial foi feita adicionando 1ml de Carnoy fresco (3 Metanol:1 Ácido Acético) na solução hipotônica, seguido de centrifugação por 5-10 minutos.

O material foi então fixado em 10 ml de Carnoy para posterior processamento em laboratório. As amostras das células em suspensão foram preparadas em lâminas e coradas com Giemsa (4%) em tampão fosfato. Após a preparação das lâminas as imagens das metáfases foram obtidas via microscópio óptico acoplado com câmara digital. Após a obtenção das fotografias das metáfases, os cariótipos foram montados seguindo uma ordem decrescente de tamanho dos autossomos, sendo que os cromossomos sexuais foram colocados a parte. As técnicas citogenéticas (cariotipagem) foram realizadas em colaboração com a Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino e sua equipe no INCA/RJ.

4.12.3 Análise molecular da diversidade de espécies de roedores do estado do Acre.

A confirmação da identificação taxonômica através de análises moleculares foi realizada para roedores, mas somente para algumas espécies. Dessa forma, diante da impossibilidade de se identificar taxonomicamente, em nível específico, a partir da morfologia externa e da cariotipagem, técnicas moleculares como a amplificação de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, seguida de sequenciamento de DNA e análise filogenética também foram utilizadas para comparação de identificação do espécime em nível taxonômico. A aplicação de todas as técnicas acima apresentadas seguiu protocolo específico para cada fase e espécie analisada.

Os protocolos de extração de DNA utilizados foram Fenol Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), Kit QIAamp DNA Mini da Qiagen com o protocolo modificado e Chelex, baseado no protocolo de Walsh *et al.* 1991. A integridade das amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% observada em transiluminador de luz ultravioleta (UV). Foi amplificado o gene mitocondrial da citocromo b (MT-CYB) completo (1.140 pares de base), pela técnica PCR (reação em cadeia da polimerase, do inglês, polymerase chain reaction) em um termociclador modelo Veriti Mastercycler Gradient (Applied Biosystems), utilizando os iniciadores

MVZ 05 e CITB-REV, obtendo-se aproximadamente 1.200 pares de base. Para um total de 25µl de reação, foi adicionado 1µl de DNA e 24µl de mix preparado em cabine de fluxo laminar com os reagentes do Kit Platinum Taq DNA Polymerase utilizando protocolo modificado.

A PCR deu-se sob as seguintes condições:

Condição 1 - Desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C, por 45 segundos, hibridização a 48°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos.

Condição 2 - Desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; seguida por 5 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, hibridização a 45°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; em seguida, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, hibridização a 51°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos.

Concluída a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, observadas em transiluminador UV e registradas em fotografia digital. Após a amplificação dos fragmentos, o material foi purificado utilizando os protocolos dos Kits GE (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification) e Qiagen (QIAquick PCR Purification). Finalmente, foram realizadas reações de sequenciamento para o gene MT-CYB. O método utilizado no sequenciamento foi o método de Sanger e a leitura das sequências foi feita em sequenciador 3730XL DNA analyser (Applied Biosystems). A reação e leitura de sequenciamento foi feita na Unidade Tecnológica de Sequenciamento de DNA do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ, com o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing e protocolo modificado.

Utilizando o programa Geneious 9, as sequências resultantes de cada exemplar foram mapeadas a uma sequência de referência, editadas e reunidas em consensos, que foram alinhados a sequências do GenBank, constituindo assim uma matriz com 76 sequências de *Proechimys*. A partir do alinhamento foi gerada uma filogenia de máxima verossimilhança aproximada, através do programa FastTree 2.1. Foi utilizado o modelo GTR+G e os suportes dos ramos foram calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

As técnicas moleculares foram realizadas em colaboração com a Dra Cibele Bonvicino, o Dr. Roberto do Val Vilela, a MSc. Tatiana Pádua, o MSC. Jonathan Gonçalves e a aluna de Iniciação Científica Karina Diniz, todos da equipe do LABPMR.

4.12.4 Análise molecular da diversidade de espécies de marsupiais do gênero *Monodelphis* spp do estado do Acre

Foram utilizados vinte e oito espécimes de *Monodelphis* spp. coletados em quatro áreas deste estudo (1,2,3,4,) sendo também incluídos para compor as amostras de espécimes da região, mais dois espécimes do acervo da coleção do LABPMR, coletados em Rondônia (5), (Figura18).

1. Porto Acre-AC, Reserva Florestal Humaitá (RFH), *Monodelphis glirina* (Fêmea: LBCE 18380, 18398, 18407, 18437cy, 18457, 18473cy, 18530cy, 18531, 18561, 19798, 19803, 19835cy, Macho: LBCE 18473, 19799, 19820cy), *Monodelphis peruviana* (Macho: LBCE 18448cy, 18568cy, 19823cy), *Monodelphis emiliae* (Fêmea: LBCE 19847);
2. Rio Branco-AC, Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ), *Monodelphis peruviana* (Macho: LBCE18498cy, 18499cy);
3. Senador Guiomard-AC, Fazenda Experimental Catuaba(FEC), *Monodelphis glirina* (LBCE 18046, Macho: LBCE 18056cy);
4. Xapuri-AC, Floresta do Seringal Cachoeira (FSC), *Monodelphis emiliae* (Macho: LBCE18420, F: LBCE 18424cy, 19767, 19773), *Monodelphis glirina* (Macho: LBCE 19871cy);
5. Alto Paraíso-RO, Fazenda do Sr. Bento, *Monodelphis glirina* (Macho: LBCE 7698cy, Fêmea: LBCE 7699 cy).

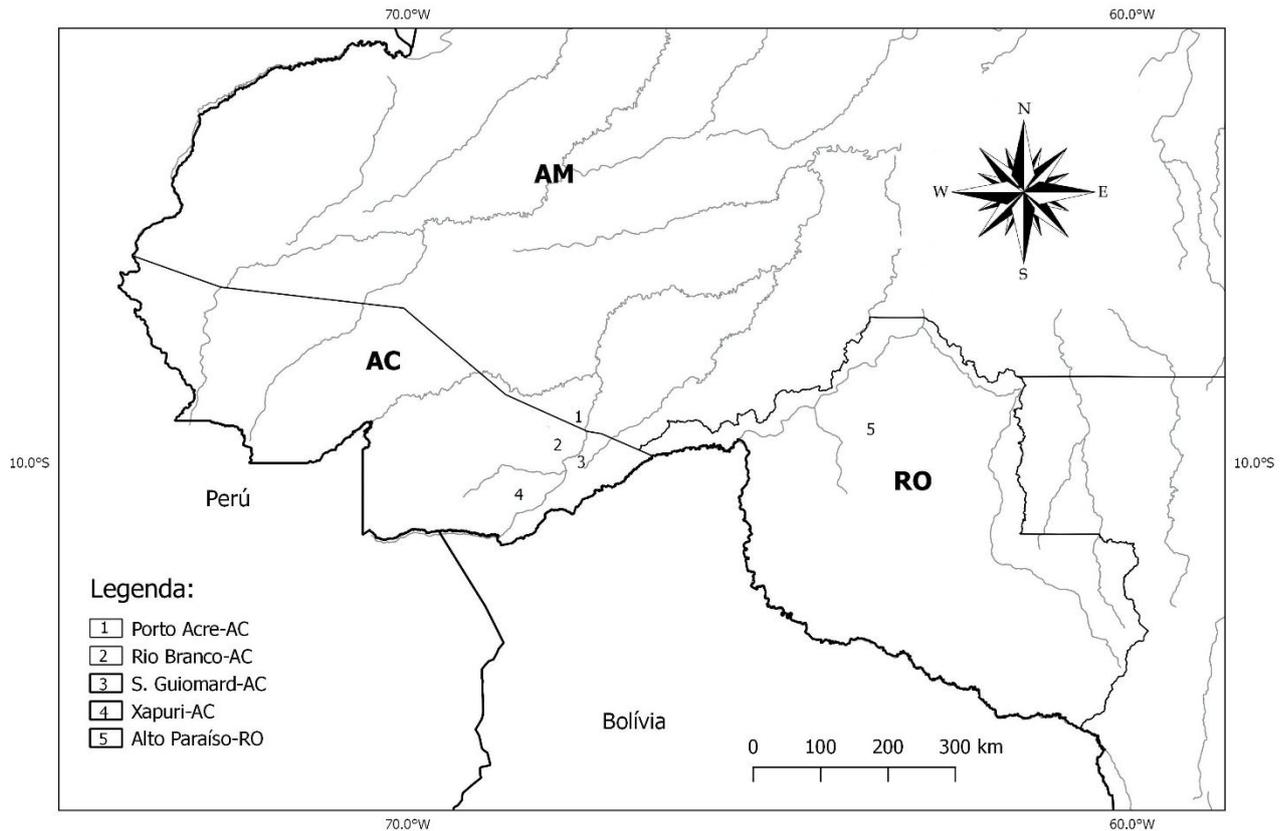


Figura 18. Localização dos espécimes utilizados nas análises moleculares sobre a diversidade de espécies de *Monodelphis* spp. que ocorrem no Acre. (1) *M. glirina*, *M. peruvia* e *M. emiliae*; (2) *Monodelphis peruviana*; (3) *M. glirina*; (4) *M. glirina* e *M. emiliae*; (5) *M. glirina*. Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo.

O DNA foi isolado de amostras de tecido hepático preservadas em etanol seguindo um protocolo de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Para análises filogenéticas, o gene do citocromo b (MT-CYB, 1140 pb) foi amplificado utilizando os iniciadores L14724 (Irwin *et al.*, 1991) e CIT-REV (Casado *et al.*, 2010), seguindo um passo de pré-desnaturação em 94 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, hibridização a 54 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1:30 min; com uma extensão final de 72 °C por 5 min. Estas condições de ciclagem foram utilizadas para todos os marsupiais exceto os do gênero *Monodelphis*. Para estes foi realizada uma PCR *Touchdown* seguindo um passo de pré-desnaturação em 94 °C por 2 min; 5 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, hibridização a 58 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; 5 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, hibridização a 56 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; 5 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg,

hibridização a 54 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; 20 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, hibridização a 52 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; com uma extensão final de 72 °C por 7 min.

Os amplicons foram purificados utilizando o GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Brasil), e sequenciados na Plataforma do IOC, usando os mesmos primers mais os iniciadores internos MVZ16 (Smith e Patton, 1993) e CB-in2. Oito *M. glirina*, cinco *M. peruviana* e um *M. emiliae* foram sequenciados para o citocromo mitocondrial b (1140 pb) (cytb, ver espécimes acima marcados com cy), representando as diversas regiões estudadas.

Sequências de DNA disponíveis no banco de dados GenBank foram incluídas na análise filogenética, bem como marsupial *D. albiventris* (KT447517) utilizado como grupo externo, sendo eles os indivíduos da espécie *M. glirina* (números de acesso GenBank HM998559, KM071536-KM071546, KM071548-KM071554), *M. emiliae* [DQ385832-DQ385835, DQ386617, KM071382, KM071383, KM071602-KM071607], *M. peruviana* [DQ385840, DQ386615, HM998589, HM998590, KJ129901, KM071405-KM071407, KM071409, U34676], *M. osgoodi* [KM071401], *M. handleyi* [DQ386631, DQ386632, KM071400], *M. adusta* [HM998564, KM071398], *M. kungsi* [KM071558, KM071559], *M. gardneri* [KM071565-66], *M. sanctaerosa* [KM071527],

O modelo de substituição de nucleotídeos mais apropriado para reconstruções filogenéticas foi selecionado usando MODELGENERATOR, versão 0.85 (Keane *et al.*, 2006) usando o critério de informação bayesiano (BIC). As análises de máxima verossimilhança (ML) foram realizadas com PHYML versão 3.1 (Guindon *et al.*, 2010). O suporte de filial foi calculado usando o teste de razão de verossimilhança aproximada (aLRT) com a interpretação de SH (Anisimova & Gascuel 2006; Guindon *et al.*, 2010). As estimativas de divergência genética interespecífica e a variação intraespecífica foram calculadas utilizando a distância p

Uma rede de haplótipos (versão 4.5.1.6, disponível em <http://www.fluxus-engineering.com>) foi usada para reconstruir uma rede de integração mediana (MJ) (Bandelt *et al.*, 1999) usando apenas sites variáveis e excluindo sites que continham dados perdidos para avaliar a estrutura da população e os padrões de distribuição geográfica.

As técnicas moleculares foram realizadas em colaboração com a Dra Cibele Bonvicino e a MSc. Tatiana Pádua do LABPMR.

4.13 Testes de infecções associadas aos pequenos mamíferos

Os testes diagnósticos que foram realizados nas amostras coletadas dos pequenos mamíferos se restringiram a pesquisa de infecção por hantavirus e bartonelas. As análises sorológicas e moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Hantavirose e Rickettsioses, IOC/FIOCRUZ, sob a supervisão da Dra Elba R. S. Lemos. A metodologia seguiu protocolos específicos para as duas infecções, estabelecidos no referido laboratório conforme descrito sucintamente a seguir.

4.13.1 Análise sorológica para detecção de infecção por hantavírus

A análise sorológica foi realizada com o teste imunoenzimático – ELISA para detecção de anticorpos anti-hantavírus da classe IgG, utilizando o antígeno Araraquara fornecido pelo Prof. Dr Luiz Tadeu Figueiredo da USP/Ribeirão Preto, São Paulo (Figueiredo *et al.*, 2009). Para realização do teste, placas de 96 poços foram sensibilizadas com proteína recombinante do nucleocapsídeo do hantavírus Araraquara (ARAV-N) na metade superior (linhas A, B, C e D) e extrato de *E. coli* usado como controle negativo na metade inferior (linhas E, F, G e H) diluídos em solução tampão carbonato-bicarbonato na concentração de 0,2µg/ µL, durante incubação por uma noite (*overnight*) a 4°C. Em seguida, após lavar a placa por 5 vezes com PBS pH 7.4 acrescido de Tween (PBS-T) 1X a 0,05%, foi adicionada solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 10% em PBS-T). Após incubação da placa a 37°C por duas horas e subsequente etapa de lavagem, as amostras de soro, sabidamente positivas e negativas utilizadas como controle do teste, e as amostras em teste foram adicionadas na diluição de 1/400 em solução de bloqueio.

Após nova incubação a 37°C por uma hora e etapa de lavagem por 6 vezes, anticorpos secundários anti-*Peromyscus leucopus* e anticorpos anti-*Rattus rattus* marcados com peroxidase foram utilizados como conjugado na diluição de 1/3000 em solução de bloqueio. Em continuação, após incubar e lavar novamente a placa, um substrato cromogênico (o-phenylenediamine = OPD) diluído em solução Citrato-fostato (pH 4,9 a 5,2) foi adicionado acrescido de peróxido de hidrogênio e a placa então foi incubada por 15 a 20min a 37°C. Após o bloqueio da placa com adição de HCl a 1M, a absorbância foi mensurada a 490 nm em espectrofotômetro.

A diluição do soro foi considerada positiva quando a densidade ótica (DO) foi superior a 0,3. A DO final de cada diluição de soro foi calculada como a diferença entre o valor da DO mensurada nos poços sensibilizados com a proteína ARAV-N e aqueles sensibilizados com o antígeno controle negativo. Um título > 1: 400 foi considerado positivo.

Extração do RNA viral e Reação em cadeia da polimerase - PCR

As amostras de fragmentos de tecidos (pulmão, rim ou fígado) de roedores, previamente identificados como sororreativos foram submetidas à extração do RNA viral pelo kit comercial PureLink™ (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. A partir do RNA total extraído foram realizadas a síntese e posterior amplificação do cDNA em uma única etapa (*One Step PCR*) com utilização do Mini Kit SuperScript III™ Reverse Transcriptase *One Step* (Invitrogen) e de *primers* específicos para o segmento S viral (Guterres *et al.* 2015). Na PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,5 µl (100 pmol/µl) do *primer* H04-25F (5'-TAGTAGACTCCTTGAKAAGCT – 3'), 0,4 µl (100 pmol/µl) do *primer* H733-752R (5' – TCWATCCTTTCCATCCARTC – 3'), 0,5 µl de SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 12,5 µl de 2X Mix da reação (0,4 mM de dNTP + 3,2 mM de MgSO₄), 8,9 µl de água nuclease-free e 0,2 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgSO₄), com um volume total de 23 µl. Esta mistura era então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e acrescentados 2 µl de RNA da amostra, totalizando um volume final de 25 µl. Os tubos eram então alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma primeira etapa de 48°C por 45 minutos para amplificação do cDNA, seguida de uma fase inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 51°C por 40 segundos, 68°C por 50 segundos, finalizando com uma etapa de extensão de 68°C por 5 minutos e uma temperatura final de 4°C.

Uma PCR Semi-Nested foi realizada para aumentar a sensibilidade da amplificação. Tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução contendo: 0,25 µl (100 pmol/µl) do primer H274-791F (5'- CCACTTGATCCAACAGGG – 3'), 0,25 µl (100 pmol/µl) do primer H733-752R (5' – TCWATCCTTTCCATCCARTC – 3') (Guterres *et al.* 2015), 0,1 µl (5U/µl) de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen), 0,25µl de dNTP (20mM), 2,5 µl de tampão PCR 10X, 0,75 µl (50mM) de Cloreto de

Magnésio (MgSO₄) e 18,9 µl de água nuclease-free, com um volume total de 23 µl. Esta mistura era então distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) e então era acrescentado 2 µl do produto da primeira PCR da amostra, com um volume final de 25 µl. Os tubos eram então alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma primeira etapa de 94°C por 2 minutos seguida por 25 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, uma extensão de 72°C por 5 minutos e uma temperatura final de 4°C.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e analisados por meio de transluminador. Considerando que nenhuma das amostras sororreativas foram PCR positivas, não foram realizadas as etapas de purificação e sequenciamento nucleotídico.

4.13.2 Análise molecular para detecção de infecção por *Bartonella* spp.

Do total de animais capturados nas expedições das áreas da FPZ, RFH e SEC, foram coletadas amostras de baço de 196 pequenos mamíferos (111 roedores de 13 espécies e 85 marsupiais de 11 espécies). As amostras foram fixadas em Trizol ou RNA Later e armazenadas em microtubos mantidos a 20 ° C até a extração do DNA.

Extração de DNA.

O DNA foi extraído de 10 mg de cada tecido de baço dos pequenos mamíferos, usando o QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com o Protocolo e instruções do fabricante.

Reação em cadeia da polimerase, Purificação e Sequenciamento nucleotídico

Para a análise molecular para *Bartonella* spp. foram utilizados iniciadores específicos Bar-gltA F1 e Bar-gltA R1 (731pb), desenvolvidos no LHR/FIOCRUZ (Rozenal *et al* 2017). Na PCR, tubos de 0,5 mL foram utilizados para preparar a solução do mix contendo: 0,5 µl (100 pmol/µl) do *primer* Bar-gltA, 0,5 µL (100 pmol/µl) do *primer* Bar-gltA R1, 0,2 µl de enzima Gold Taq DNA Polymerase, 0,25 µl de dNTP 20mM, 2,5 µl de tampão PCR 10X, 14,05 µl de água nuclease-free e 4,0 µl (50mM) de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), com um volume total de 22 µl. Esta mistura foi

distribuída em microtubos para PCR (0,2 mL) com subsequente adição de 3 µl de DNA da amostra, totalizando um volume final de 25 µl. Os tubos eram, em seguida, alocados em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) que realizava uma fase inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 40 segundos, 72°C por 55 segundos, finalizando com uma etapa de extensão de 72°C por 10 minutos e uma temperatura final de 4°C. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,0% e analisados por meio de transluminador.

Os produtos amplificados no tamanho esperado foram purificados usando o QIAquick Kit e sequenciados com BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, versão 3.1 em um sequenciador automático (Applied Biosystems, modelo ABI PRISM 3130x). As sequências foram analisadas utilizando o MEGA7 software e correlacionadas para determinar sua similaridade com sequências previamente identificadas e depositadas no GenBank, utilizando o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências obtidas no sequenciamento e em bancos de dados foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE no programa Seaview4 e as relações filogenéticas foram estimadas usando inferência filogenética por Máxima Verossimilhança implementado na ferramenta PhyML.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento da coleção científica de pequenos mamíferos para o estado do Acre.

O acervo de mamíferos do Acre, depositado no LABPMR/IOC, formado durante a realização deste estudo (Figura 19), conta com 534 espécimes representando 7 ordens e 11 famílias (Tabela 1, Figura 20). Os roedores formam o principal grupo representado no acervo, com 321 espécimes, de 4 famílias (Tabela 1, Figura 21). Os marsupiais (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*) formam o segundo grupo melhor representado com 202 espécimes de duas subfamílias. Mamíferos de médio e grande porte doados por moradores ou encontrados atropelados estão representados por 5 ordens e 6 famílias. Os dados apresentados acima apesar de não representar a fauna de mamíferos para todo o estado Acre, confirma as observações de Paglia *et al.*, (2012), sobre a heterogeneidade da composição dos pequenos mamíferos não-voadores da Amazônica, onde se confirmou maior número de captura entre roedores (60%), quando comparado à diversidade de marsupiais (32%) (Figura 20).

Apesar da lacuna amostral para a maioria dos municípios do estado, o acervo aqui apresentado, representa oito localidades do Acre, principalmente da região leste do estado, com apenas uma localidade na região noroeste e constitui-se na maior fonte de material científico, sistematizado para o estado (Figura 19).

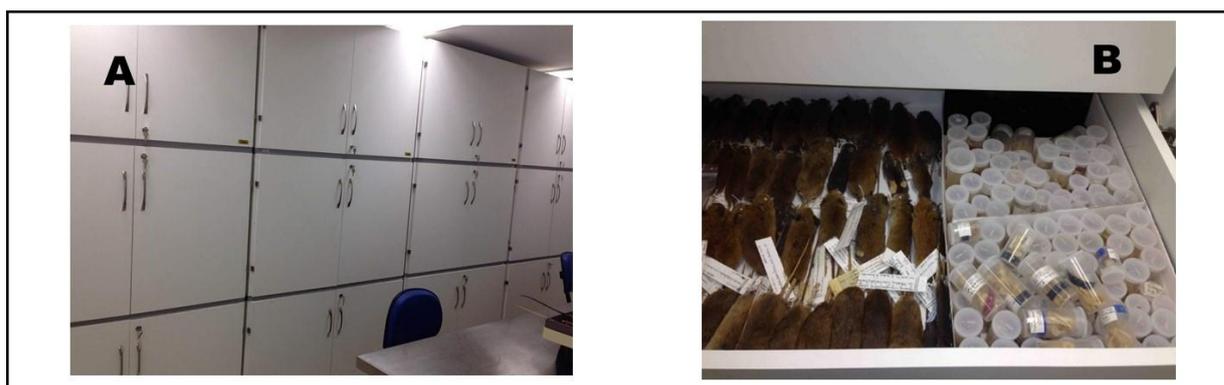


Figura 19. Coleção científica do LABPMR, IOC/FIOCRUZ onde está depositado o acervo de espécimes de mamíferos provenientes do Acre. A) Armários para acomodações de peles e esqueletos; B) Gaveta com peles e esqueletos de roedores organizados por gênero. Imagens: Charle F. Crisóstomo

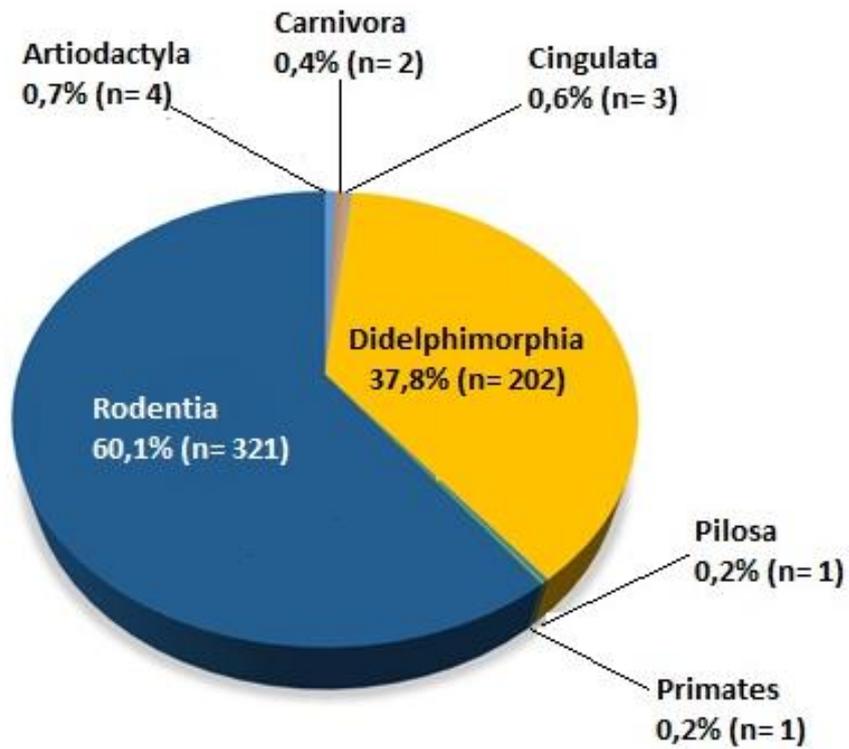


Figura 20. Mamíferos doados e coletados no estado do Acre, no período de 2013 a 2016, de acordo com as 7 ordens identificadas.

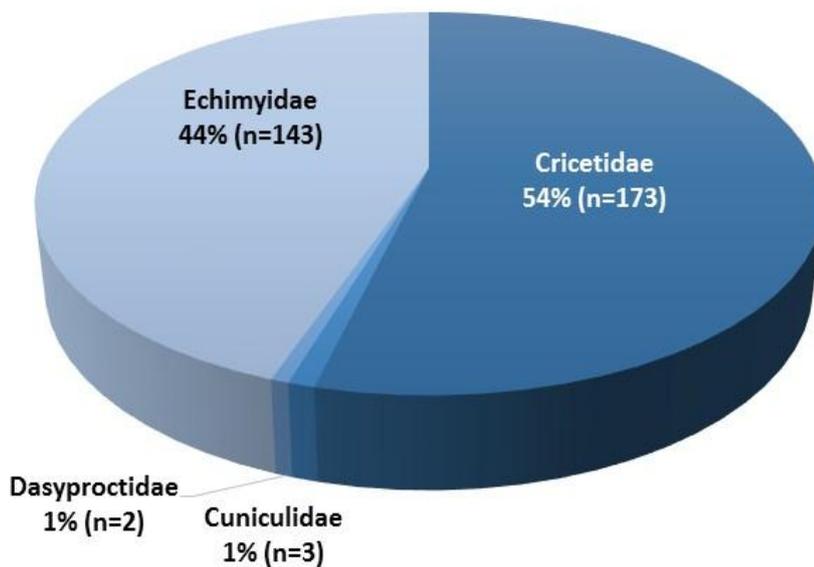


Figura 21. Roedores coletados no estado do Acre, no período de 2013 a 2016, de acordo com as quatro famílias identificadas.

Tabela 1. Lista das espécies de mamíferos capturadas, no período de 2013 a 2016, discriminando a quantidade de espécimes encontrada nos sete municípios de estudo no estado do Acre.

Taxons	Áreas do estudo (Municípios/localidades)							Total	
	Senador Guimard (FEC)	Rio Branco (FPZ)	Rodrigues Alves (PNC)	Porto Acre (RFH)	Porto Acre (IEC)	Xapuri (FSC)	Brasiléia		Capixaba
DIDELPHIMORPHIA									
Didelphidae									
Caluromys									
<i>Caluromys lanatus</i> (Olfers, 1818)						1			1
Didelphis									
<i>Didelphis marsupialis</i> (Linnaeus, 1758)	1		5	1		5			12
Marmosa Micoureus									
<i>Marmosa demerarae</i> (Thomas, 1905)	5	2		31		12			50
<i>Marmosa regina</i> (Thomas, 1898)	7	1		32		2			42
Marmosops									
<i>Marmosops bishopi</i> (Pine, 1981)				3		2			5
<i>Marmosops impavidus</i> (Tschudi, 1844)	1								1
<i>Marmosops ocellatus</i> (Tate, 1931)	1	3		20		5			29
Metachirus									
<i>Metachirus nudicaudatus</i> (É. Geoffroy, 1803)			6	3					9
Monodelphis									
<i>Monodelphis emiliae</i> (Thomas, 1912)				1		4			5
<i>Monodelphis glirina</i> (Wagner, 1842)	2			15		1			18
<i>Monodelphis peruviana</i> (Osgood, 1913)		2		3					5
Philander									
<i>Philander mcilhennyi</i> (Gardner & Patton, 1972)	0	0	0	3		0			3
<i>Philander opossum</i> (Linnaeus, 1758)	1	9	6	6		0			22
Didelphimorphia Total	18	17	17	118	0	32	0	0	202

^{PCE} animais com pele, crânio e esqueleto depositados na coleção (doados por moradores locais ou encontrados atropelados);

^{PC} animais apenas com pele e crânio depositados na coleção (doados por moradores locais ou encontrados atropelados);

^C animais apenas com crânio depositado na coleção (doados por moradores locais ou encontrados atropelados);

^S animais soltos, mas com tecido ou pele coletados.

OBS: todos os demais animais possuem pele, crânio e esqueleto depositados na coleção (coletados no campo por armadilhas).

5.2 Técnicas de identificação das espécies

Todos os mamíferos coletados foram identificados por técnicas morfológicas (MO), citogenéticas (CA) e/ou moleculares (MO) (Figura 22). Do total de 534 mamíferos coletados, 54,3% dos espécimes (n = 290) foram identificados em nível específico apenas por técnicas morfológicas através da observação dos caracteres externos das peles, morfologia dos crânios e dentição. Desta forma, por esta técnica, 137 espécimes de roedores foram classificados em 14 espécies, e 142 espécimes de marsupiais foram classificados em 13 espécies.

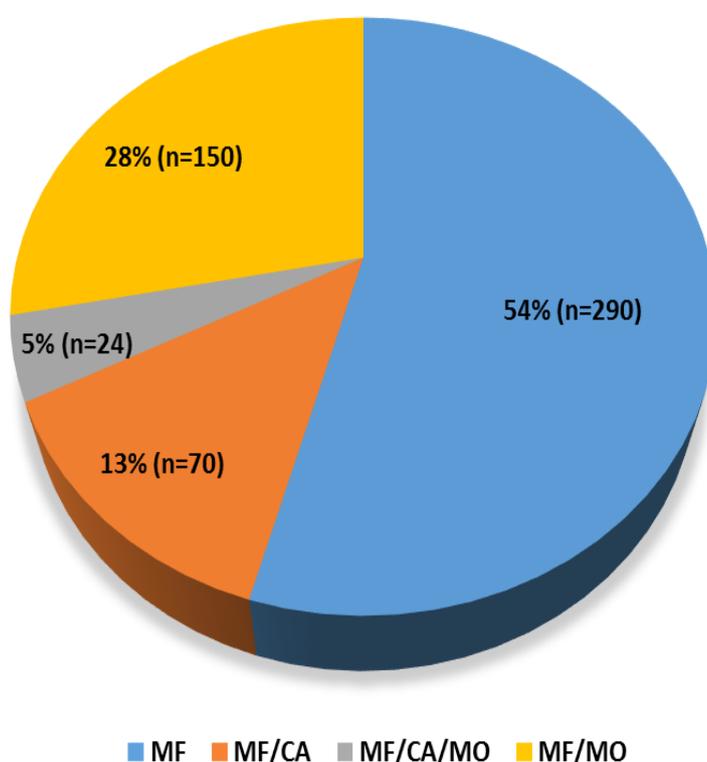


Figura 22. Técnicas utilizadas na identificação em nível específico dos pequenos mamíferos capturados no estado do Acre, período de 2013 a 2016. MF (Morfologia), MO (análise molecular), CA (análise citogenética).

Tabela 2. Espécies de pequenos mamíferos cariotipadas, do estado Acre, discriminando o número cromossômico diplóide (2n), número fundamental autossômico (NFa), cromossomo sexual feminino (X), cromossomo sexual masculino (Y), morfologia dos cromossomos (dois braços (M), um braço (A)). Localidade/município de coleta XA =Xapuri; PO=Porto Acre; SG=Senador Guiomard; RA=Rodrigues Alves; RB=Rio Branco.

Espécie	2n	NFa	X	Y	Complemento Autossômico	Localidade/Município de coleta	Ref.
<i>Hylaeamys perenensis</i>	52	62	A	A	12M e 38 ^a	XA	1
<i>Hylaeamys yunganus</i>	58	62	A	A	6M e 50 ^a	XA	1
<i>Mesomys hispidus</i>	60	116	M	M	58M	PO	1
<i>Neacomys aff. musseri</i>	36	62	M	M	28M e 6A	XA	Este estudo
<i>Neacomys spinosus</i>	64	68	M	A	6M e 56A	PO, XA	1
<i>Oecomys bicolor</i>	80	134	M	M	62M e 16A	PO	2
<i>Oecomys sp.</i>	90	104	M	M	16M e 72A	XA	Este estudo
<i>Oligoryzomys microtis</i>	64	66	M	A	4M e 58A	PO	2
<i>Proechimys aff. gardneri</i>	36	58	A	A	24M e 10A	PO, SG, XA	Este estudo
<i>Proechimys aff. gardneri</i>	38	58	A	A	22M e 14A	PO	Este estudo
<i>Proechimys brevicauda</i>	28	48	A	A	22M e 4A	PO, RA, XA	1
<i>Proechimys simonsi</i>	32	58	A	A	28M e 2A	PO, RA, RB, XA	1

Ref.: Cariótipos já descritos em (1) Patton *et al* (2000); (2) Gardner & Patton (1976).

Além destes, todos os mamíferos de médio e grande porte também foram identificados pela morfologia craniana e dentição. Para a identificação do restante dos animais foram utilizadas técnicas moleculares de sequenciamento de DNA e citogenéticas (Tabela 2, Figuras 23 e 24), associadas à análise morfológica prévia, tendo em vista que para muitas espécies somente a morfologia não é suficiente para sua identificação. Além disso, algumas espécies foram capturadas muito jovens, impossibilitando uma análise preliminar da morfologia externa.

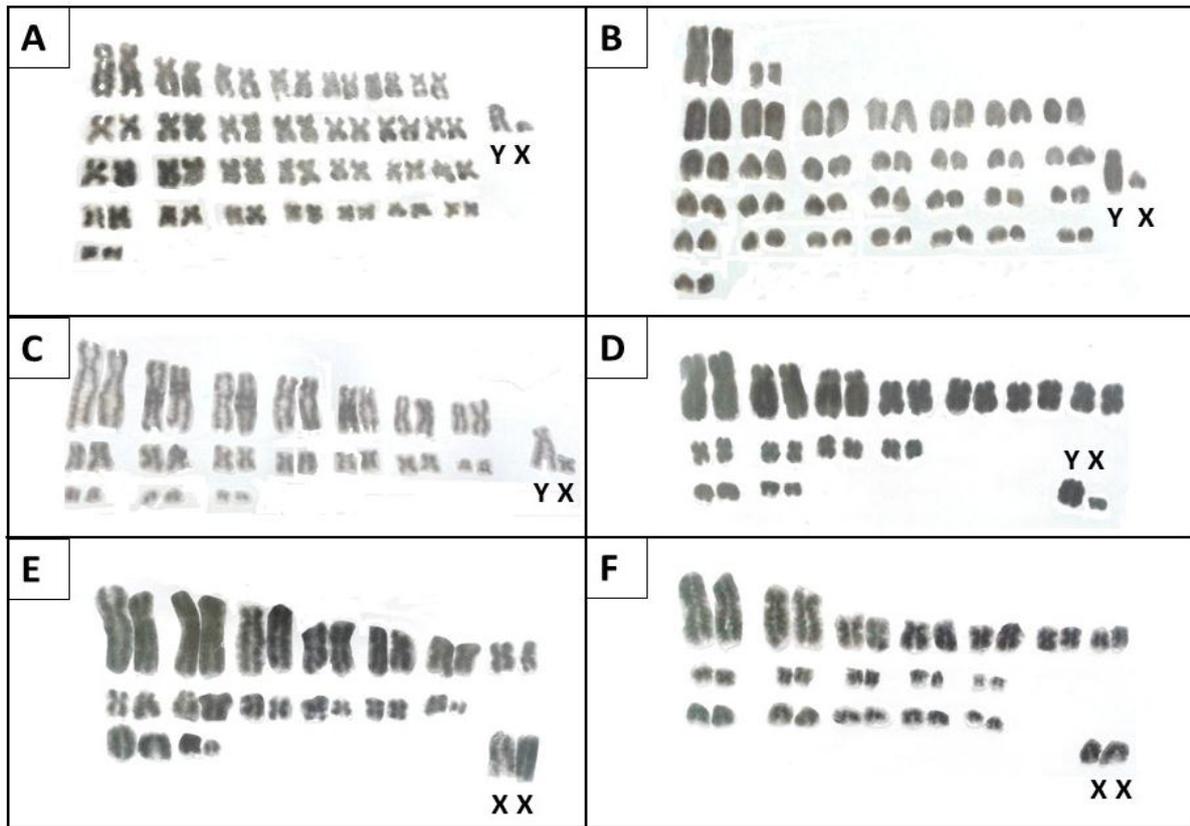


Figura 23. Cariótipos de (A) *Mesomys hispidus* $2n=60$ e $NFa=116$, Macho LBCE18470 de Porto Acre/AC, (B) *Oligoryzomys microtis* $2n=64$ e $NFa=66$, Macho LBCE18403 de Porto Acre/AC, (C) *Neacomys aff. musseri* $2n=36$ e $NFa=62$, Macho LBCE18429 de Xapuri/AC, (D) *Proechimys brevicauda* $2n=28$ e $NFa=48$, Macho LBCE18406 de Porto Acre/AC, (E) *Proechimys simonsii* $2n=32$ e $NFa=56$, Fêmea LBCE18374 de Rio Branco/AC, (F) *Proechimys aff. gardneri* $2n=36$ e $NFa=58$, Fêmea LBCE18425 de Xapuri/AC. Imagens: Bernardo Teixeira

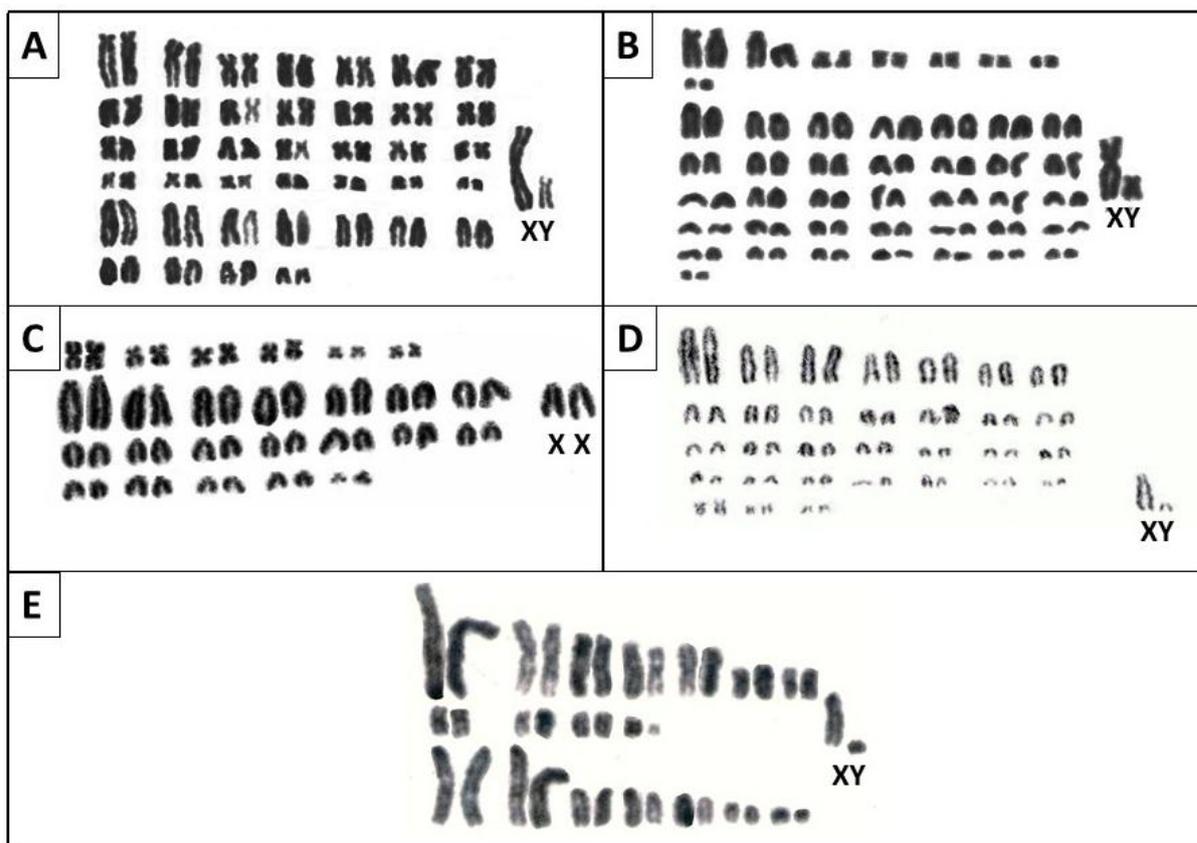


Figura 24. Cariótipos de (A) *Oecomys bicolor* $2n=80$ e $NFa=134$, Macho LBCE18487 de Porto Acre/AC), (B) *Oecomys* sp. $2n=90$ e $NFa=104$, Macho LBCE18519 de Xapuri/AC, (C) *Hylaeamys perenensis* $2n=52$ e $NFa=62$, Fêmea LBCE 18427 de Xapuri/AC, (D) *Neacomys spinosus* $2n=64$ e $NFa=68$, Macho LBCE 18840 de Porto Acre/AC, (E) *Proechimys* aff. *gardneri* $2n=38$ e $NFa=58$, Macho LBCE 19813 de Porto Acre/AC. Imagens: Bernardo Teixeira

5.3 Levantamento de espécies de mamíferos

Foram coletadas e referendadas com *voucher specimens* (material testemunho de peles e/ou esqueleto), 31 espécies de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais). Além destas espécies, doações de moradores do Seringal Cachoeira adicionaram duas espécies de roedores de médio porte (*Cuniculus paca* e *Dasyprocta fuliginosa*), bem como outra espécie de pequeno roedor (*Dactylomys boliviensis*), que usualmente não seriam capturados com o tipo de armadilhas utilizadas nesse estudo. Sete outras espécies de mamíferos de médio e grande porte, como tatus, porcos do mato, veados, felinos, macaco e tamanduá também integraram este levantamento de espécies de mamíferos do estado do Acre (Tabelas 1 e 2 e Figura 20).

5.3. 1 Roedores

Foram registradas 20 espécies de roedores (figura 25), sendo 17 por armadilhamento e três por doação de carcaças por moradores. Entretanto, para nove espécies entre as 17 que foram capturadas, menos de cinco espécimes foram registrados, sendo que a maioria destas espécies ocorreu em apenas uma ou duas localidades. Com exceção da Floresta do Seringal Cachoeira (FSC), que se apresentava com área contínua de florestas, todas as outras localidades localizavam-se em áreas com paisagem bastante alterada, apresentando-se como fragmentos isolados de diversos tamanhos ou áreas de matriz aberta. Estes resultados sugerem que os diferentes estados de conservação e uso destas áreas estão afetando drasticamente a riqueza de espécies nestas áreas, com provavelmente muitas extinções locais. Desta forma, a riqueza da fauna de roedores pode ser compreendida apenas com inventários realizados em nível regional.

Entre as 20 espécies de roedores registradas, foram observadas aumento da distribuição geográfica de algumas de espécies, novos cariótipos associados a espécies já descritas e a ocorrência de prováveis novas espécies, a saber:

O gênero *Proechimys*, representado por quatro espécies, teve o maior número de animais capturados e alcançou 39,9% das capturas (n=128), representando 23,9% do total de todas as espécies de mamíferos registrados.

As quatro espécies de *Proechimys* identificadas, foram: *P. aff. gardneri*, o mais abundante (n= 61), seguido de *P. simonsi* (n= 35), *P. brevicauda* (n= 30) e *P. cuvieri* (n=02).

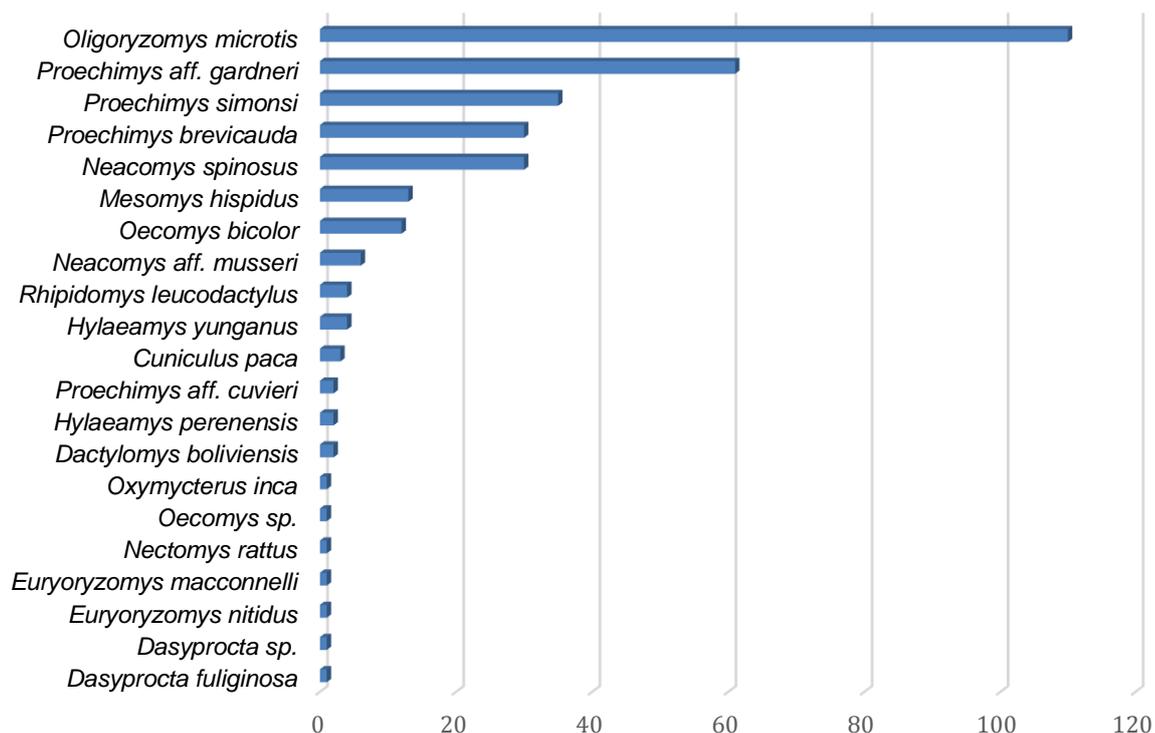


Figura 25. Distribuição do número de espécimes, por espécie, de roedores coletadas no estado do Acre, no período de 2013 a 2016.

Para três destas espécies foi possível associar as sequências obtidas dos espécimes do gênero *Proechimys* em clados bem apoiados, com as espécies *P. simonsi* (Figura 26), *P. brevicauda* (Figura 27) e *P. gardneri* (Figura 28). Estes resultados foram convergentes com os resultados obtidos pelas análises citogenéticas e morfológicas. Entretanto, as sequências que formaram um grupo monofilético bem apoiado, referidas aqui como *P. aff. gardneri*, irmão de *P. gardneri*, apresentaram cariótipo $2n = 36$, $NFa = 58$ (Figura 22F) e $2n = 38$, $NFa = 58$, enquanto os cariótipos já descritos para *P. gardneri* são $2n = 40$, $NFa = 56$ (Da Silva, 1998) e $2n = 40$, $NFa = 54$ (Eler *et al.*, 2012), sugerindo a ocorrência de rearranjos mais complexos que simples fusões ou fissões robertsonianas entre os vários cariótipos.

Adicionalmente, os níveis de divergência genética entre as sequências obtidas a partir dos espécimes analisados nesta tese, referidos aqui como *P. aff. gardneri*, e a sequência anteriormente conhecida para *P. gardneri* são significativos, corroborando que eles possam representar unidades taxonômicas distintas (Figura 30).

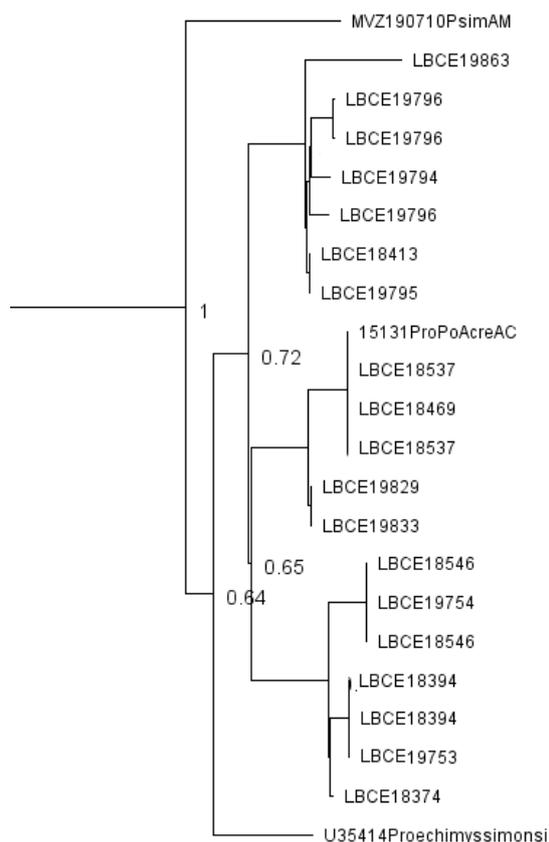


Figura 26. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta FastTree 2.1 implementada no programa Geneious 9 com o modelo evolutivo GTR+G) de sequências completas do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Proechimys simonsi*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

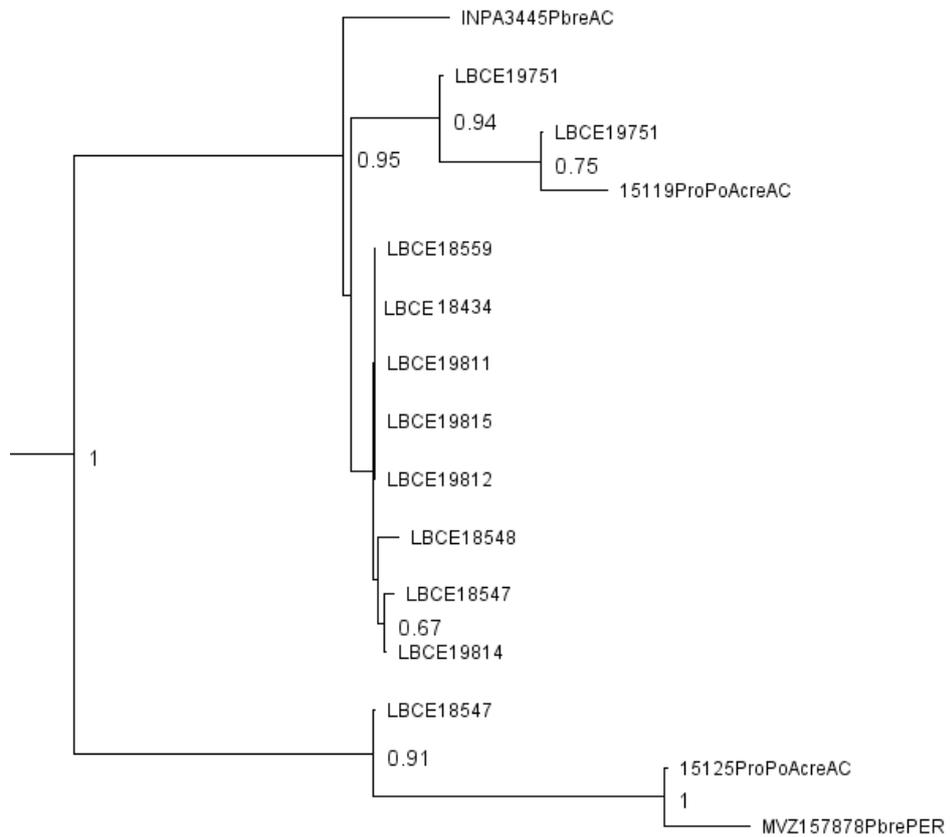


Figura 27. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta FastTree 2.1 implementada no programa Geneious 9 com o modelo evolutivo GTR+G) de sequências completas do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Proechimys brevicauda*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

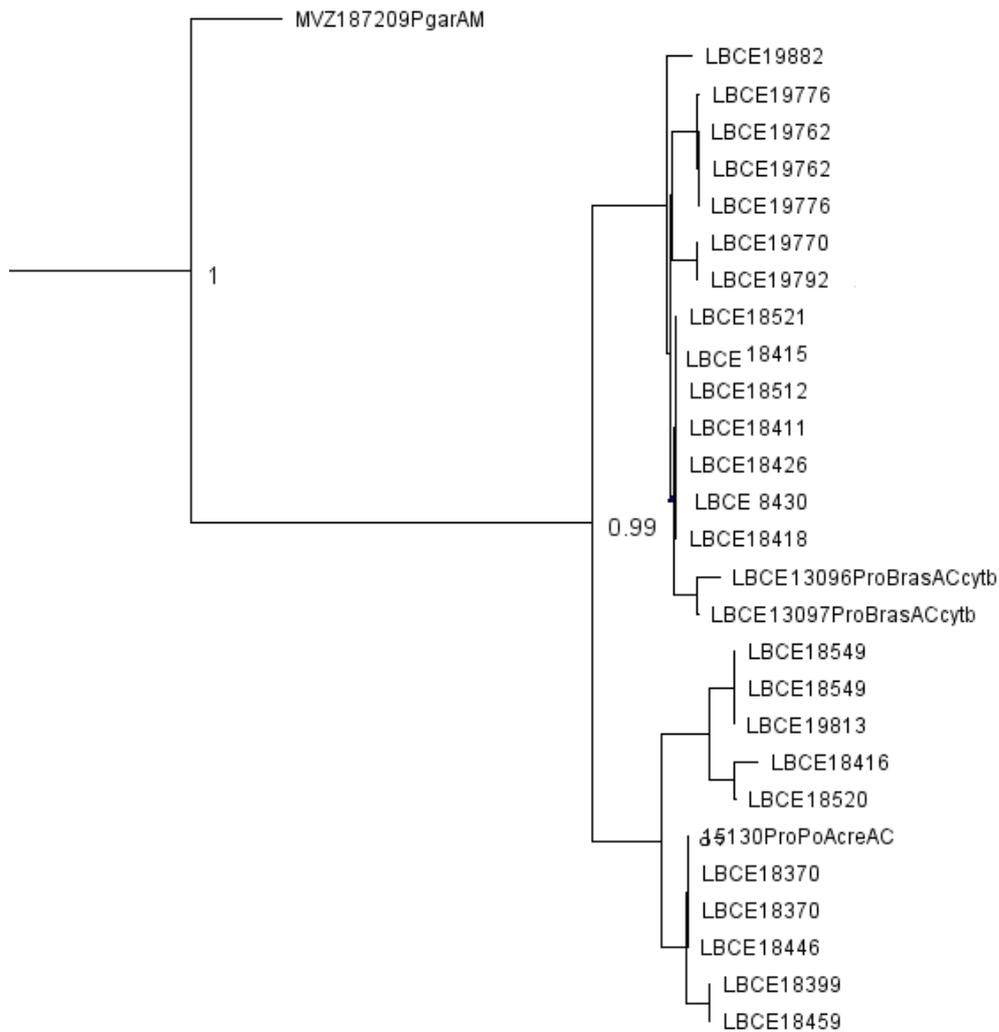


Figura 28. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta FastTree 2.1 implementada no programa Geneious 9 com o modelo evolutivo GTR+G) de sequências completas do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Proechimys gardneri*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste Shimodaira-Hasegawa com mil amostragens.

O segundo gênero mais abundante foi *Oligoryzomys* por conta da espécie *O. microtis* (Figura 25 e Tabela 2). Entretanto, apesar desta espécie ter ocorrido em quatro localidades (três municípios), totalizando 110 capturas, apenas cinco espécimes foram capturados em um dos fragmentos monitorados por esta tese (RFH), os outros 105 espécimes foram capturados e doados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) e pelo Serviço de Vigilância em Saúde (SVS/MS), que realizaram expedições em áreas abertas de matriz alteradas e/ou áreas agrícolas, principalmente plantação de cana de açúcar. Ressalta-se ainda, que o fragmento da RFH, foi o único inserido

numa matriz rural. Todos estes habitats de áreas não florestais são os mais apropriados para esta espécie.

Os espécimes do gênero *Neacomys* foram definidos por análise de cariótipo como *Neacomys spinosus* e *Neacomys aff. musseri*. Este último foi referido como *N. aff. musseri*, pois apresentam semelhança na morfologia craniana com *N. musseri*, entretanto apresentaram cariótipo $2n = 36$ e $NFa = 62$, enquanto o cariótipo descrito por Patton e colaboradores, para *N. musseri*, é $2n = 34$ e $NFa = 64-68$ (Tabela 2, Figuras 23C e 29). Tanto *N. aff. musseri*, como *N. spinosus* tiveram sua distribuição aumentada para o leste do estado do Acre (Figura 29).

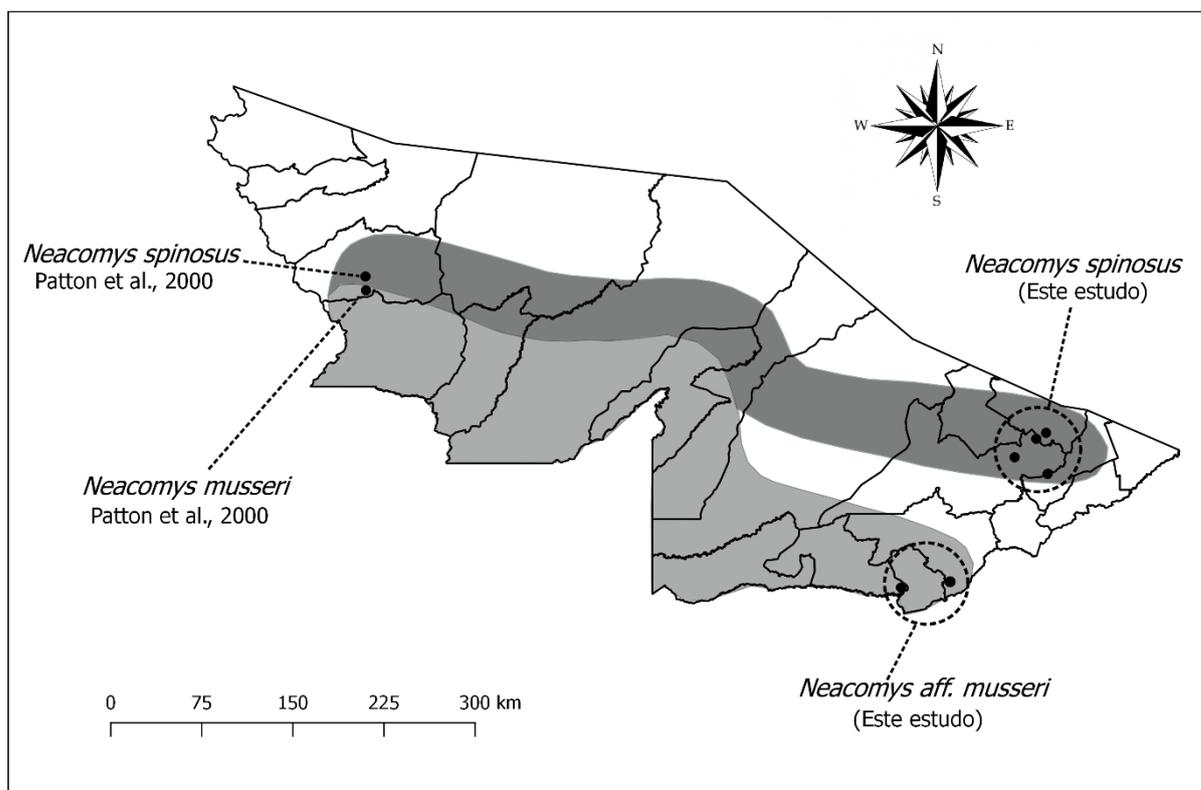


Figura 29 – Distribuição do Gênero *Neacomys* no estado do Acre e variação cariotípica da espécie capturada no leste do estado (*Neacomys aff. Musseri* ($2n = 36$ e $NFa = 62$) comparada a espécie *N. musseri* ($2n=34$ e $NFa=64-68$), encontrada por Patton *et al.*, 2000 no oeste do Acre. Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por: Charle F. Crisóstomo

Os espécimes do gênero *Oecomys* foram definidos por análise de cariótipo e análises moleculares como *Oecomys bicolor* e *Oecomys sp.* A espécie *O. bicolor* apresentou $2n=80$ e $NFa=134$ (Tabela 2, Figura 23A), cariótipo já descrito por Gardner e Patton (1976). O maior número diploide já encontrado para o gênero ($2n= 90$) foi

observado neste estudo para o macho LBCE 18519, *Oecomys* sp. coletado na FSC, no município de Xapuri (Tabela 1, Figura 23B). Apenas um indivíduo apresentou este número diploide, o que não permite confirmar se esta seria uma nova espécie, ou se a variação aparece apenas neste indivíduo. Entretanto as análises moleculares indicam que este indivíduo pode representar uma nova linhagem, já que se agrupa em um clado distinto dos demais representantes do grupo *bicolor* (Figura 30 e Figura 31).

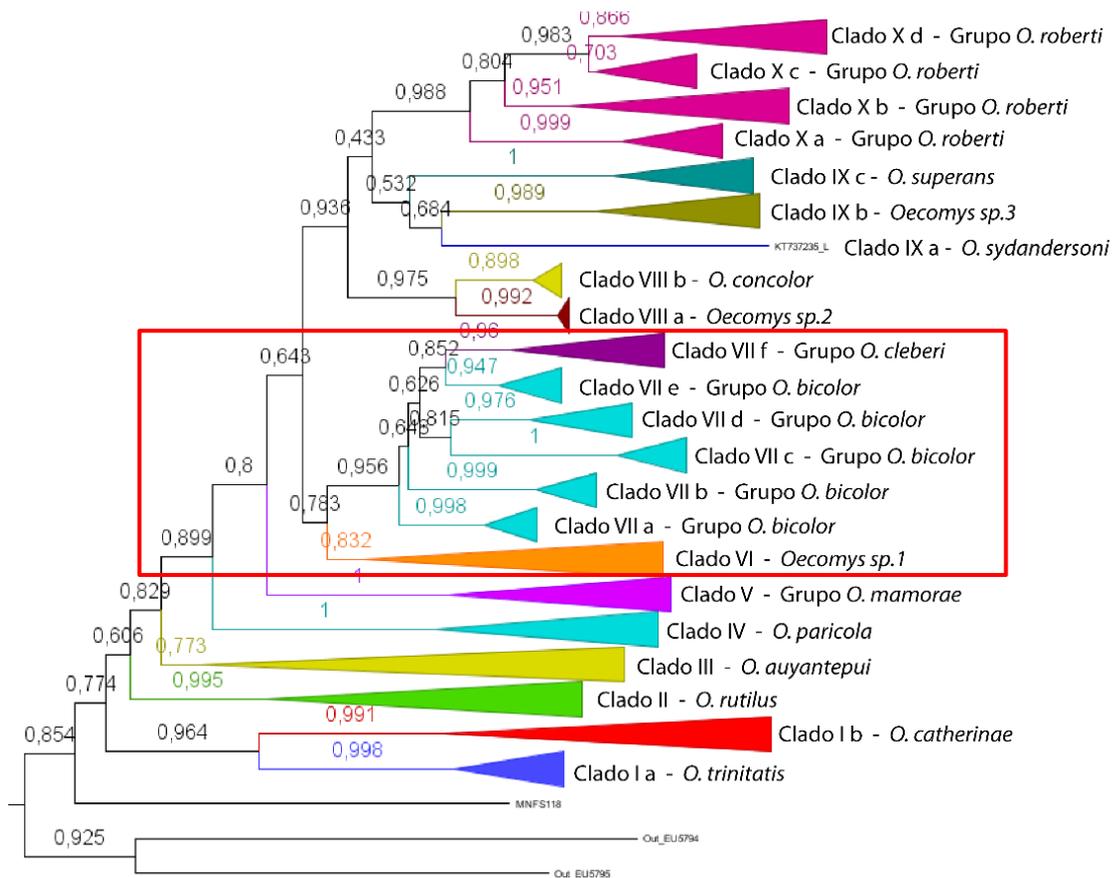


Figura 30. Topologia de Máxima Verossimilhança construída usando a ferramenta PHYML implementada no programa PHYML com o modelo evolutivo HKY+I+G de sequências parciais do gene mitocondrial da citocromo *b* do gênero *Oecomys*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste aLRT/SH-like (approximate likelihood ratio test). Em destaque em vermelho: Clado representando *Oecomys* sp., *Oecomys bicolor* e o grupo irmão *Oecomys cleberi*.

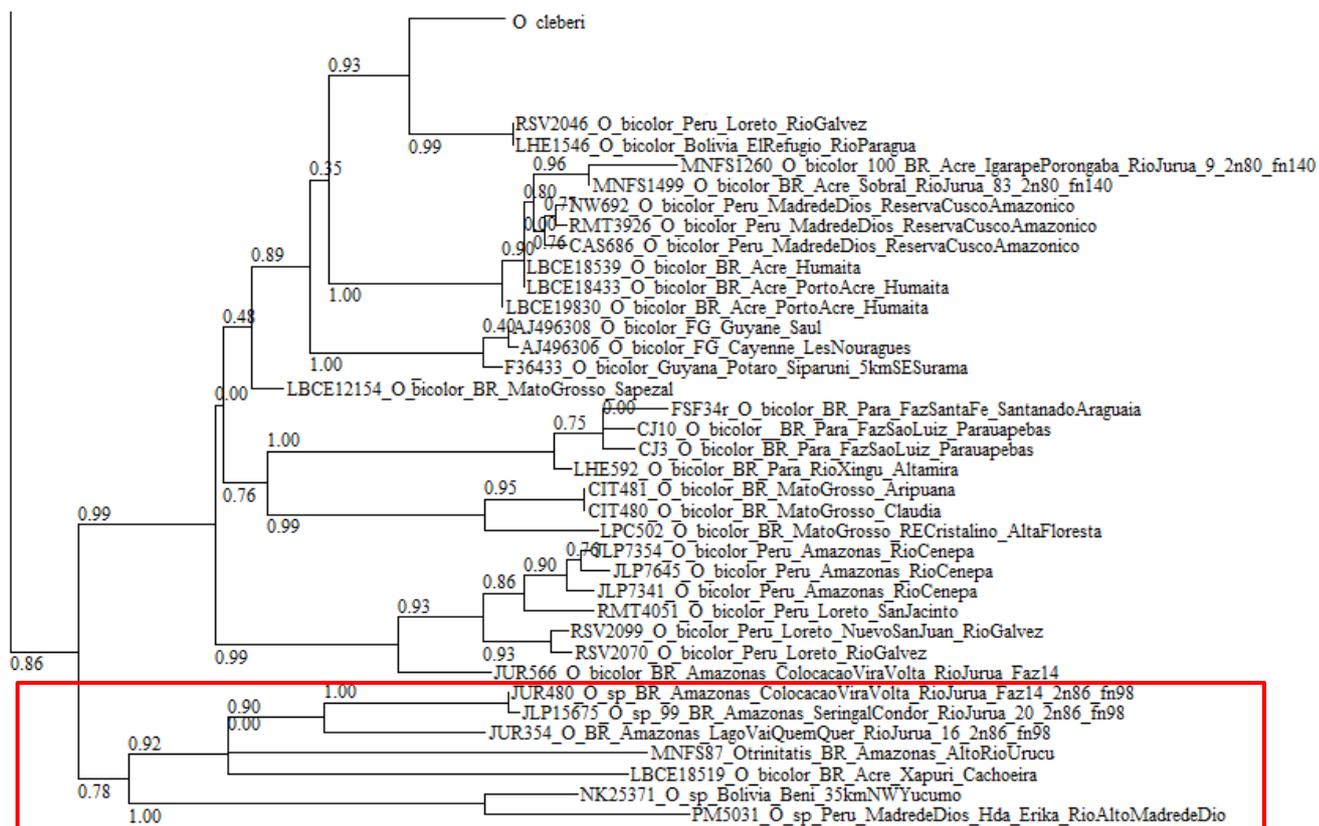


Figura 31. Topologia de Máxima Verossimilhança (construída usando a ferramenta PHYML implementada no programa PHYML com o modelo evolutivo HKY+I+G) de sequências parciais do gene mitocondrial da citocromo *b* de *Oecomys gr. bicolor* e *Oecomys sp.*. Números próximos aos nós indicam suportes dos ramos calculados sobre valores de suporte locais, usando o teste aLRT/SH-like (approximate likelihood ratio test). Em destaque em vermelho: Clado representando a provável nova espécie *Oecomys sp.*

Para as outras espécies de roedores identificadas e já conhecidas, as capturas apresentam-se como os primeiros registros oficiais destas espécies para a região da bacia do Rio Acre no estado do Acre.

5.3.2 Marsupiais

Entre os marsupiais, as espécies mais frequentes pertencem ao gênero *Marmosa (Micoureus)*, distribuídos entre as espécies *M. (Micoureus) demerarae* (n= 50) e *M. (Micoureus) regina* (n= 42), que juntas representam 45,5% das capturas para ordem dos marsupiais, e 17,2% do total de todas as espécies de animais capturados.

O segundo gênero com maior número de captura foi *Marmosops*, com 29 capturas para *M. ocellatus*, seguido da espécie *M. bishopi* (n= 5) e *M. impavidus* (n=1) (Figura 32)

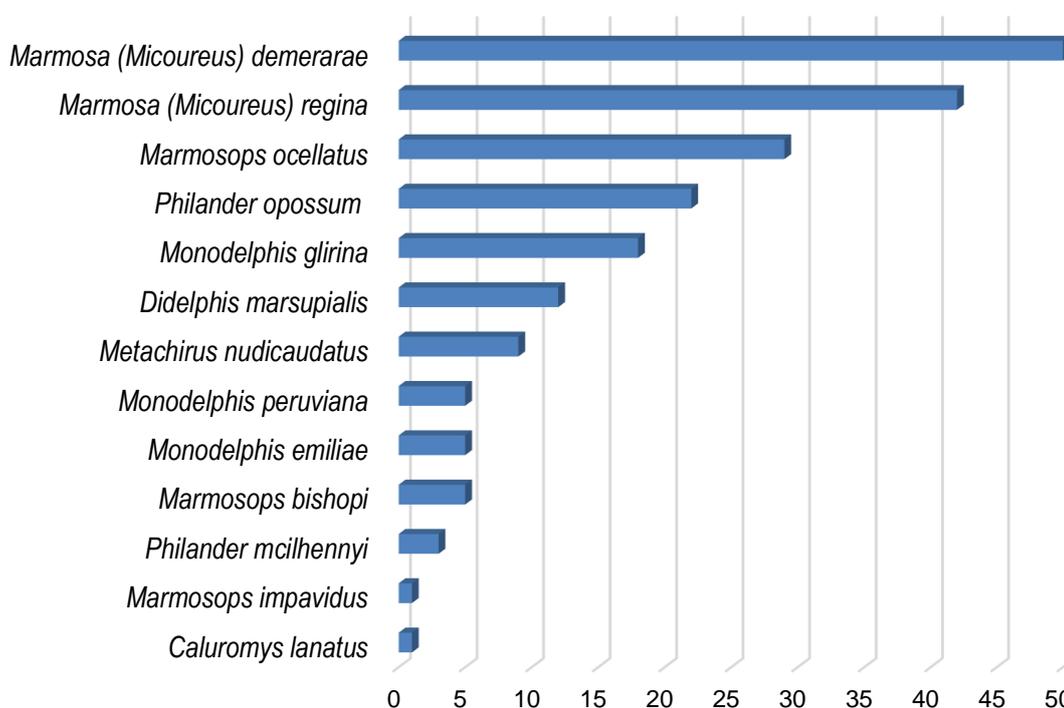


Figura 32. Distribuição do número de espécimes, por espécie, de marsupiais coletados no estado do Acre, no período de 2013 a 2016.

Para o gênero *Monodelphis*, registrou-se a ocorrência de três espécies (*M. glirina*, *M. emiliae* e *M. peruviana*) nas áreas estudadas (Tabela 1). Entre estas espécies aqui analisadas, as populações de *M. peruviana* apresentaram a menor diversidade intraespecífica (distância p de 0 a 6,3%), *M. glirina*, uma diversidade intermediária (0 -9,2%) e *M. emiliae* (0-11,7%) a maior diversidade (Tabela 3), e a topologia de máxima verossimilhança obtida (Figura 33) foi semelhante a publicações anteriores sobre este gênero (Pavan & Voss 2016).

Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva (%) sobre pares de sequências entre grupos (Gp). O número de diferenças de base por site da média de todos os pares de sequências entre grupos é mostrado.

	Gp_1	Gp_4	Gp_2	Gp_3	Gp_5	Gp_6	Gp_7	Gp_8
Gp_1 <i>M. adusta</i> n=2								
Gp_4 <i>M. peruviana</i> n=15	10,9							
Gp_2, <i>M. handleyi</i> n=3	12,7	9,1						
Gp_3, <i>M. kungsi</i> n=2	14,0	13,9	15,1					
Gp_5 <i>M. gardneri</i> n=2	15,4	15,9	15,5	17,0				
Gp_6 <i>M. glirina</i> n=27	16,8	17,1	18,3	18,3	17,5			
Gp_7 <i>M. emiliae</i> n=14	15,7	16,0	15,5	15,0	15,7	18,1		
Gp_8 <i>M. osgoodi</i> n=1	11,3	8,5	9,4	14,5	15,1	16,3	15,8	
Gp_9 <i>M. sanctaerosae</i> n=1	14,2	15,6	15,7	15,8	15,9	10,1	16,3	14,5

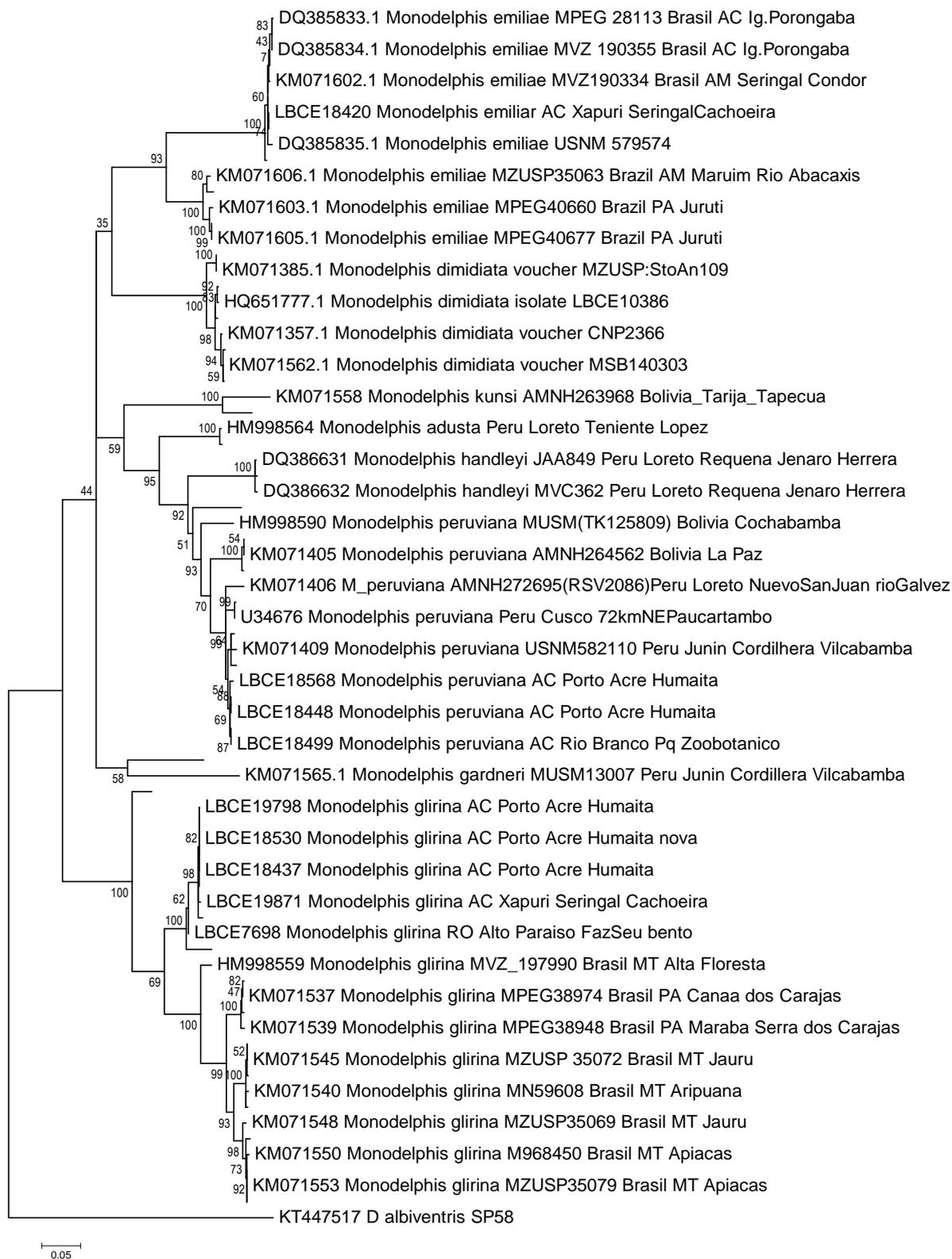


Figura 33. Topologia de máxima verossimilhança de *Monodelphis* com sequências do citocromo b, baseada no modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985), distribuição gama e sítios invariáveis.

Esta diversidade intraespecífica encontrada parece ser consequência da estruturação das populações estudadas, com *M. emiliae* mostrando a estruturação mais acentuada, seguindo por *M. glirina*, enquanto que *M. peruviana* não mostrou estruturação genética. *Monodelphis glirina* estruturou-se em um clado oeste, incluindo espécimes de estados brasileiros de Acre e Rondônia e um clado leste, incluindo estados de Mato Grosso e Pará, com 9.0-16.5% de distância *p*. O status taxonômico da população de *M. glirina* está sendo esclarecido (A. Bezerra, comunicação pessoal). *Monodelphis emiliae* também se estruturou num clado do oeste, incluindo espécimes do Peru, Bolívia e estados brasileiros do Acre e da Amazônia e um clado a leste, incluindo estados do Amazonas e do Pará, com 10,8-11,7% da distância *p*.

As estimativas de distância *p* interespecíficas de *Monodelphis* variam de 8,4 entre *M. osgoodi* e *M. peruviana* para 18,3% entre *M. glirina* e *M. kunsii* (Tabela 3). Por outro lado, observou-se que a menor distância *p* intraespecífica de *M. emiliae*, entre os cladogramas oeste e leste, foi maior do que estimativa de distância *p* interespecífica das espécies *M. osgoodi* e *M. peruviana*, *M. osgoodi* e *M. handleyi*, *M. handleyi* e *M. peruviana*, sugerindo que o status taxonômico dessas populações de *M. emiliae* precisa ser melhor investigado. É interessante que as espécies de *Monodelphis* que ocorrem na Amazônia do oeste do Brasil não tenham ocorrido na parte leste desta região (*M. peruviana*), ou quando ocorrem, são populações estruturadas em cladogramas da distribuição já conhecida (Patton *et al.* 2000) (*M. emiliae*), sugerindo a presença de uma possível barreira geográfica entre as regiões leste e oeste do estado do Acre.

A espécie *M. peruviana* distribuiu-se do centro do Peru até o norte e centro da Bolívia, a leste dos Andes (Solari 2004, Pine e Handley, 2008). Neste estudo, com base em cinco espécimes coletados em Porto Acre (RFH) e Rio Branco (FPZ), registra-se a ampliação da distribuição dessa espécie, para as terras baixas da Amazônia do oeste brasileiro, no estado do Acre (Figura 34). Esta espécie foi coletada em um fragmento muito conservado (RFH), mas também em um fragmento urbano muito alterado (PZ), com uso intenso e presença de gatos e cachorros domésticos. Esses dados sugerem que esta espécie pode estar adaptada a florestas com forte impacto antrópico. Os registros anteriores de *M. peruviana* apontavam a ocorrência dessa espécie em florestas bem drenadas, mas também em florestas secundárias, ocorrendo em altitudes de 1.400-2.200 m e em baixa elevação de 200 m (Solari, 2010). A espécie *M. emiliae* distribuiu-se na macrorregião Sudoeste-Sudeste da região Amazônica, da base dos Andes no Peru e Bolívia até o leste do Pará, no Brasil. As

populações estudadas nesta tese agruparam-se com outras populações já descritas (Patton *et al* 2000) no oeste do estado do Acre e ao norte nos estados do Pará e Amazonas (Figura 32). *M. emiliae* foi coletada apenas nas áreas mais preservadas, em Xapuri e Porto Acre, sugerindo maior restrição às áreas com impacto antrópico.

Também é interessante que, entre as oito localidades amostradas, Porto Acre é a única área com a presença das três espécies e, coincidentemente, é a área com menos uso humano.

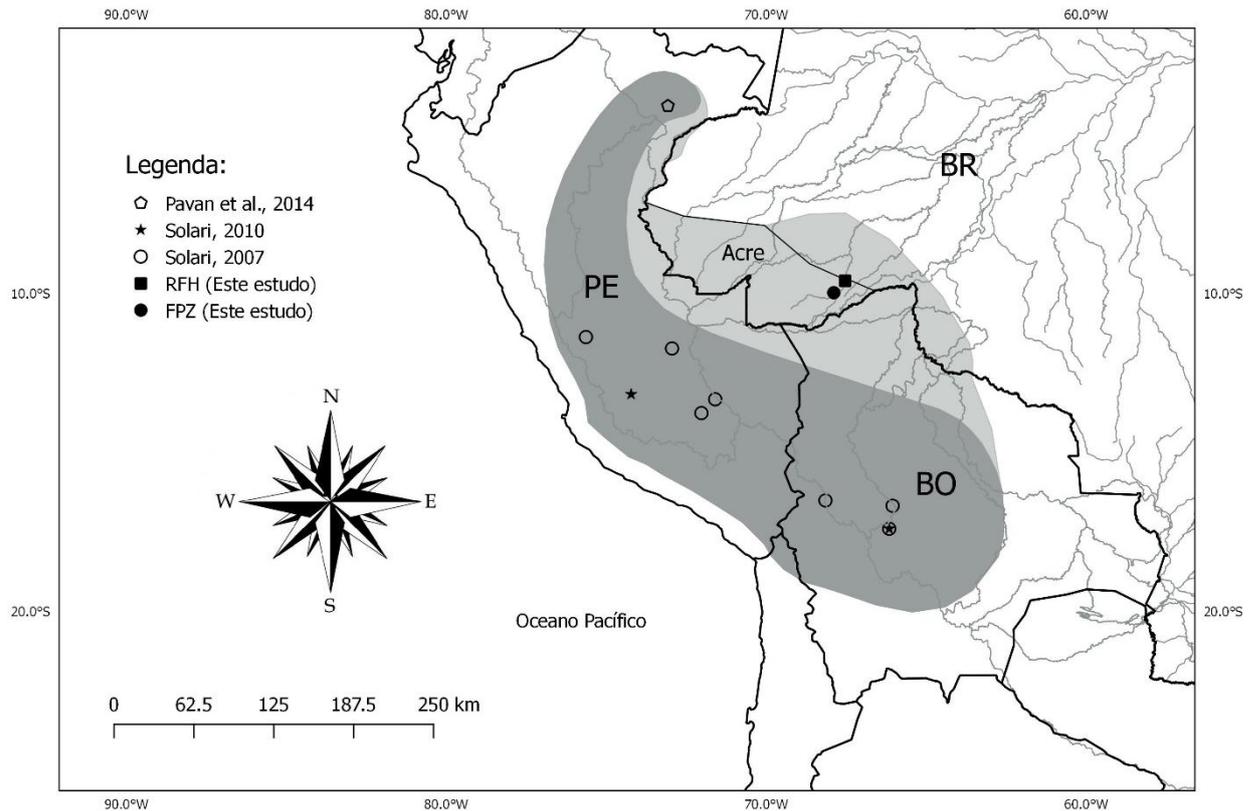


Figura 34. Registro e ampliação da distribuição de *M. peruviana*, para as terras baixas da Amazônia do oeste brasileiro, no estado do Acre. RFH – Reserva Florestal Humaitá, Porto Acre; FPZ – Floresta Parque Zoobotânico, Rio Branco; PE – Peru; BO – Bolívia; BR – Brasil. Base de dados ZEE/AC. Mapa elaborado por Charle F. Crisóstomo.

5.4 Diagnóstico de infecção por Hantavirus

Para este diagnóstico foram analisadas 88 amostras provenientes da Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ) no município de Rio Branco, Reserva Florestal Humaitá (RFH) no município de Porto Acre e, Floresta do Seringal Cachoeira no município de Xapuri. Dois roedores sigmodontíneos da RFH, *Hylaeamys yunganus* e *Neacomys spinosus*, apresentaram sororeatividade para hantavírus, com uma prevalência total de 2,3% (Tabela 4), entretanto estas infecções não foram confirmadas pelas análises moleculares (detecção do RNA viral por PCR).

Tabela 4. Lista das espécies analisados para infecção por Hantavirus, discriminando a localidade de captura no estado do Acre, quantidade de espécimes analisados e respectivas sororeatividade (ELISA).

Espécies analisadas para infecção por Hantavírus	Áreas do estudo (localidades)			Total	Resultado Teste ELISA
	FPZ	RFH	FSC		
RODENTIA					
Cricetidae/Sigmondontinae					
Euryoryzomys					
<i>Euryoryzomys macconnelli</i>			1	1	NEG
Hylaeamys					
<i>Hylaeamys perenensis</i>			1	1	NEG
<i>Hylaeamys yunganus</i>		2		2	1 POS
Neacomys					
<i>Neacomys spinosus</i>	1	8	1	10	1 POS (RFH)
Oecomys					
<i>Oecomys bicolor</i>		6		6	NEG
<i>Oecomys sp.n.</i>			1	1	NEG
Oligoryzomys					
<i>Oligoryzomys microtis</i>		2		2	NEG
Cricetidae/Sigmondontinae Total	1	18	4	23	2 POS
Echimyidae					
Mesomys					
<i>Mesomys hispidus</i>		4	1	5	NEG
Proechimys					
<i>Proechimys aff. gardneri</i>		5	23	28	NEG
<i>Proechimys brevicauda</i>		15	1	16	NEG
<i>Proechimys simonsi</i>		10	6	16	NEG
Echimyidae Total	0	34	31	65	NEG
Rodentia Total	1	52	35	88	2 POS

Nenhuma das duas espécies sororeativas apresentou confirmação de infecção por PCR. Isto pode estar relacionado à carga viral estar muito baixa ou o RNA viral não estar mais presente nas vísceras (estágio final da infecção) (Netski *et al.*, 1999) ou ainda pelo fato destes animais terem tido contato com um genótipo viral do qual não são reservatórios, eliminando o vírus.

Ambas espécies já foram reportadas associadas a hantavírus na região da Amazônia peruana (Razuri *et al.*, 2014). Neste trabalho *Hylaeamys yunganus* também foi encontrado apenas com sororeatividade para hantavírus, enquanto que *Neacomys spinosus* foi reportado como hospedeiro do Virus Andes, o que pode significar apenas um *spillover* de outro hospedeiro ou uma efetiva expansão da distribuição geográfica deste genótipo viral, já que *N. spinosus* ocorre desde parte da região amazônica do Brasil (Acre, sul do Amazonas, Rondônia e parte do Mato Grosso) até áreas baixas dos Andes, incluindo regiões da Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (Razuri *et al.*, 2014; Patton *et al.*, 2015). O termo *spillover* se refere à ocorrência de infecção por hantavírus em um hospedeiro não considerado reservatório primário.

Outras espécies de *Neacomys* já foram reportadas como hospedeiras de arenavirus, cuja transmissão é semelhante a de hantavírus. *Neacomys guianae* é associado ao arenavirus Amapari (Charrel and de Lamballerie 2010) e a partir de amostras obtidas nesta tese, foi possível identificar um novo genótipo, para arenavirus Xapuri, em *Neacomys* aff. *musseri* (Fernandes *et al.*, submetido).

No estado do Acre, Lavocat-Nunes *et al.* (2015) encontraram sororeatividade em *O. microtis* e no roedor equimídeo *Proechimys cuvieri*, no município de Capixaba. Evidência sorológica para infecção por hantavírus, em roedores equimídeos não é comum e, segundo estes autores, isto pode estar relacionado à forte pressão antrópica na área de estudo, favorecendo encontros entre espécies e, conseqüentemente, episódios de *spillover*. Ambas espécies foram também capturadas no presente estudo, entretanto as duas amostras de *O. microtis* analisadas foram não reativas. Além destes, no presente estudo, 65 exemplares de quatro espécies de equimídeos foram também analisados, entretanto nenhum apresentou sororeatividade.

5.5 Diagnóstico de infecção por *Bartonella*

Para este diagnóstico foram analisadas 196 amostras, sendo 85 de marsupiais e 111 de roedores, provenientes das três áreas de florestas comparadas no estudo (FPZ, RFH e FSC). Em um espécime de marsupial (*Marmosops ocellatus*) da RFH, em três roedores sigmodontíneos (*Hylaeamys yunganus*, *Hylaeamys macconnelli* e *Neacomys spinosus*), da FSC e em dois espécimes do roedor equimídeo (*Proechimys* aff. *gardneri*), também da FSC, foi possível amplificar o fragmento parcial do gene *gltA* de *Bartonella* spp. com uma prevalência total de 3,06% (Tabela 5). As análises do sequenciamento de DNA para *Bartonella* spp. sugerem que as seis amostras pertencem a dois clados distintos (Figura 35).

Tabela 5. Lista das espécies analisados para infecção por *Bartonella* spp., discriminando a localidade de captura no estado do Acre, quantidade de espécimes analisados e resultados das análises moleculares (PCR)

Espécies analisadas para infecção por <i>Bartonella</i> sp.	Áreas do estudo (Municípios)			Total	Resultado Positivos à PCR
	Rio Branco (FPZ)	Porto Acre (RFH)	Xapuri (FSC)		
DIDELPHIMORPHIA					
Didelphidae					
Caluromys					
<i>Caluromys lanatus</i>			1	1	
Didelphis					
<i>Didelphis marsupialis</i>			5	5	
Marmosa Micoureus					
<i>Marmosa Micoureus demerarae</i>	2	13	8	23	
<i>Marmosa Micoureus regina</i>	1	15	2	18	
Marmosops					
<i>Marmosops bishopi</i>		2	1	3	
<i>Marmosops ocellatus</i>	2	10	3	15	1 (RFH)
Monodelphis					
<i>Monodelphis emiliae</i>		1	3	4	
<i>Monodelphis glirina</i>		6	1	7	
<i>Monodelphis peruviana</i>	1			1	
Philander					
<i>Philander mcilhennyi</i>		2		2	
<i>Philander opossum</i>	5	1		6	

Didelphimorphia Total	11	50	24	85	1
RODENTIA					
Cricetidae/Sigmondontinae					
Euryoryzomys					
<i>Euryoryzomys macconnelli</i>			1	1	1 (FSC)
Hylaeamys					
<i>Hylaeamys perenensis</i>			1	1	
<i>Hylaeamys yunganus</i>		2	1	3	1 (FSC)
Neacomys					
<i>Neacomys aff. musseri</i>			3	3	
<i>Neacomys spinosus</i>	1	7	6	14	1 (FSC)
Oecomys					
<i>Oecomys bicolor</i>		7		7	
<i>Oecomys sp.n.</i>			1	1	
Oligoryzomys					
<i>Oligoryzomys microtis</i>		1		1	
Rhipidomys					
<i>Rhipidomys leucodactylus</i>		1		1	
Cricetidae/Sigmondontinae Total	1	18	13	32	3
Echimyidae					
Mesomys					
<i>Mesomys hispidus</i>		3	3	6	
Proechimys					
<i>Proechimys aff. gardneri</i>		4	30	34	2 (FSC)
<i>Proechimys brevicauda</i>		15	1	16	
<i>Proechimys simonsi</i>		10	13	23	
Echimyidae Total	0	32	47	79	2
Rodentia Total	1	50	60	111	5
Total Geral	12	100	84	196	6

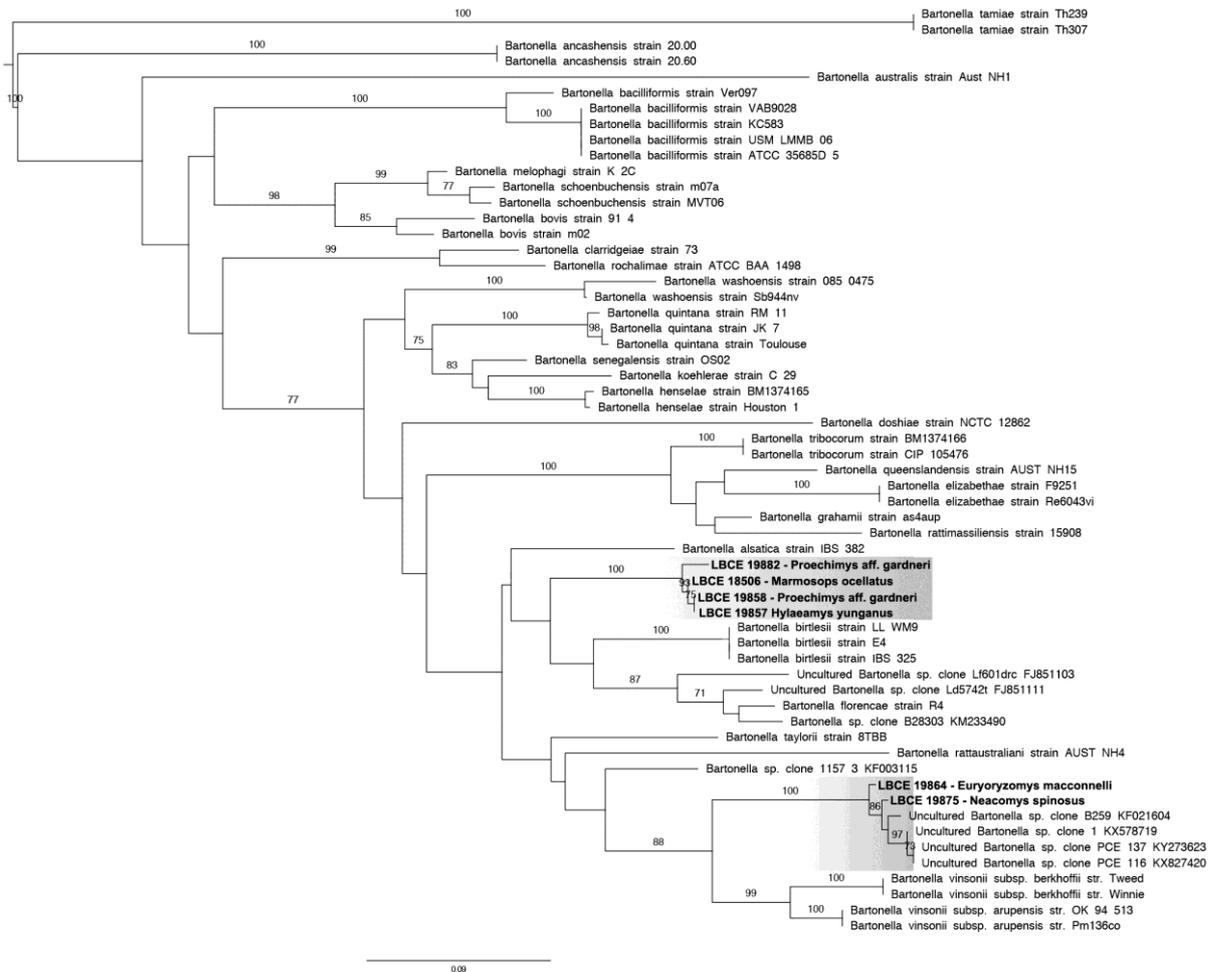


Figura 35. Topologia de Máxima Verossimilhança (implementado na ferramenta PhyML com o modelo evolutivo T92+G) da sequência parcial do gene *gltA* (731pb) de *Bartonella* spp. Números próximos aos nós indicam o valor do suporte por bootstrap (1.000 réplicas). Em negrito as sequências geradas no presente estudo.

Poucos estudos identificaram a infecção por *Bartonella* spp. em pequenos mamíferos silvestres no Brasil (Costa *et al.*, 2014; Favacho *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016; Rozental *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2018). Este é o primeiro registro de infecção por *Bartonella* spp. em marsupiais (Tabela 10; *Marmosops ocellatus* da RFH), bem como nos roedores *Euryoryzomys macconnelli*, *Neacomys spinosus* e *Proechimys aff. gardneri*, todos da FSC. A espécie *H. yunganus* já havia sido reportada infectada por *Bartonella* no Peru (Martin-Alonso *et al.*, 2014), bem como outra espécie do gênero *Hylaeamys* (*Hylaeamys megacephalus*) em uma área do Cerrado de Tocantins (Gonçalves *et al.*; 2016). No estudo de Gonçalves *et al.* (2016) foi realizada a caracterização genética de *Bartonella* spp. em roedores de diversos biomas brasileiros e foi observada uma baixa prevalência de infecção (3,2%) em

roedores da Amazônia, mais especificamente nas regiões do Pará e norte do Mato Grosso. Deste bioma, foram analisadas amostras de 31 espécimes, pertencentes a nove espécies e apenas um *Necromys lasiurus* apresentou infecção por *Bartonella* spp., entretanto esta amostra não foi sequenciada para definição de sua posição filogenética.

As topologias geradas demonstraram haver dois clados distintos de *Bartonella* nas amostras estudadas, sendo possível que sejam genótipos não descritos. Entretanto, para compreender a diversidade genética desses microorganismos faz-se necessário o sequenciamento de outras regiões gênicas, como os genes *rpoB*, *ftsZ* e outros. As análises do presente estudo com o gene *gltA* indicam que as bartonelas brasileiras agruparam-se com novos genótipos encontrados em mamíferos do Velho mundo e em ectoparasitas brasileiros.

O primeiro grupo de *Bartonella* encontrado incluiu hospedeiros de diferentes grupos de mamíferos, como o marsupial *Marmosops ocellatus*, o roedor sigmodontíneo *Hylaeamys yunganus* e o roedor equimídeo *Proechimys* aff. *gardneri*, demonstrando a diversidade na relação bactéria-hospedeiro. Este clado foi classificado mais próximo filogeneticamente das espécies *Bartonella alsatica* e *Bartonella birtlesii*. *Bartonella alsatica* foi descrita em coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus* e em pulgas associadas a coelhos (*Odontopsyllus quirosi*, *Spylopsyllus cuniculi* e *Xenopsylla cunicularis*) em diversas regiões da Europa ocidental (França, Espanha) e é causadora de endocardite e linfadenite em humanos (Heller *et al.*, 1999; Angelakis *et al.*, 2008; Jeanclaude *et al.*, 2009; Kernif *et al.*, 2010; Márquez *et al.*, 2015). *Bartonella birtlesii* foi descrita em roedores do gênero *Apodemus* e da espécie *Clethrionomys glareolus* (= *Myodes glareolus*) e insetívoros da espécie *Sorex vulgaris* em diversas regiões da Europa (Bermond *et al.*, 2000; Engbaek & Lawson, 2004; Knap *et al.*, 2007; Kraljik *et al.*, 2016). No Brasil um genótipo relacionado às espécies *B. alsatica* e *B. birtlesii* foi reportado em *Thrichomys fosteri* na região do Pantanal, no entanto, mesmo tendo dois genes analisados, as topologias apresentaram um baixo suporte entre as cepas analisadas (Sousa *et al.* 2018).

O segundo clado de *Bartonella* incluiu os hospedeiros sigmodontíneos *Euryoryzomys macconnelli* e *Neacomys spinosus*. Este clado foi classificado mais próximo filogeneticamente de clones de *Bartonella* não cultivadas, identificadas em roedores das espécies *Rattus rattus*, *Hylaeamys perenensis* e *Oecomys* spp. no Peru

(Martin-Alonso *et al.*, 2014) e pulgas da espécie *Polygenis (P.) bohlsi* e do roedor *Oecomys mamorae* no Pantanal Brasileiro (Sousa *et al.*, 2018).

5.6 Comparação da abundância, riqueza e equitabilidade dos pequenos mamíferos, sobre a influência do habitat, nas três áreas comparáveis (FPZ, RFH e FSC)

Para efeitos comparativos e com vistas à avaliação do impacto na comunidade de pequenos mamíferos a partir de diferentes usos e ocupação de fragmentos florestais, a seguir são apresentados os resultados relativos somente as áreas de estudo da Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ), Reserva Florestal Humaitá (RFH) e Floresta do Seringal Cachoeira (FSC).

No conjunto das três áreas comparadas, foram capturadas 27 espécies de pequenos mamíferos, sendo 13 de roedores e 13 de marsupiais (Tabela 6).

Dentre as espécies mais abundantes, destacam-se o roedor *Proechimys gardneri* (N = 35) e o marsupial *Marmosa micoureus demerarae* (N = 38) (Tabela 6). Por outro lado, algumas espécies apresentaram capturas ocasionais, tais como os roedores *Euryoryzomys macconnelli* e *Oecomys* sp.n. e os marsupiais *Caluromys lanatus*, *Philander mcilhennyi* e *Philander opossum canus*, cada um com apenas um indivíduo capturado (Tabela 6).

A época do ano em que os animais foram capturados (seca ou chuvosa) e o estrato florestal de sua ocorrência foram apresentadas na Tabela 6. A riqueza total foi consideravelmente maior em duas das três áreas estudadas, sendo 18 espécies capturadas em Xapuri, 17 na RFH e 8 na FPZ (Tabela 7). A abundância total foi maior na RFH com 134 espécimes coletados, seguida pela FSC com 95 espécimes e FPZ com 19 espécimes (Tabela 7). A equitabilidade total, no entanto, apresentou pouca variação entre as áreas, sendo menor para FSC (Tabela 7). Foram observados maiores valores de riqueza na estação chuvosa em cada área, exceto para o Parque Zoobotânico, e maior abundância na seca, exceto para Xapuri (Tabela 7). A equitabilidade não apresentou grandes variações entre as estações em nenhuma localidade (Tabela 7). Com relação aos estratos verticais da vegetação, a maior riqueza e abundância de pequenos mamíferos foram encontradas no solo em todas as áreas (Tabela 7). Com exceção de Humaitá, o solo também apresentou os menores valores de equitabilidade para a comunidade de mamíferos (Tabela 7).

Tabela 6. Espécies capturadas e número de indivíduos de pequenos mamíferos por estação do ano, estrato vertical da vegetação em três áreas florestais, no Estado do Acre, Brasil.

Espécies	Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ)						Reserva Florestal Humaitá (RFH)						Floresta do Seringal Cachoeira (FSC)						Total	
	Seca	Chuva	Solo	Sub-bosque	Dossel	Total	Seca	Chuva	Solo	Sub-bosque	Dossel	Total	Seca	Chuva	Solo	Sub-bosque	Dossel	Total		
Rodentia																				
<i>Euryoryzomys macconnelli</i>														1	1				1	1
<i>Hylaeamys perenensis</i>														2	2				2	2
<i>Hylaeamys yunganus</i>							1	1	2			2		1	1				1	3
<i>Mesomys hispidus</i>							2	2		2	2	4	2	1		1	2		3	7
<i>Neacomys musseri</i>													1	4	5				5	5
<i>Neacomys spinosus</i>	1		1			1	5	5	1			1	5	1	6				6	17
<i>Nectomys rattus</i>								1	1			1								1
<i>Oecomys bicolor</i>							4	5	1	4	4	9								9
<i>Oecomys sp.</i>													1			1			1	1
<i>Oligoryzomys microtis</i>								5	5			5								5
<i>Proechimys breviceauda</i>							9	5	14			14	1		1				1	15
<i>Proechimys gardneri</i>							3		3			3	16	16	29	2	1		32	35
<i>Proechimys simonsi</i>		1	1			1	8	1	9			9	6	6	12				12	22
Didelphimorphia																				
<i>Caluromys lanatus</i>														1			1		1	1
<i>Didelphis marsupialis</i>													2	2	3	1		1	4	4
<i>Marmosa Micoureus demerarae</i>	1	1		1	1	2	14	1	9	4	11	24	9	3	3	6	3		12	38
<i>Marmosa Micoureus regina</i>	1				1	1	12	9	4	3	14	21	1	1		1	1		2	24
<i>Marmosops bishopi</i>													1	1	2				2	2
<i>Marmosops ocellatus</i>	2	1	1	2		3	1	3	7	5	1	13		5	4	1			5	21
<i>Metachirus nudicaudatus</i>							1	1	2			2								2
<i>Monodelphis emiliae</i>													2	2	4				4	4
<i>Monodelphis glirina</i>							4	7	1	1		11		1	1				1	12
<i>Monodelphis peruviana</i>	2		2			2	1		1			1								3
<i>Philander mcilhennyi</i>									1	1		1								1
<i>Philander opossum</i>	6	2	7	1		8	3	1	4			4								12
<i>Philander opossum canus</i>		1	1			1														1

Tabela 7. Índices de Riqueza (S), abundância (A) e equitabilidade (E) de espécies de pequenos mamíferos por estação do ano e estrato da vegetação, em três áreas florestais: Floresta Parque Zoobotânico, Rio Branco (FPZ), Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, estado do Acre, Brasil.

Áreas	Variáveis\ Parâmetros	(S)	(A)	(E)
FPZ	Seca	6	13	0,851
	Chuva	5	6	0,969
	Solo	6	13	0,787
	Sub-Bosque	3	4	0,946
	Dossel	2	2	1
	Total	8	19	0,841
RFH	Seca	14	77	0,891
	Chuva	15	57	0,888
	Solo	16	83	0,892
	Sub-Bosque	6	19	0,943
	Dossel	5	32	0,789
	Total	17	134	0,873
FSC	Seca	12	47	0,803
	Chuva	16	48	0,824
	Solo	14	74	0,777
	Sub-Bosque	7	13	0,838
	Dossel	5	8	0,928
	Total	18	95	0,789
Total amostral		26	248	0,837

Em nenhuma das áreas estudadas a curva de rarefação se estabilizou (Figura 36), indicando que a riqueza de espécies das áreas é maior do que a obtida. Os índices de estimativa de riqueza de Jacknife 1 também corroboram este resultado, uma vez que apresentaram valores superiores aos valores de riqueza encontrados (Tabela 8). A análise de diversidade de mamíferos feita através de nMDS mostrou uma diferenciação clara entre as três localidades neste parâmetro (Figura 37).

Tabela 8. Valores da estimativa de riqueza de espécies de pequenos mamíferos por Jackknife de primeira ordem para as áreas da Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, e para o total, no Estado do Acre, Brasil.

Áreas	(s)	Jackknife 1	Desvio Padrão
FPZ	8,0	11,2	1,49
RFH	17,0	20,2	1,49
FSC	18,0	22,8	1,95
Total	26,0	31,6	2,28

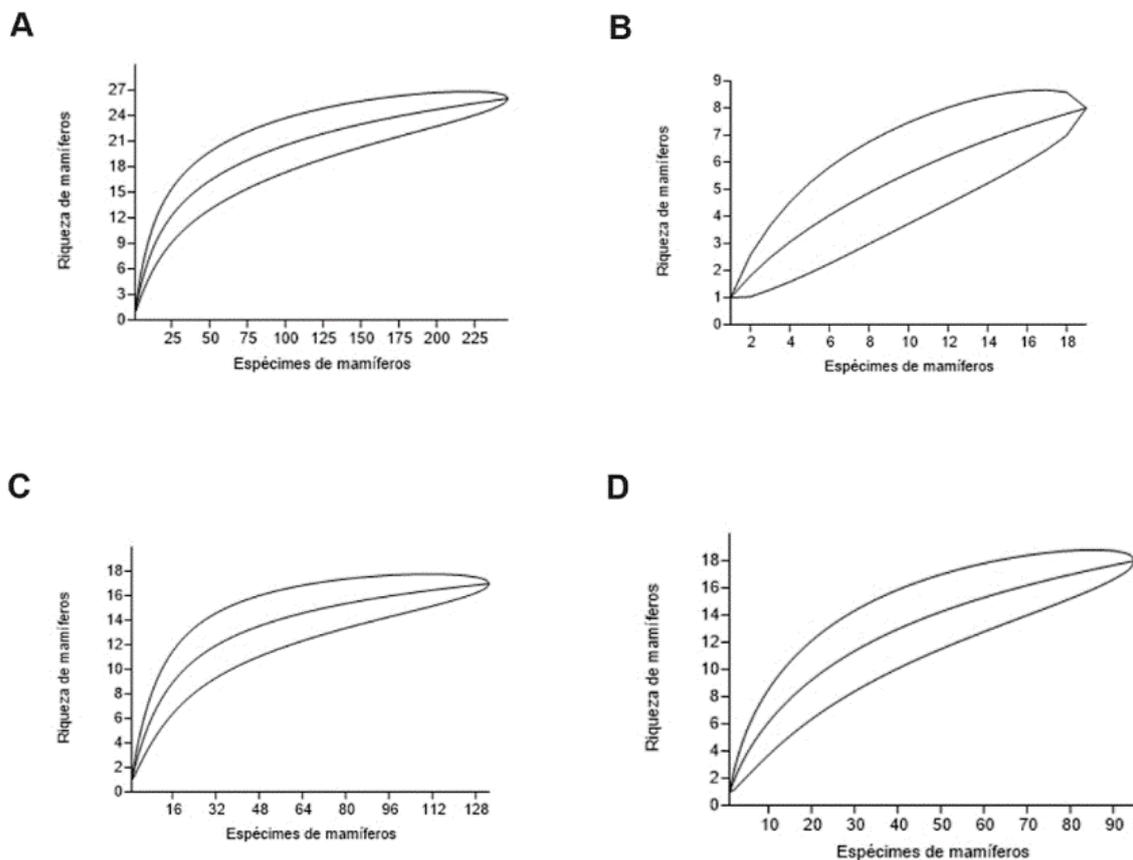


Figura 36. Curvas de acúmulo de espécies por rarefação individual considerando: A = As 3 áreas: Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri; B = FPZ; C = RFH e D = FSC.

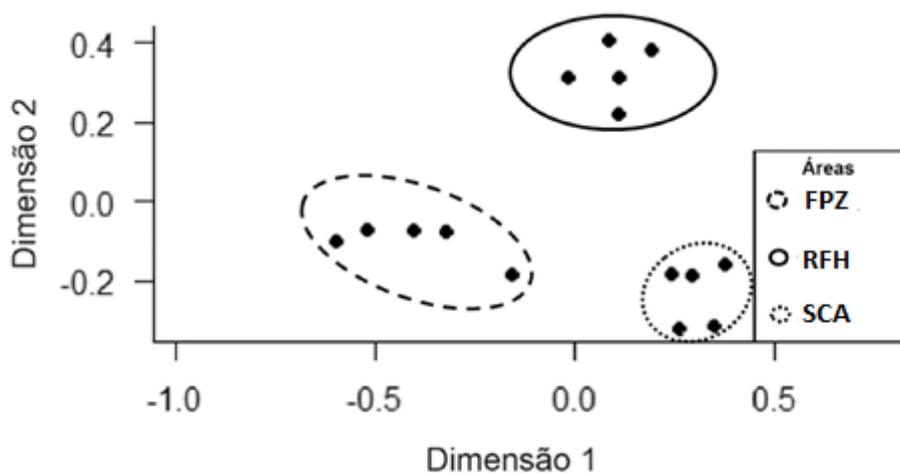


Figura 37. Análise da diversidade de espécies de pequenos mamíferos através de Escalonamento Multidimensional não Métrico (nMDS) para os transectos de cada área estudada: Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, no estado do Acre, Brasil.

A análise da abundância total de mamíferos com as variáveis do habitat indicou uma relação apenas com a variável atividade de ensino e pesquisa, estando uma maior abundância relacionada com uma menor atividade (Tabela 9), sendo este o único modelo plausível na análise de GLM. Em relação à riqueza de espécies, também foi observada uma maior riqueza em áreas com menos atividade de ensino e pesquisa, e também com menos atividade extrativista e menor número de árvores com diâmetro na altura do peito ≥ 40 cm (ARV2) (Tabela 9).

Tanto a heterogeneidade quanto a complexidade do habitat apresentaram pouca variação entre os transectos, porém, de um modo geral, com valores maiores em Xapuri (Tabela 10). A heterogeneidade do habitat não apresentou correlação nem com a riqueza de espécies de mamíferos ($r = 0,11$; $p = 0,697$) nem com a abundância de mamíferos considerando-se todas as espécies ($r = 0,07$; $p = 0,791$).

A complexidade do habitat apresentou correlação positiva significativa tanto com a riqueza ($r = 0,74$, $p = 0,0015$) quanto com a abundância de mamíferos ($r = 0,54$, $p = 0,0358$).

Tabela 9. Modelos Lineares Generalizados para investigação dos efeitos do habitat na abundância e riqueza de pequenos mamíferos em três localidades do Estado Acre, Brasil. AICC – Critério de Informação de Akaike corrigido, $\Delta AICc$ – diferença entre o AICc do modelo em questão para o melhor modelo, AICcWt – peso do AICc, K – parâmetros. Foram considerados modelos plausíveis os que apresentaram $\Delta AICc < 2$.

Parâmetros	Modelos	AICc	$\Delta AICc$	AICcWt	K
Abundância	(-) Ensino e Pesquisa	99,7	0	0,704	3
	Nulo	104,3	4,53	0,073	2
Riqueza	(-) Ensino e Pesquisa (-) Extrativista	65,6	0	0,479	4
	(-) ARV2, (-) Ensino e Pesquisa (-) Extrativista	67,4	1,85	0,19	5
	Nulo	76,7	11,12	0,002	2

Tabela 10. Índices de heterogeneidade e complexidade do habitat calculados para cada transecto de cada área estudada: Floresta Parque Zoobotânico (FPZ), Rio Branco; Reserva Florestal Humaita (RFH), Porto Acre e Floresta Seringal Cachoeira (FSC), Xapuri, no Estado do Acre, Brasil.

Áreas	Transectos	Heterogeneidade	Complexidade
FPZ	A	-0,108671273	-0,016718936
	B	0,0744742	-0,287346418
	C	-0,385071492	-0,32176877
	D	0,11813029	-0,626800438
	E	-0,208082313	-0,208199303
RFH	A	-0,004313405	-0,00741297
	B	-0,239002254	0,064573616
	C	-0,252953105	0,065227727
	D	-0,450748622	0,370105345
	E	-0,003328583	0,031387971
FSC	A	0,268085607	0,117417416
	B	0,194961971	0,353924963
	C	0,41004016	0,042054301
	D	0,255769255	0,226460712
	E	0,330709565	0,197094784

A riqueza total registrada nas 03 áreas estudadas (26) pode ser considerada elevada quando comparada a outros estudos conduzidos com pequenos mamíferos não voadores na Amazônia, com registro de 16 espécies na Amazônia central (Malcolm, 1991), 15 espécies em matrizes ao redor de fragmentos (Gascon *et al.*,

1999), 14 espécies em remanescentes florestais (Lima & Gascon, 1999), 19 espécies em áreas de transição entre o Cerrado e Amazônia (Lacher Jr. & Alho, 2001), 25 espécies na Bacia do Rio Xingu (Lambert *et al.*, 2005a), 5 espécies de roedores no Acre (Nunes-Lavocat *et al.*, 2015) e 25 espécies neste mesmo estado (Abreu-Júnior *et al.*, 2016). Patton e colaboradores (2000) registraram pelo menos 81 espécies de pequenos mamíferos ao longo do Rio Juruá, em ambas as margens, nos estados do Amazonas e no Acre, o que pode ser atribuído, em parte, a um maior esforço amostral, incluindo o uso de mais armadilhas em estratos superiores do que no presente estudo. De fato, os valores de riqueza estimada (31 para o total) e as curvas de rarefação no presente estudo apontam que possivelmente existem outras espécies de pequenos mamíferos que não foram registradas, havendo necessidade de um maior esforço amostral e continuidade do estudo.

Apesar de ter sido encontrada no presente estudo uma riqueza similar entre as espécies de roedores e marsupiais, outros estudos na Amazônia registraram maior riqueza de roedores em relação aos marsupiais capturados (Ochoa, 2000; Lambert *et al.*, 2005a; Abreu-Júnior *et al.*, 2016). Corroborando com os resultados encontrados por Brito e Crisóstomo (2015), o uso de armadilhas em diferentes estratos no presente estudo, bem como *pitfalls*, pode ter contribuído para uma amostragem mais homogênea de roedores e marsupiais ao longo das áreas estudadas.

A Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ), considerado ambiente mais antropizado, apresentou o menor número de espécies capturadas, bem como baixa abundância total. De acordo com Laurance e colaboradores (2000), estudos sobre a fragmentação na Amazônia revelaram um declínio na ocorrência e abundância de mamíferos de médio e grande porte em paisagens fragmentadas. Contrário ao presente estudo, Malcolm (1997) observou maior riqueza e diversidade de pequenos mamíferos terrestres em áreas mais perturbadas ao norte de Manaus, sugerindo que isto poderia ser resultado de mudanças no habitat provocadas pelo efeito de borda somado a migração de indivíduos de populações abundantes em habitats ao redor dos fragmentos. O fato da Floresta do Seringal Cachoeira (FSC) e Reserva Florestal do Humaitá (RFH) terem apresentado consideravelmente maiores valores de riqueza de espécies, quando comparadas com a Floresta do Parque Zoobotânico (FPZ), pode estar relacionado ao tipo de uso da terra nestas áreas e sua capacidade para suportar diferentes espécies, dado que ambientes mais perturbados podem apresentar menor riqueza de espécies (Gascon *et al.*, 1999).

A maior abundância de pequenos mamíferos na RFH pode ter sido devido às capturas mais frequentes de algumas espécies como os marsupiais *M. micoureus demerare*, *M. micoureus regina*, *M. ocellatus*, *M. glirina* e os roedores *N. spinosus* e *P. brevicauda*, enquanto outras (a exemplo do marsupial *M. nudicaudatus* e os roedores *N. rattus*, *O. bicolor* e *O. microtis*) foram capturadas exclusivamente nesta área. As maiores riquezas e abundância de mamíferos encontradas no solo em relação aos demais estratos está de acordo com outros estudos envolvendo pequenos mamíferos na Amazônia (Patton *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2005a).

A sazonalidade não apresentou grande influência na riqueza de espécies em nenhuma das áreas estudadas. Porém, em relação à abundância de mamíferos, os resultados mostraram uma maior abundância na estação seca tanto na FPZ quanto na RFH. Considerando-se a marcada sazonalidade na Amazônia, é possível que a estação seca represente um período mais favorável aos aumentos populacionais das espécies, estando o ambiente com menos áreas alagadas e maior disponibilidade de habitat. Patton e colaboradores (2000) também registraram maior sucesso de captura na estação seca e argumentam que este resultado refletiria mudanças na densidade populacional das espécies capturadas.

A equitabilidade é uma medida de diversidade que leva em consideração a abundância relativa das espécies, variando de 0 (quando há elevada dominância de algumas espécies) a 1 (quando a abundância das espécies é mais similar ao longo de um determinado ambiente) (Stirling & Wilsey, 2001). Os valores relativamente altos de equitabilidade encontrados para todas as áreas indicam uma distribuição das abundâncias das espécies nas comunidades de mamíferos, exceto por algumas poucas espécies mais predominantes, como, por exemplo, *P. opossum* na FPZ, *M. micoureus demerarae*, *M. regina* e *P. brevicauda* na RFH e *M. demerarae*, *P. gardneri* e *P. simonsi* na FSC. De fato, espécies do gênero *Marmosa* e do gênero *Proechimys* têm sido registradas com elevada abundância por outros estudos conduzidos na Amazônia (Lambert *et al.*, 2005a; Lambert *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2015; Abreu-Junior *et al.*, 2016).

O valor ligeiramente menor de equitabilidade total para Xapuri pode estar relacionado ao maior número de indivíduos capturados para o roedor *P. gardneri* (N = 32), em comparação a outras espécies com capturas menos frequentes, tais como *C.*

lanatus, *H. macconnelli*, *H. yunganus*, *M. glirina*, *Oecomys sp. n.* e *P. brevicauda*, cada uma com registro de um indivíduo apenas. Considerando-se as três localidades estudadas, a menor equitabilidade para o dossel encontrada na RFH pode estar relacionada à maior captura de *M. micoureus regina* (N = 14) e *M. micoureus demerarae* (N = 11) em estratos superiores, apesar do fato da maioria das capturas de pequenos mamíferos terem ocorrido no solo.

O número de indivíduos capturados variou consideravelmente entre as áreas para algumas espécies (*M. micoureus demerarae*, *M. micoureus regina*, *M. ocellatus* e *P. gardneri*, por exemplo), gerando uma diversidade regional distinta. O resultado da análise de nMDS indicou haver uma maior variação na composição e abundância das espécies entre localidades do que dentro de cada uma delas, mostrando uma relação inversa entre distância geográfica e similaridade na diversidade de espécies, estando de acordo com o esperado.

Poucos estudos investigaram a influência do ambiente na ocorrência de espécies de mamíferos na Amazônia (Emmons & Feer, 1997; Eisenberg & Redford, 1999; Lambert *et al.*, 2006). No presente estudo, observou-se maior abundância e riqueza de pequenos mamíferos em áreas caracterizadas por menor atividade antrópica, seja para fins de estudo (ENS/PESQ) ou exploração econômica (EXTRAT). Na FPZ, foram observados os menores valores de abundância e riqueza de espécies; a localidade também apresenta maior atividade de ensino e pesquisa dentre as três estudadas, além de fazer limite com áreas residenciais e malha rodoviária. Este tipo de pressão antrópica pode estar levando a alterações na biodiversidade encontrada nesta localidade.

Impactos provocados pela exploração econômica na Amazônia têm sido previamente discutidos por outros estudos (Lovejoy *et al.*, 1986; Laurance *et al.*, 2000). Desde a década de 60, no leste e sul da bacia amazônica onde se localizam os estados do Acre, Pará, Rondônia, Maranhão e Mato Grosso, há registro de extensa transformação de habitats naturais em paisagens fragmentadas (Laurance *et al.*, 2000). Atividades econômicas como as extrativistas podem gerar áreas de clareira, erosão do solo e mudanças microclimáticas (Laurance, 1998; Laurance *et al.*, 2000), alterando a diversidade e composição de espécies em áreas perturbadas (Laurance & Bierregaard, 1997). Apesar disso, alguns estudos anteriores indicaram maior

riqueza e abundância de pequenos mamíferos em áreas da Amazônia com extrativismo vegetal (Ochoa, 2000; Lambert *et al.*, 2005a).

A associação negativa da riqueza de espécies com a presença de árvores de grande porte (ARV2) pode ter ocorrido pela existência de uma maior densidade da cobertura de dossel devido a maior presença dessas árvores (Vidal *et al.*, 2007), o que pode levar a uma menor densidade de vegetação em estratos inferiores a este (Cirelli & Penteado-Dias, 2003). Além disso, a presença destas árvores pode estar relacionada com atividades extrativistas de látex e castanhas, uma vez que as seringueiras e castanheiras estão incluídas nesta variável de habitat, corroborando o resultado anterior.

A associação positiva da complexidade do habitat com a abundância e riqueza totais no presente estudo indica uma relação das espécies estudadas com ambientes caracterizados por uma maior estratificação vertical da vegetação. A complexidade do habitat representa uma variação na estrutura da floresta ao longo de seu gradiente vertical (August, 1983) o que, por sua vez, pode contribuir para uma grande diversidade de nichos potenciais para as espécies nestes ambientes mais complexos. Outros estudos desenvolvidos com mamíferos na Amazônia mostraram maior diversidade de espécies diante de uma maior estratificação vertical do habitat (Bernard, 2001; Lambert *et al.*, 2005b; Lambert *et al.*, 2006).

6. CONCLUSÃO

Os índices observados de diversidade da fauna de pequenos mamíferos no leste do Acre corroboram com outros estudos que apontam a região como sendo de alto valor biológico e prioritária para a conservação.

O pouco conhecimento e a complexidade taxonômica de muitas espécies de pequenos mamíferos com ocorrência na Amazônia Ocidental demandam a utilização de técnicas moleculares de sequenciamento de DNA e citogenéticas, associadas à análise morfológica, como uma combinação eficiente para identificação em nível específico.

Os níveis de divergência genética entre as sequências obtidas para os espécimes identificados como *P. aff. gardneri* e a sequência anteriormente conhecida para *P. gardneri* são significativos e sugerem representar unidades taxonômicas distintas.

As espécies de roedores sigmodontíneos *Hylaeamys yunganus* e *Neacomys spinosus*, sororeativas para infecção por hantavírus, podem estar associadas ao ciclo silvestre de transmissão de hantavírus na região, demandando novos estudos sobre o papel destas espécies como reservatórios de hantavírus, visto que também foram encontradas com sororeatividade (*H. yunganus*) e infecção pelo vírus Andes (*N. spinosus*) na região da Amazônia Peruana.

Este estudo apresentou o primeiro registro de infecção por *Bartonella* spp. em marsupiais, especificamente na espécie *Marmosops ocellatus*, além do primeiro registro de infecção nos roedores *Euryoryzomys macconnelli*, *Neacomys spinosus* e *Proechimys aff. gardneri*.

As estações de chuva e seca influenciam positivamente na riqueza de espécies e a abundância, respectivamente.

As atividades antrópicas de uso e ocupação das florestas e a proximidade urbana parecem influenciar negativamente na composição, riqueza e abundância das espécies de pequenos mamíferos nas localidades estudadas.

A complexidade vertical da vegetação, que é uma das características principais da Floresta Amazônica, está associada positivamente a uma maior diversidade de espécies de pequenos mamíferos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-JÚNIOR, E. F.; DE FREITAS, M. A.; LAPENTA, M. J.; VENÂNCIO, N. M.; DE FRANÇA, D. P. F.; PERCEQUILLO, A. R. Marsupials and rodents (Didelphimorphia and Rodentia) of upper Rio Acre, with new data on *Oxymycterus inca* Thomas, 1900 from Brazil. Check List vol,12. 2016

ACRE, Governo do Estado. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre, Fase II: Documento síntese – Escala 1:250.000. Secretaria Estadual de Meio Ambiente, Rio Branco AC. Brasil, 334p, 2006

ACRE, Governo do Estado. Programa Estadual de Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre: aspectos socioeconômicos e ocupação territorial – documento Final. Vol. 2 SECTMA, Rio Branco, Brasil, 326p, 2000

AGUIRRE, A.A.; TABOR, G.M. Global Factors Driving Emerging Infectious Diseases - Impact on Wildlife Populations, Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences, New York, n.1149, p. 1-3, 2008

ALHO, C.J.R. Caracterização da fauna da bacia do Rio Branco/ Acre. SEMA/AC. Relatório Técnico. Doc. Não publicado. 1990.

ANGELAKIS, E.; LEPIDI, H.; CANEL, A.; RISPAL, P.; PERRAUDEAU, F.; BARRE, I. et al. Human case of *Bartonella alsatica* lymphadenitis. Emerg Infect Dis. Vol.14 n.12 p,1951-3, 2008

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Systematic Biology, v.55 n.4, p.539-552, 2006

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. Intern J Antimicrob Agents v.44, p.16-25, 2014

AUGUST, P. V. V. The role of habitat complexity and heterogeneity in structuring tropical mammal communities. Ecology 64, p.1495–1507, 1983

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, vol16, n.1, p. 37-48, 1999

BARBOSA, A. Mâncio Lima registra cerca de 600 casos de malária em menos de um mês e decreta situação de emergência [Internet]. *Cruzeiro do Sul: G1AC*; [atualizada em jan-2018; acesso em: jan-2018]. Disponível em: <https://g1.globo.com/ac/cruzeiro-do-sul-regiao/noticia/mancio-lima-registra-cerca-de-600-casos-de-malaria-em-menos-de-um-mes-e-decreta-situacao-de-emergencia.ghtml>

BARROSO, J.G; SALIMON, C.I; SILVEIRA, M; MORATO, E.F.. Influência de fatores ambientais sobre a ocorrência e distribuição espacial de cinco espécies madeireiras exploradas no Estado do Acre, Brasil. *Scientia Forestalis* Vol. 39(92): p.489-499, 2011

BERMOND, D; HELLER, R; BARRAT, F; DELACOUR, G; DEHIO, C; ALLIOT, A; MONTEIL H, CHOMEL, B; BOULOUIS, H.J; PIÉMONT, Y. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol*. Vol.6 p.1973-9, 2000

BERNARD, E. Vertical stratification of bat communities in primary forests of Central Amazon, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, Cambridge, p. 115-126, 2001

BERNARDE, P. S.; MACHADO, R. A. *Mammalia, Didelphimorphia, Didelphidae, Glironia venusta* Thomas, 1912: Distribution extension to the state of Acre, Brazil. *Check List* vol. 4 n.2, 151p, 2008

BOCCARD, D.; GILLET, B.; LEGENDRE, P. *Numerical Ecology with R*. Springer Verlag, New York, p.1-319, 2011

BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, P.S. *Guia dos roedores do Brasil: com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos*. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, Rio de Janeiro, RJ. 120p, 2008

BORGES LHM, CALOURO AM, SOUSA JRD DE. Large and medium sized mammals Study site. Vol. 22(2) p. 265-77, 2015

BOTELHO, A. L. M.; CALOURO, A. M.; BORGES, L. H. M.; E CHAVES, W. A. Large and médium sized mammals of the Humaitá Forest Reserve, southwestern Amazonia, state of Acre, Brazil. Check List, 8(6), 2012. p1190–1195

BRANDÃO- FILHO, S. P., M. E. BRITO, F. G. CARVALHO, E. A. ISHOKAWA, E. CUPOLILLO, L. FLOETER- WINTES, AND J. J SAW. Wild and synanthropic hosts of Leishmania (Viannia) brasiliensis in the endemic cutaneous leish- maniasis locality of Amaraji, Pernambuco state, Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. Vol.97. p 291-96, 2003

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. [Internet] Casos confirmados de Hantavirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 – 2017. Brasília: MS/SVS [atualizado em jan-2018; acesso em jan-2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/31/CONF-HANTA-93-17-ATUAL-25-01-2018.pdf>

BREITSCHWERDT, E.B.; MAGGI, R.G.; CHOMEL, B.B.; LAPPIN, M.R. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. J Vet Emerg Crit Care, v.20, p.8-30, 2010

BRENNER, D.J.; O´CONNOR, S.P.; WINKLER H.H.; STEIGERWALT, A.G. Proposals to unify the genera Bartonella and Rochalimaea, with descriptions of Bartonella Quintana comb. nov., Bartonella vinsonii comb.nov., and remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol Vol.43, p.777-786, 1993

BRITO, J. M; CRISOSTOMO, C.F. Eficiência de Armadilhas Live Trap (Sherman, Tomahawk e Pitfall) na Captura de Pequenos Mamíferos. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFAC, 5. Anais da V SIC, Rio Branco: PROINP/IFAC. 2015.

BUFFET, J-P.; KOSOY, Y. M.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Natural history of Bartonella-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. Review. Future Microbiology, Londres, v. 8, n. 9, p. 1117-1128, 2013

CALDERÓN, G; PINI, N; BOLPE, J; LEVIS, S; MILLS, J; SEGURA, E; GUTHMANN, N; CANTONI, G; BECKER, J; FONOLLAT, A; RIPOLL, C; BORTMAN, M; BENEDETTI, R; ENRIA, D. Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. Emerging Infectious Diseases Vol. 5, p. 792–797, 1999

CALOURO A.M; SANTOS F.G.A; FAUSTINO C.L; SOUZA S.F; LAGUE B.M; SILVA R. M. T. DA S.; SANTOS, G. J. L.; CUNHA, A. DE O. Riqueza e abundância de morcegos capturados na borda e no interior de um fragmento florestal do estado do Acre, Brasil. Rev. Biotemas, 23 (4), p.109-117, 2010

CALOURO, A.M. Riqueza de mamíferos de grande e médio porte do Parque Nacional da Serra do Divisor (Acre, Brasil). Vol.16, p.195–213, 1999

CARDOSO, A.J. & SOUZA, M.B. de. Distribuição temporal e espacial de anfíbios anuros no Seringal Catuaba. Actas 2o Cong. Latin. Amer. Herp., Vol.2: p. 271-291, 1996

CARVALHO C.T. Alguns mamíferos do Acre Ocidental. Bol. Emilio Goeld. Vol.06. Belém, PA, 22p, 1957

CARVALHO, R. W.; SERRA-FREIRE, N. M.; LINARDI, P. M.; ALMEIDA, A. B.; COSTA, J. N. Small rodents fleas from the Bubonic Plague focus located in the Serra dos Órgãos mountain range, State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 96(5), p. 603-609, 2001

CASADO, F.; BONVICINO, C.R.; NAGLE, C.; COMAS, B.; MANZUR, T.; LAHOZ, M.; SEUÁNEZ, H. Mitochondrial divergence between 2 populations of the Hooded Capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). Journal of Hereditas 101: 261–269, 2010

CERQUEIRA, R., FREITAS, S. R. A new study method of microhabitat structure of small mammals. Rev. Bras. Biol. Vol.59, p.219–223, 1999

CESARIO, M; CESARIO, R.R. [Internet]. Infecção bartonelose ruma para o Brasil. La Insignia; Brasil. [atualizado em mar-2005; acesso em mar-2005] Disponível em: http://www.lainsignia.org/2005/marzo/cyt_004.htm

CHARREL, R.N; LAMBALLERIE, X. Zoonotic aspects of arenavirus infections. Veterinary microbiology v.140, p. 213-220, 2010

CHAVES W.A. Estimativa das densidades das espécies de primatas da Fazenda Experimental Catuaba. SEMA/AC. Relatório Técnico. Documento não publicado, 1999

CIRELLI, K. R. N.; PENTEADO-DIAS, A. M. Análise da riqueza da fauna de Braconidae (Hymenoptera, Ichneumonoidea) em remanescentes naturais da Área de Proteção Ambiental (APA) de Descalvado, SP. Rev. Bras. Entomol. Vol. 47, p. 89–98, 2003

COSTA F, PORTER FH, RODRIGUES G, FARIAS H, DE FARIA MT, WUNDER EA, OSIKOWICZ LM, KOSOY MY, REIS MG, KO AI, CHILDS JE. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis Vol.14, p. 33-40, 2014

COSTA, P.S.G. Evidências sorológicas de infecções por *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* e *Ehrlichia chaffeensis* em indivíduos sadios e pacientes febris com e sem AIDS da região de Juiz de Fora, MG. Tese de Doutorado, Universidade Federal Minas Gerais, Belo Horizonte. 2004

D`ANDREA, P.S; MAROJA, L.S; GENTILE, R; CERQUEIRA, R; MALDONADO, J.R, A.; REY, L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea – Trematoda) in a

naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia – Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology*, Vol.120, p. 573-582, 2000

DA SILVA, M.N.F. Four new species of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia: Echimyidae) from the Western Amazon of Brazil. *Proceedings of Biology Society*. Washington, vol.111, p.436-471, 1998

DUARTE, A.F. Variabilidade e tendência das chuvas em Rio Branco, Acre, Brasil. *Revista Brasileira de Meteorologia* Vol. 20: p. 37-42, 2005

EISENBERG, J. H.; REDFORD, K. H. *Mammals of the Neotropics, the central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois: Vol. 3. 1999

ELER, E. S.; DA SILVA, M. N. F.; SILVA, C. E. F.; FELDBERG, E. Comparative cytogenetics of spiny rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae) from the Amazon region. *Genet. Mol. Res.* Vol.11, p. 830-46, 2012

EMMONS, L.H., FEER, F. *Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide.*, 2a ed. ed. University of Chicago, Press: Chicago. 1997

ENGBAEEK, K.; LAWSON, P.A. Identification of *Bartonella* species in rodents, shrews and cats in Denmark: detection of two *B. henselae* variants, one in cats and the other in the long-tailed field mouse. *APMIS*. Vol.112, n.6, p. 336-41, 2004

FAVACHO, A.R.; ANDRADE, M.N.; DE OLIVEIRA, R.C.; BONVICINO, C.R.; D'ANDREA, P.S.; LEMOS, E.R. Zoonotic *Bartonella* species in wild rodents in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Microbes Infect.* Vol.17, p. 889-892, 2015

FERREIRA L.A. Análise ambiental complementar sobre a terra indígena Kampa e isolados do Rio Envira. SEMA/AC. Relatório Técnico. Documento não publicado. 1996

FIGUEIREDO, L.T.M; MORELI, M.L; SOUSA, R.L.M. DE; BORGES, A.A; FIGUEIREDO, G.G; MACHADO, A.M; BISORDI, I; NAGASSE-SUGAHARA, T.K; SUZUKI, A; PEREIRA, L.E; SOUZA, R.P; SOUZA, L.T.M; BRACONI, C.T; HARSI, C.M; ZANOTTO, P.M.A. Hantavirus Pulmonary Syndrome, Central Plateau, Southeastern, and Southern Brazil. *Emerg Infect Dis* Vol. 15(4), p. 561–567, 2009

FREITAS, M.A.; FRANÇA, D.P.F.; VERISSIMO, D. First record of the Bicoloured-spined Porcupine *Coendou bicolor* (Tschudi, 1844) for Brazil. *Check List* vol.9, n.1, 2013

FREITAS, S. R., CERQUEIRA, R., VIEIRA, M. V. A device and standard variables to describe microhabitat structure of small mammals based on plant cover. *Brazilian J. Biol.* 62, p795-800, 2002

FUNTAC – Fundação de Tecnologia do Acre. Plano de Manejo Florestal de Uso Múltiplo com Rendimento Sustentado da Reserva Extrativista São Luís do Remanso. FUNTAC/AC, CTA. Relatório Técnico. Documento não publicado. 1997

GARDNER, A. L.; PATTON, J. L. Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the Neotropical cricetine complex. *Occas. Papers Mus. Zool. Louisiana State Univ.* vol. 49, p. 1-48, 1976

GASCON, C.; LOVEJOY, T. E.; BIIERREGAARD JUNIOR, R. O.; MALCOLM, J. R.; STOUFEER, P. C.; VASCONCELOS, H. L.; LAURANCE, W. F.; ZIMMERMAN, B.; TOCHER, M.; BORGES, S. Matrix habitat and species richness in tropical forest remnants. *Biological Conservation*, vol. 91, no. 2-3, p. 223-229, 1999

GONÇALVES, L.R; FAVACHO, A.R.D.M; ROQUE, A.L.R; MENDES, N.S; FIDELIS-JUNIOR, O.L; BENEVENUTE, J.L; HERRERA, H.M; D'ANDREA, P.S; DE LEMOS, E.R.S; MACHADO, R.Z; ANDRÉ, M.R. Association of Bartonella species with wild and synanthropic rodents in different Brazilian biomes. *Appl Environ Microbiol* Vol 82:7, p 154-7164, 2016

GONZALEZ DELLA VALLE, M.; EDELSTEIN, A.; MIGUEL, S.; MARTINEZ, V.; CORTEZ, J.; CACACE, M. L.; JURGELENAS, G.; SOSA ESTANI, S.; PADULA, P. Andes virus associated with Hantavirus Pulmonary Síndrome in northern 67 Argentina and determination of the precise site of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol. 66, n.6, p. 713-720, 2002

GUINDON, S., J. F. DUFAYARD, V. LEFORT, M. ANISIMOVA, W. HORDIJK, O. GASCUEL. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, vol. 59 n.3 p.307-321, 2010

H, C, TOKARZ R, SIMITH DB, NUNES MRT, BHAT M, ROSA EST, MEDEIROS DBA, PALACIOS G, VASCONCELOS PFC, LIPKIN WI. Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *J Virol*, vol. 86, p13756-13766, 2012

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* Vol. 22, p.160-174, 1985

HELLER, R.; KUBINA, M.; MARIET, P.; RIEGEL, P.; DELACOUR, G.; DEHIO, C. et. al. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. *Int J Syst Bacteriol.* v.49, n.1, p.283-8, 1999

HJELLE, B.; TORRES-PÉREZ, F. Hantaviruses in the americas and their role as emerging pathogens. *Viruses*. Vol. 2, n.12, p.2559-86, 2010 doi: 10.3390/v2122559. Epub 2010 Nov 25.

HENKES, W. E. BARCELLOS, C. Ecologia da paisagem da hantavirose no estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical* Vol. 37(6), p.505-507, 2004

INCRA, INSTITUTO NACIONAL DE COLONIZAÇÃO E REFORMA AGRÁRIA. Incra nos estados: Informações gerais sobre os assentamentos da reforma. Relatório eletrônico: [atualizado em nov-2017; acesso em nov-2017] disponível em:

://painel.incra.gov.br/sistemas/Painel/ImprimirPainelAssentamentos.php?cod_sr=14e
Parameters%5BPlanilha%5D=NaoeParameters%5BBox%5D=GERALeParameters%
5BLinha%5D=4>

IRWIN, D.; KOCHER, T.; WILSON, A. Evolution of the cytochrome-b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* v.32, p.128–144, 1991

IVERSSON, L.B; DA ROSA, A.P; ROSA, M.D; LOMAR, A.V; SASAKI, M.D.A G & LEDUC, J.W. Human infection by Hantavirus in southern and southeastern Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 40: p. 85-92, 1994

JACOMO, V; KELLY, P.J; RAOULT, D. Natural history of Bartonella infections (an Exception to Koch's Postulate). *Clin Diagn Lab Immunol* Vol. 9(1), p. 8-18, 2002

JEANCLAUDE, D.; GODMER, P.; LEVEILLER, D.; POUEDRAS, P.; FOURNIER, P.E.; et al. Bartonella alsatica endocarditis in a French patient in close contact with rabbits. *Clin Microbiol Infect.* Vol.2 p.110-1, 2009

JORLAN, F; ALEXANDRO, G; RENATA, C. DE O; JOHN, C; KUIAMA, L; BERNARDO, R. T; THAYSSA, A. C; CRISOSTOMO, C.F; et al. Xapuri virus a novel mammal arenavirus from Amazon Region. *Emerging Infectious Diseases.* (No prelo).

KEESING, F. ET AL. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* vol. 468, p, 647–652. 2010

KERNIF, T.; PAROLA, P.; RICCI, J.C.; RAOULT, D.; ROLAIN, J.M. Molecular detection of Bartonella alsatica in rabbit fleas, France. *Emerg Infect Dis.* Vol.16 n.12, p. 2013-4, 2010

KNAP, N.; DUH, D.; BIRTLES, R.; TRILAR, T.; PETROVEC, M.; AVSIC-ZUPANC, T. Molecular detection of Bartonella species infecting rodents in Slovenia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Vol. 50, n.1, p.45-50, 2007

KRALJIK, J.; PAZIEWSKA-HARRIS, A.; MIKLISOVÁ, D.; BLAŇAROVÁ, L.; MOŠANSKÝ, L.; BONA, M.; STANKO, M. Genetic diversity of Bartonella genotypes found in the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Central Europe. *Parasitology*. Vol.143, n.11, p. 1437, 2016

LACHER, T. E.; ALHO, C. J. R. Terrestrial small mammal richness and habitat associations in an Amazon Forest-Cerrado contact zone. *Biotropica* Vol. 33, p. 171-181, 2001

LAMBERT, T. D.; MALCOLM, J. R.; ZIMMERMAN, B. L. Amazonian small mammal abundances in relation to habitat structure and resource abundance. *Journal of Mammalogy* v.87, p. 766–776, 2006

LAMBERT, T. D.; MALCOLM, J. R.; ZIMMERMAN, B. L. Effects of mahogany (*Swietenia macrophylla*) logging on small mammal communities, habitat structure, and seed predation in the southeastern Amazon Basin. *For. Ecol. Manage.* Vol. 206, p. 381–398, 2005a

LAMBERT, T. D.; MALCOLM, J. R.; ZIMMERMAN, B. L. Variation in small mammal species richness by trap height and trap type in southeastern Amazonia. *Journal of Mammalogy*. Vol.86, p. 982-990, 2005b

LAURANCE, W. F.; VASCONCELOS, H. L.; LOVEJOY, T. E. Forest loss and fragmentation in the Amazon: implications for wildlife conservation. *Oryx* v.34, p. 39-45, 2000

LAURANCE, W.F. A crisis in the making: responses of Amazonian forests to land use and climate change. *Trends in Ecology and Evolution*, v.13, p. 411-415,1998

LAURANCE, W.F.; BIERREGAARD, R O. Jr. (eds). *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, p. 616, 1997

LEDUC, J. W. Epidemiology of Hantaan and related viruses. *Laboratory Animal Science*, 37, p. 413-418, 1987

LEDUC, J.W; SMITH, G.A; PINHEIRO, F.P; VASCONCELOS. P.F.C; ROSA, E.S.T; MAIZTEGUI, J.I. Isolation of a Hantaan-related virus from Brazilian rats and serologic evidence of its distribution in South America. *Am J Trop Med Hyg* 34(4): p. 810–815, 1985

LEMOS, E. R. S.; D`ANDREA, P. S.; BONVICINO, C. R.; FAMADAS, K. M.; PADULA, P.; CAVALCANTI, A .A.; SCHATZMAYR, H .G. Evidence of hantavirus infection in wild rodents captured in a rural area of the state of São Paulo, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* Vol.24:2, p 71-73, 2004

LEMOS, E.R.S.; D`ANDREA, P.S. Trabalho de campo com animais:procedimentos, riscos e biossegurança. Editora Fiocruz Rio de Janeiro, 180p, 2014

LIMA, M. G.; GASCON, C. The conservation of linear forest remnants in central Amazonia. *Biol. Conserv.* Vol. 91, p. 241-247, 1999

LOVEJOY, T. E.; BIERREGAARD, R. O.; RYLANDS, A. B.; MALCOLM, J. R.; QUINTELA, C. E.; HARPER, L. H., et al. Edge and other effects of isolation on Amazon forest fragments. In: Soulé, M. E. (Ed.). *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA. p. 257-285, 1986

LUDWIG, J. A., REYNOLDS, J. F. *Statistical Ecology: A Primer in Methods and Computing*. 1 ed. Wiley-Interscience. 1988

MACEDO, G. C.; DE ANDRADE, P. C. E.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. Genetic Diversity of Bartonella spp. in Wild Mammals and Ectoparasites in Brazilian Pantanal. *Microbial Ecology*. 2018

Malcolm, J. R. Biomass and diversity of small mammals in Amazonian forest fragments. Pp. 207–221 in *Tropical forest remnants: ecology, management and*

conservation of fragmented communities. (W. F. Laurance and R. O. Bierregaard, eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois. 1997

MALCOLM, J. R. Comparative abundances of neotropical small mammals by trap height. *Journal of Mammalogy* Vol.72, p.188-192, 1991

MARCIENTE, R. AND CALOURO, ARMANDO, M. Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae, *Lamproncycteris brachyotis* (Dobson, 1879): First record in Acre, Brazil. *Check List, Campinas*, 5(4): p886–889, 2009

MÁRQUEZ F. J. Detection of *Bartonella alsatica* in European wild rabbit and their fleas (*Spilopsyllus cuniculi* and *Xenopsylla cunicularis*) in Spain. *Parasit Vectors*. Vol 8 p56, 2015

MARTINS-ALONSO, A.; MAYDAY S.; PILAR F.; ELSA A., GUILLERMO B.; ROSA P.; et al. *Bartonella* spp. and *Yersinia pestis* Reservoirs, Cusco, Peru. *Emerg Infect Dis* v. 20 n.6, p.1069–1070, 2014

MAUREEN H. D.; YING B.; LILE M.; JONAS M. W.; MICHAEL Y. K. Development of a Novel Genus-Specific Real-Time PCR Assay for Detection and Differentiation of *Bartonella* Species and Genotypes. *J Clin Microbiol* Vol. 50, p. 1645–1649, 2012

MENDES-OLIVEIRA, A. C.; BOBROWIEC, P. E. D.; SILVA, C. R.; PINTO, L. C.; TREVELIN, L. C. Estudos sobre pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira: amostragens e lacunas do conhecimento. In. Mendes-Oliveira, A. C.; Miranda, C. L. (Org.). *Pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia*. Rio de Janeiro: SBM, p. 21-39, 2015

MENESES-FILHO, L. C. L.; FERRAZ, P. A.; PINHA, J. F. M.; FERREIRA, L. A.; BRILHANTE, N. A. Comportamento de 24 espécies arbóreas tropicais madeireiras introduzidas no Parque Zoobotânico de Rio Branco-Acre. v 1. EDUFAC/PZ. Rio Branco, AC. 135p, 1995

MESQUITA , C. C. DE. O clima do estado do Acre. Governo do Estado do Acre. Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente. Rio Branco, AC, 53p, 1996

MILLS, J. N., CHILDS, J. E., KSIAZEK, T. G., PETERS, C. J. & VELLECA, W. M. Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing. U.S. Department of Health & Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA. 1995

MILLS, J. N; CHILDS, J.E. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance of human health. *Emerging Infectious Diseases*: vol 4, p. 529-537, 1998

MOGOLLON-PASAPERA, E.; OTVOS, Jr. L.; GIORDANO, A.; CASSONE, M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? *Int J Infect Dis* v13, p.3-8, 2009

MORAES, L. B.; BOSSI, D. E. P.& LINHARES, A. X. Siphonaptera parasites of wild rodentes and marsupials trapped in three mountain range of the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(8), pp.1071-1076, 2003

MOREIRA, O. DA C. Agricultura ecológica no Projeto de Assentamento Dirigido Humaitá, Porto Acre. Monografia (Especialização em Agricultura Familiar Camponesa e Educação do Campo). Universidade Federal do Acre, Departamento de Ciências Agrárias, Rio Branco. 42p, 2007

MORELI, M. L.; SOUZA, R. L. M. & FIGUEIREDO, L. T. M. Detection of Brazilian Hantavirus by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Amplification of N gene in patients with Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol.99 n.6, p. 633-638, 2004

NETSKI, D.; THRAN, B.H; JEOR, S.C.S. Sin Nombre Virus Pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *J. Virol*: vol. 73, p. 585-591, 1999

NOGUEIRA, M.R.; POLA.; SILVA A.M. DA. &ROCHA, P.H. Projeto para Conservação do Parque Nacional da Serra do Divisor. Avaliação Ecológica Rápida da Quiropteroфаuna. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1997

NUNES-LAVOCAT, M; OLIVEIRA, S. V. DE; ELKHOURY, M. DA R.; FONSECA, L. X.; PEREIRA, S. V. CO; CALDAS, E. P.; GUIMARÃES, J. C. N. Evidência de circulação de hantavírus em área silenciosa da Região Amazônica. Rev Pan-Amaz Saude 6(4): p. 63-67, 2015

OCHOA, J. Efectos de la extraccion de maderas sobre la diversidad de mamiferos pequenos en bosques tierras bajas de la Guayana Venezolana. Biotropica Vol. 32, p.146-164, 2000

OKSANEN, J; BLANCHET, F. G; KINDT, R; LEGENDRE, P; MINCHIN, P. R; O'HARA, R; SIMPSON, G. L; SOLYMOS, P; STEVENS, M. H. H; SZOECS, E; WAGNER, H. Vegan: community ecology package. R package version Vol. 2, p 4-3, 2017. Disponível em: URL <http://cran.r-project.org/package=vegan> (Acesso em 3.10.17).

OLIVEIRA, A. M. A.; DEUS, C. E.; BUENO, C. S. C. ET AL. Plano de Manejo do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre. Rio Branco-AC: Departamento de Ciências da Natureza/UFAC, 119p., 1985

OLIVEIRA, K. A; JESUS, I. S. Espacialização e quantificação das áreas verdes no perímetro urbano do município de Rio Branco, Acre. Anais XV- SBSR, Curitiba PR. Brasil, INPE p.0877, 2011

OLIVEIRA, R.C., T. ROZENTAL, A.A. ALVES-CORRÊA, P.S. D'ANDREA, H.G. SCHATZMAYR, R. CERQUEIRA AND E.R.S. LEMOS. Study of Hantavirus infection in captive breed colonies of wild rodents. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 99, p. 575-576, 2004

OLIVEIRA, R.C; PADULA, P.J.; GOMES, R.; MARTINEZ, V.P; BELLOMO, C.; BONVICINO, C.R.; LIMA. D.I; BRAGAGNOLO, C.; CALDAS, A.C.; D'ANDREA, P.S; LEMOS, E. R.; Genetic characterization of hantaviruses associated with sigmodontine

rodents. In an endemic area for hantavirus pulmonary syndrome in southern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* Vol.11, p 301–314, 2011

PADULA, P., R. FIGUEROA, M. NAVARRETE, E. PIZARRO, R. CADIZ, C. BELLOMO, C. JOFRE, ET AL. Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodon- tine rodents. *J. Virol.* Vol.78 ed.1, p.1972– 79, 2004

PAGLIA, A.P., G.A.B. DA FONSECA, A.B. RYLANDS, G. HERRMANN, L.M.S. AGUIAR, A.G. CHIARELLO, Y.L.R. LEITE, L.P. COSTA, S. SICILIANO, M.C.M. KIERULFF, S.L. MENDES, V.C. TAVARES, R.A. MITTERMEIER AND J.L. PATTON. Annotated Checklist of Brazilian Mammals, 2nd edition. *Occasional Papers in Conservation Biology*.Vol. 6, p. 1–76, 2012

PARDINI, R.; SOUZA, S.M; BRAGA-NETO, R.; METZGER, J.P. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. *Biological Conservation*. v. 124, p. 253-266, 2005

PATTERSON, B.D. AND L.P. COSTA. Introduction to the History and Geography of Neotropical Mammals; pp. 1–5, in: B.D. Patterson and L.P. Costa (eds.). *Bones, Clones, and Biomes The History and Geography of Recent Neotropical Mammals*. Chicago and London: The University of Chicago Press. 2012

PATTON, J. L; PARDINAS, U. F. J; D'ELIA, G. *Mammals of South America, Volume 2: Rodents*. University of Chicago Press. 1384p, 2015

PATTON, J.L., M.N. DA SILVA, M.C. LARA AND M.A. MUSTRANGI. Diversity, differentiation and the historical biogeography of nonvolant small mammals of the Neotropical forests; pp. 455–465, in: W.F. Laurance and R.O. Bierregaard Jr. (eds.). *Tropical forest remnants: Ecology, management and conservation of fragmented communities*. Chicago: University of Chicago Press. 1997

PATTON, J.L., M.N.F. DA SILVA AND J.R. MALCOLM. Mammals of the Rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2000

PAVAN, S.E.; VOSS, R.S. A revised sub generic classification of short-tailed opossums (Didelphidae: Monodelphis). *American Museum Novitates* Vol. 3868, p. 1-44, 2016

PERES, C.A. Porque precisamos de megareservas na Amazônia. *Natureza & Conservação* Vol.3, p. 8–16, 2005

PERES, C.A. Porque precisamos de megareservas na Amazônia. *Natureza & Conservação*: vol.3 1ed, pp 8–16, 2005

PIGNATTI, M.G. Saúde e ambiente: as doenças emergentes no Brasil, *Ambiente & Sociedade*, v. VII, n. 1, jan./jun. 2004

PINCELLI, M. P.; BARBAS, C. S. V.; CARVALHO, C. R. R.; SOUZA, L. T. M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Síndrome pulmonar e cardiovascular por hantavírus. *J. Pneumol.*, Vol. 29(5), p. 309-324, 2003

PINE, R.H; HANDLEY, JR. CO. Genus *Monodelphis* Burnett, 1830. In. *Mammals of South America*. vol. 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. (Gardner, A.L., editor). The University of Chicago Press, Chicago and London. P.82-107, 2008

PRADO, J.R. AND A.R. PERCEQUILLO. Geographic distribution of the genera of the tribe Oryzomyini (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in South America: patterns of distribution and diversity. *Arquivos de Zoologia* 44 (1): p1–120. doi: 10.11606/issn.2176-7793.v44i1p1-120, 2013

R CORE TEAM DEVELOPMENT. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, The R Project for Statistical Computing. [atualizado em 10/02/2017: acesso em 10/02/2017] Disponível em: <http://www.r-project.org>

RABONI S.M; RUBIO, G; BORBA, L. DE; ZEFERINO, A; SKRABA, I; GOLDENBERG, S; DUARTE, DOS S. Clinical survey of hantavirus in southern Brazil and the development of specific diagnosis tools. *Am J Trop Med Hyg* 72(6): p. 800–804, 2005

RAZURI, H.; TOKARZ, R.; GHERSI, B.M.; SALMON-MULANOVICH, G.; GUEZALA, M.C.; ALBUJAR, C.; et al. Andes hantavirus variant in rodents, southern Amazon Basin, Peru. *Emerg Infect Dis.* Feb;20(2):257-60, 2014

RODRIGUES-SILVA, R.; MACHADO-SILVA, J. R.; FREIRE, N.; LENZI, H. L.; REY, L. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni* parasitological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 1* p 271-276, 1992

ROMANO-LIEBER, N. S.; YEE, J; HJELLE, B. Serologic survey for hantavirus infections among wild animals in rural areas of São Paulo state, Brazil. *Revista do Instituto de Medicinal Tropical de São Paulo, Vol. 43,* p.325-327, 2001

ROSAS, G. K. C.; DRUMOND, P. M. Mamíferos encontrados em dois castanhais localizados ao sudoeste do Estado do Acre, Brasil. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 23 p. 2009

ROZENTAL, T.; FERREIRA, M.S; GUTERRESA, A; MARES-GUIA, M. A. TEIXEIRA, B. R; GONÇALVES, J.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P. S.; DE LEMOS, E. R. S. Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil: *Bartonella* and *Coxiella* infections. *Ver. Acta Tropica Vol.168,* p. 64–73, 2017

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989

SANTOS, J. P; NUNES-LAVOCAT, M.; MACHADO, R. R; STEINKE, V. A; STEINKE E. T. A dinâmica do uso da terra e a hantavirose na Amazônia Legal-Brasil Janduhy. *Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde. Hygeia Vol. 8 (15):* p 33 - 43, 2012

SCHMALJOHN, C. S. & HJELLE, B. Hantaviruses: A global disease problem. *Emerging Infectious Diseases Vol.3:* p. 95-104, 1997

SCHMIDT, K.A., OSTFELD, R.S. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 82: p. 609-619, 2001

SILVA, da M. V.; VASCONCELOS, M. J.; HIDALGO, N. T. R.; VEIGA, A. P. R.; CANZIAN, M.; MAROTTO, P. C. F. & LIMA, V. C. P. de. Hantavirus Pulmonary Syndrome. Report of the first three cases in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* vol. 39 no. 4 São Paulo July/Aug. 1997

SILVA, M. N. F. DA.; DIAS, R.D.L.; SILVA, C.R. DA.; MARQUES-AGUIAR, S.A.; TAVARES, V.D.C.; AGUIAR, G.F.D.S.; et al., Biodiversidade brasileira de mamíferos amazônicos representada em coleções biológicas, in: Mendes-Oliveira, A.C., Miranda, C. (Eds.), *Os Pequenos Mamíferos Não Voadores Da Amazônia Brasileira*. Sociedade Brasileira de Mastozoologia, p 55-94, 2015.

SILVA, M. O programa brasileiro de unidades de conservação. *Megadiversidade*. MMA Vol.1 1ed Brasília, 26p, 2005

SILVA, R.G.; DO CARMO, M. A.; LINHARES, E. J. F.; ALMEIDA, M. C. Estruturação e funcionamento do parque zoológico como ferramenta para a educação ambiental em rio branco, Acre. VII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Campina Grande. 2016

SILVEIRA, M. Floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: Padrões e processos em múltiplas escalas. EDUFAC, Rio Branco, Brasil, 151p, 2005

SCHMIDT, R.A.C. A questão ambiental na promoção da saúde: uma oportunidade de ação multiprofissional sobre doenças emergentes, *PHYSIS: Revista de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, v.17, n.2, p.373-392, 2007

SMITH, E. P.; VAN BELLE, G. Nonparametric estimation of species richness. *Biometrics* Vol. 40, p.119–129, 1984

SMITH, M. F. & PATTON, J. L. The diversification of South American murid rodents: evidence from mitochondrial DNA sequence data for the Akodontine tribe. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 50, p. 149–177, 1993

SOLARI, S. A molecular perspective on the diversification of short-tailed opossums (Monodelphis: Didelphidae). *Mastozoología Neotropical* Vol.17, p. 317-333, 2010

SOLARI, S. A new species of *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae) from southeastern Peru. *Mammalian Biology*, 69(3). p145-152, 2004

SOUZA, G. E. de A. B.; SOUZA, E. F. de M.; Gomes, R. C. Projetos de assentamento boa esperança e humaitá: um estudo de desempenho econômico em dois períodos. *Revista de Estudos Sociais*. Vol 14. N. 28, 132p, 2012

SOUZA, L. T. M.; SUZUKI, A.; PEREIRA, L. E.; FERREIRA, I. B.; SOUZA, R. P.; CRUZ, Á. S.; IKEDA, T. I.; MOREIRA, F. G.; PERES, J. B.; SILVA, J. G.; CALDAS, E. P.; DALMASO, M. H.; GARROT, P. G.; TORRES, E. M.; CASTAGENI, M. C.; ROMANO, A. P. M.; PAULA, V. R.; MARQUES, C. C. A. Identificação das espécies de roedores reservatórios de hantavírus no Sul e Sudeste do Brasil. *Informe Epidemiológico do SUS*, 11(3/4), p. 161-163, 2002

SOUZA, M.B. Anfíbios: Reserva Extrativista do Alto Juruá e Parque Nacional da Serra do Divisor, Acre. 1 ed. Campinas: Ed. do Inst de Filosofia e Ciências Humanas. 77 pp, 2009

SOUZA, M.B. Anfíbios: Reserva Extrativista do Alto Juruá e Parque Nacional da Serra do Divisor, Acre. 1 ed. Campinas: Editora do Instituto de Filosofia e Ciências Humanas. 77 p, 2009

SOUZA, M.B.; SILVEIRA, M.; LOPES, M.R.M.; VIEIRA, L.J.S.; GUILHERME. E.; CALOURO, A.M.; et al. A Biodiversidade no Estado do Acre: Conhecimento Atual, Conservação e Perspectivas. *T&C Amaz.* Vol1 3ed. p. 45–56, 2003

STIRLING, G.; WILSEY, B. Empirical Relationships between Species Richness, Evenness, and Proportional Diversity. *Am. Nat.* Vol.158, p. 286-299, 2001

STONE-JOVICICH, S.; CRONKLETON, P.; AMARAL, P.; SCHMINK, M. Acompanhamento para o manejo florestal comunitário no projeto cachoeira, Acre, Amazonia, Brasil. CIFOR & IMAZON: Indonésia. 44p, 2007

SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews* vol.17, p.136–17, 2004

SUZUKI, A; BISORDI, I; LEVIS, S; GARCIA, J; PEREIRA, L.E; SOUZA, R.P; SUGAHARA, T.K.N; PINI, N; ENRIA, D; SOUZA, L.T.M; Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg. Infec. diseases* Vol.10, p. 2127-2134, 2004

TADDEI, V.A.; REZENDE, I.M.; CAMORA, D. Notas sobre uma coleção de morcegos de Cruzeiro do Sul, Rio Juruá, Estado do Acre (Mammalia, Chiroptera). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Nova série. Zoologia* Vol. 6, p. 75-88, 1990

TSAI, T.F. Hemorrhagic fever with renal syndrome clinical aspects. *Laboratory Animal Science*: Vol. 37, p. 419-427, 1987

THOMAS M KEANE, CHRISTOPHER J CREEVEY , MELISSA M PENTONY, THOMAS J NAUGHTON AND JAMES O MCINERNEY. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evolutionary Biology*, Vol.6 ed. 29. 2006

UFAC – UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE. [Internet] Reserva Florestal Humaitá é totalmente revitalizada. ASCON: [atualizado em 23 de nov 2015: acesso em 23 de nov 2015]. Disponível em: <http://www.ufac.br/site/news/reserva-florestal-humaita-e-totalmente-revitalizada/>

VAZ, V. C.; D'ANDREA, P. S.; JANSEN, A. M. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. Cambridge University Press *Parasitology*: Vol.134, p. 1785-1793, 2007

VIDAL, M. M., PIVELLO, V. R.; MEIRELLES, S. T.; METZGER, J. P. Produção de serapilheira em floresta Atlântica secundária numa paisagem fragmentada (Ibiúna, SP): importância da borda e tamanho dos fragmentos. *Brazilian Journal of Botany* v.30, p. 521-532, 2007

VIEIRA, C. C. Sobre o "juparfa" do nordeste do Brasil (*Potosflavus nocturnus* (Wied)). *Papeis Avulsos Dept. Zool.* 11: pp33-36, 1952

VIVO, M. How many species of mammals are there in Brazil? Taxonomic practice and diversity evaluation; pp. 313-321, in: C.E.M. Bicudo and N.A. Menezes (eds.). *Biodiversity in Brazil: 1996*

VOSS R.S. AND L.H. EMMONS. Mammalian diversity in Neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. Vol. 230, p. 1-115, 1996

VOSS, R.S., D.P. LUNDE, AND N.B. SIMMONS. The mammals of Paracou, French Guiana: a Neotropical lowland fauna. Part 2. Nonvolant species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics: zoonoses. [atualizada em jan-2017: acesso em jan-2017] Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/en>.

8. ANEXOS

8.1 Formulário para coleta de informações sobre Micro e Meso Habitat

PROTOCOLO DE MICRO E MESO-HABITAT (Em cada ponto):
 Data: ___/___/___ Trilha: _____ Ponto: _____ Medidor: _____
 Localidade: Acre
NO PONTO (9m²):

Horizontal	%	Ponto
1ª	Dossel	

Altura do dossel: _____
 Conectividade do dossel: Ausente, Pouco, Muito

% OFV	Ponto Norte	Ponto Sul	Ponto Leste	Ponto Oeste
1ª				

NO RAIOS DE 1,5m:
 Sub-bosque entre 1m a 5m: Ausente Esparso Denso
 Sub-bosque entre 5m a 10m: Ausente Esparso Denso
 Sub-bosque maior do que 10m: Ausente Esparso Denso

Ambiente: Fechado, Capoeira ou campo, Clareira

Árvores com DAP ≥ 40:
 (a-circunferência)
 1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____

PRESENÇA DE ÁRVORES MÚLTIPLAS: Presente, Ausente
 Altura do fuste: 1 _____, 2 _____, 3 _____, 4 _____, 5 _____, 6 _____

NO RAIOS DE 1,5m:
NÚMERO DE ÁRVORES com DAP < 10 cm: _____
NÚMERO DE BURACOS NO SOLO: _____

NA TRILHA (ao redor):
PRESENÇA DE ÁREAS ALAGADAS: Sim () Não () Distância do Ponto: _____ Córrego temporário (Chuvas) Riacho Lago Brejo Poça/
EXISTÊNCIA DE AFLORAMENTOS ROCHOSOS: Presente Ausente/
TEXTURA DO SOLO: sólido rochoso, solo com rochas maiores (tamanho do punho), solo com rochas menores (tamanho da unha ou menor), solo seco com poucas rochas, solo úmido sem rochas, solo alagado
PRESENÇA DE TRILHAS E ESTRADAS: Ausente, Passa pela trilha, Próximo à trilha
PLANTAÇÕES: Presente Ausente / Plantio Colheita / Tipo: _____
PRESENÇA DE CRIADOUROS DE ANIMAIS: Ausente, Passa pela trilha, Próximo à trilha
RELEVO: Plano, Pouco inclinado, Inclinado / **SINAIS DE CAÇADORES:** Ausente, Presente
ESPÉCIES PECULIARES:
 Cipós: Ausente Pouco Regular Muito / **Taquara:** Ausente Pouco Regular Muito
 Florada: Sim () Não () / **Árvores Frutíferas:** Presente, Ausente
 Tipo: _____ **Capinzal:** Ausente Pouco Regular Muito / **Herbáceas:** Ausente Pouco, Regular, Muito / **Outras Espécies:** _____ Ausente, Pouco, Regular, Muito

8.2 Licença Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ)

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência		Comissão de Ética no Uso de Animais
---	--	---	--

LICENÇA **LW-39/14**

Certificamos que o protocolo (P-70/13.2), intitulado “**ESTUDOS TAXONÔMICOS E ECO-EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES NÃO VOADORES DO BRASIL**”, sob a responsabilidade de **PAULO SERGIO D’ANDREA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 19/05/2018 e inclui o uso total de:

Marsupialia

- 1000 machos;
- 1000 fêmeas.

Rodentia

- 1000 machos;
- 1000 fêmeas

Rio de Janeiro, 19 de maio de 2014


Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04826550

8.4 Formulário para coleta de dados biométricos e material biológico

Nº LBCE : _____	TAG: _____	Espécie: _____
Sexo: Macho () Fêmea ()	Data de captura: ____/____/____	
PROCEDÊNCIA:		
Estado: _____	Município: _____	Localidade (fragmento): _____
Trilha: _____	Ponto: _____	Armadilha: _____
AMOSTRAS		
Coleta de sangue: sim () não ()		
Hemocultivo: sim () nº de tubos ____ não ()	Exame a fresco: sim () não ()	
Soro: sim () não () Eppendorf () Eluato ()	Micro hematócrito: _____	
Cariótipo: sim () nº de tubos ____ não ()	Responsável: _____	
Coleta para Hantavirus: rim () pulmão () fígado () baço () coração ()		
Banco genético: Fígado () baço ()	Ectoparasitas: sim () não ()	
Endoparasitas: sim () não ()	Responsável: _____	
Perfusão: sim () não ()	Esfregaço: sim () não () nº de lâminas: _____	
CONDIÇÃO REPRODUTIVA / OUTRAS INFORMAÇÕES		
Vagina: aberta () fechada ()		
Secreção: sim () não ()	Tipo: _____	
Grávida: Sim () Não ()	Lactante: Sim () Não ()	
Útero: virgem () não virgem ()		
Embriões/Filhotes nº: _____	Tamanho do embrião: _____	
Escrotado: ()	Não escrotado: ()	
Ectoparasitas: sim () não ()	Vesícula: sim () não ()	
Cicatriz: Orelha: Sim () Não () / Cauda: Sim () Não ()		
MARSUPIAIS		
Filhotes de marsupiais: nº _____	Hb _____	TA _____
Características: _____		
Manchas: sim () não ()		
Bolsa: virgem () não virgem ()	Tetas: _____	
Dentição (sup./inf.): _____/_____		
MEDIDAS (em mm) / COLEÇÃO		
Peso: _____	Comp. Corpo _____	Cauda _____ Orelha: _____
Pé: c/ unha: _____	s/ unha: _____	
Pele: Taxidermizado ()	Aberta ()	em álcool ()
Meio líquido: c/ pele ()	s/ pele ()	
OBSERVAÇÕES:		
