

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/10/2018.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**MAGNITUDE DO CUSTO ENERGÉTICO DA ATIVAÇÃO DO SISTEMA
IMUNE EM MORCEGOS: EFEITOS SAZONAIS E DA RESTRIÇÃO
ALIMENTAR**

LUCÍA VELARDE CABRERA MARTINEZ

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Outubro - 2016

599.4 Cabrera-Martinez, Lucía Velarde
C117m Magnitude do custo energético da ativação do sistema
imune em morcegos : efeitos sazonais e da restrição alimentar
/ Lucía Velarde Cabrera Martinez. - Rio Claro, 2016
45 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ariovaldo Pereira da Cruz Neto

1. Morcego. 2. Resposta imune. 3. Taxa metabólica. 4.
Sazonalidade. I. Título.

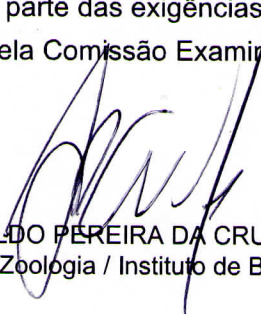
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Magnitude do custo energético da ativação do sistema imune em morcegos: efeitos sazonais e da restrição alimentar

AUTORA: LUCÍA VELARDE CABRERA MARTINEZ

ORIENTADOR: ARIIVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. ARIIVALDO PEREIRA DA CRUZ NETO
Departamento de Zoologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Prof. Dr. FERNANDO RIBEIRO GOMES
Instituto de Biociências / Universidade de São Paulo - SP


Prof. Dr. GUILHERME GOMES
Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / USP - Instituto de São Carlos / SP

Rio Claro, 27 de outubro de 2016

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do presente estudo através do Programa de Pesquisa sobre Mudanças Climáticas Globais (PFPMCG - projetos 2008/57687-0 e 2014/16320-7).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) pelo financiamento através do projeto bilateral entre a UNESP, Campus de Rio Claro e a Universidad Autonoma de Mexico (processo 490586/2013-9).

Ao CNPq pela bolsa de mestrado concedida (Projeto: 830816/1999-2).

Ao Departamento de Zoologia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, em Rio Claro, pelas facilidades logísticas.

À Estação Meteorológica do Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA/IGCE/UNESP) por ter disponibilizado os dados meteorológicos de interesse.

À Fazenda da Toca, na pessoa do Sr. Osvaldo V. Serrando Jr., por ter permitido o acesso ao local de coleta.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz-Neto, pelo conhecimento, paciência e amizade oferecidos durante os últimos anos.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram em campo, mas em especial a Luiz Fernando Bonatti, pelas muitas noites sacrificadas!

À minha mãe, meus sogros e ao meu marido pelo apoio incondicional.

“My mind seems to have become a kind of machine for grinding general laws out of large collections of facts...”

(Charles R. Darwin)

RESUMO

Um dos componentes da resposta imune inata é a resposta de fase aguda (RFA), a qual tem como objetivo reestabelecer a homeostase e promover a cura de um organismo através de uma série de alterações fisiológicas que podem acarretar num alto gasto energético. Algumas das alterações são aumento da taxa metabólica, temperatura corpórea (febre) e granulócitos no sangue (eosinófilos, basófilos e neutrófilos). Os animais podem também apresentar anorexia, diminuição da atividade e perda de massa corpórea, minimizando o gasto de energia durante a ativação da RFA. Em situações de aumento da demanda de energia e diminuição da ingestão calórica, os organismos estão sujeitos a uma deficiência nas reservas energéticas, a qual poderia dificultar o combate efetivo contra patógenos. Nos induzimos a ativação da RFA em morcegos frugívoros da espécie *Carollia perspicillata* por meio de injeção de lipopolissacarídeo (LPS). Quantificamos o custo energético da RFA e como o mesmo é afetado pela sazonalidade (inverno e verão) e disponibilidade de alimento (restrição alimentar e alimentados *ad libitum*). A perda de massa corpórea durante a RFA foi significativa em ambas as estações, porém apenas em morcegos em restrição alimentar, provavelmente devido a que nos morcegos em restrição alimentar foi necessária a mobilização de reservas energéticas, enquanto que morcegos alimentados *ad libitum* cobriram parte do custo da RFA através da mobilização de carboidratos ingeridos horas antes do experimento. Não observamos febre nem leucocitose, contudo, a razão neutrófilo/linfócito (N/L) teve aumento significativo unicamente em morcegos em restrição alimentar e durante o inverno. Este último parâmetro é também um indicador de estresse, o que sugere que à combinação de baixa disponibilidade de alimento e aumento na demanda energética para termoregulação durante o inverno pode ser uma situação estressante para estes morcegos. Aparentemente os morcegos deste grupo conseguiram ativar uma RFA, porém não foi possível mensurar se a efetividade da mesma foi comprometida. O custo energético da RFA não diferiu entre grupos experimentais. Nossos dados mostram que o custo da ativação da RFA em *C. perspicillata* é baixo (1% do orçamento diário de energia). Portanto, mesmo em situações onde existe maior demanda de energia e baixa disponibilidade de alimento, *C. perspicillata* ainda é capaz de ativar uma RFA, e conseqüentemente, manter a imunocompetência sem comprometer o seu orçamento de energia.

Palavras-chave: Custo energético, Resposta imune, Taxa Metabólica, Sazonalidade, Restrição alimentar, Resposta de fase aguda

ABSTRACT

One of the innate immune response components is the APR, which can be activated by trauma, infection, stress and inflammation. The APR activation aims to restore homeostasis and health of an organism exposed to the before mentioned events, through several physiological modifications that may result in high energetic cost. Some modifications are increase in metabolic rate, fever and granulocytes in the blood (eosinophils, basophils and neutrophils). Animals may also show anorexia and body mass loss, reducing the energy expenditure during the APR activation. In situations where animals are exposed to increase energy demand and decrease caloric intake, they could experience a deficiency in energy reserves, which may hamper the effectiveness of an immune response. We induced the APR activation in the Short-tailed fruit bats (*Carollia perspicillata*) by LPS injection. We quantified the energetic cost of the APR and how it is affected by seasonality (winter and summer) and food availability (food restriction and fed *ad libitum*). Body mass loss during the APR activation was observed in both seasons, but only in bats in food restriction, probably due to the mobilization of energy reserves, while bats fed *ad libitum* covered part of the APR cost by the mobilization of carbohydrates from the recent ingested food. Bats did not show fever or leukocytosis, nevertheless, we found increase in N/L ratio when bats were in food restriction and during winter. This parameter is also a stress indicator, so probably the combination of limited food availability and increase in the energy demand for thermoregulation during winter, may be a stressful situation for this bat. It seems that bats from this group were able to activate the APR, nevertheless we could not measure if the effectiveness of the response was jeopardized. The energetic cost of the APR activation did not vary between experimental groups. Our results showed that for *C. perspicillata*, activating the APR entails low energy cost (1% of the daily energy budget). Thus, they seem to be capable of activating an immune response even in situations that demand more energy and when food availability is limited, and consequently preserve immunocompetence without compromising their energy budget.

Key-words: Energetic cost, Immune response, Metabolic rate, Seasonality, Food restriction, Acute phase response.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
ABSTRACT	20
INTRODUCTION	20
MATERIAL AND METHODS.....	23
<i>Animal capture and housing</i>	23
<i>Immune challenge</i>	23
<i>Measuring the APR components</i>	24
<i>Body mass</i>	24
<i>Body temperature</i>	24
<i>Hematological parameters</i>	24
<i>Metabolic rate</i>	24
<i>Data Analysis</i>	25
<i>Body mass and Body Temperature</i> -	25
<i>Hematological parameters</i>	25
<i>Metabolic rate</i>	26
<i>Total energetic cost of the immune response</i>	26
RESULTS	27
<i>Body mass</i>	27
<i>Body temperature</i>	27
<i>Hematological parameters</i>	27
<i>Metabolic rate</i>	27
<i>Total energetic cost of the immune response</i>	28
DISCUSSION.....	28
REFERENCES	33

INTRODUÇÃO GERAL

A imunocompetência reflete a capacidade dos organismos de ativar e manter uma cascata de respostas imunológicas apropriadas para combater patógenos aos quais são expostos ao longo de seus ciclos de vida, e assim, assegurar a manutenção da homeostase frente aos potenciais efeitos deletérios causados por doenças (Costantini and Møller, 2009; Demas et al., 2011; Råberg et al., 1998). A primeira linha de defesa contra patógenos é a resposta inata, durante a qual é induzida inflamação local, através da produção de citocinas inflamatórias. Caso uma leve inflamação não seja suficiente para restaurar a saúde do organismo, inicia-se uma inflamação sistêmica, acarretando um alto gasto de energia (Lee, 2006). Durante a inflamação sistêmica aumenta a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ocorrem mudanças no metabolismo de energia e nutrientes, diminuem as atividades sociais e de locomoção, e é apresentado comportamento de anorexia (diminuição na ingestão de alimento) e febre (Hart, 1988; Klasing and Leshchinsky, 1999). Estas alterações comportamentais e fisiológicas caracterizam a resposta de fase aguda (RFA) que tem como objetivo acelerar o processo de cura, mas que requerem um alto gasto de energia e nutrientes para ser ativada (Klasing and Leshchinsky, 1999; Lee, 2006; Sheldon and Verhulst, 1996). Por esta razão, tem sido postulado que a ativação do sistema imune inato, o menos em aves e mamíferos e especificamente da RFA, poderia levar a um conflito entre a ativação do sistema imune e outras funções fundamentais para a sobrevivência dos organismos que também dependem de recursos energéticos, tais como reprodução e termoregulação (Ardia, 2005; Sheldon and Verhulst, 1996). Por exemplo, Deerenberg e col. (1997) manipularam o tamanho da ninhada e carga de trabalho parental em indivíduos da espécie *Taeniopygia guttata* e observaram que o aumento no esforço reprodutivo acarretou redução na produção de anticorpos. Whitaker e Fair (2002) observaram que após um desafio imune, filhotes de *Poecile gambeli* apresentaram flutuação assimétrica no comprimento das penas das asas, indicando que a ativação da resposta imune durante a fase de crescimento, teve um custo energético que comprometeu o desenvolvimento dos filhotes. Sköld-Chiriak e col. (2015) desafiaram o sistema imune de indivíduos de *Taeniopygia guttata* e observaram variações de temperatura corpórea. Quando os indivíduos eram desafiados durante a noite, eles ativavam uma resposta febril, porém, ao serem desafiados durante o dia eles apresentavam hipotermia. A conclusão dos autores foi que a hipotermia deve minimizar o risco de superaquecimento e evitar um custo metabólico excessivo durante o dia, período no qual a temperatura corpórea

tende a ser alta. Porém durante a noite, quando a temperatura corpórea é naturalmente mais baixa nessas aves, a resposta febril é mais benéfica.

A perda de massa corpórea durante a RFA já foi observada em muitos organismos (Burness et al., 2010; Otálora-Ardila et al., 2016.; Owen-Ashley et al., 2006; Owen-Ashley and Wingfield, 2006; Schneeberger et al., 2013a). Como a RFA induz anorexia (Kyriazakis et al., 1998), esta perda de massa é comumente associada à mobilização de reserva de reservas energéticas que seriam utilizadas para cobrir, em parte, os custos de ativar a RFA (Moreno-Rueda, 2011; Ricklefs and Wilkelski, 2002; Zera and Harshman, 2001). Outro evento observado durante a RFA é a febre (Evans et al., 2015; Marais et al., 2011; Otálora-Ardila et al., 2016). Altas temperaturas corpóreas reduzem a replicação de vírus e bactérias (Lwoff, 1971; Osawa and Iel, 1964), provocam a proliferação e tráfego de linfócitos para os órgãos linfáticos secundários (linfonodos e baço), migração de neutrófilos e células dendríticas e produção de citocinas inflamatórias (Appenheimer et al., 2005). Portanto, em princípio, certos parâmetros hematológicos que variam em decorrência da resposta febril, tais como a razão N/L e a contagem total de leucócitos, também podem ser indicadores da ativação da resposta imunológica (Feldman et al., 2000). Por fim, diversos estudos mostram que a ativação do sistema imune, induzida por diferentes desafios produz aumento na taxa metabólica (Cutrera et al., 2010; King and Swanson, 2013; Marais et al., 2011; Martin et al., 2003; Otálora-Ardila et al., 2016; Ots et al., 2001). No caso da RFA, este aumento pode ocorrer devido à resposta febril, já que para cada 1 ° C de aumento na temperatura corpórea, há incremento de 10 – 25% na taxa metabólica (Kluger, 1979). Todavia, este aumento também pode ocorrer devido à modulação da síntese de proteínas no fígado, como observado num trabalho realizado por Ksiazek et al., (2003). Estes autores detectaram aumento no tamanho do fígado e rim durante desafio imune em ratos de laboratório (Swiss Webster), e atribuíram tal variação de tamanho ao incremento da síntese de proteínas, associada com o aumento da taxa metabólica durante a ativação da RFA.

Os padrões das respostas imunológicas podem variar em decorrência de diversos fatores, como a história de vida do organismo, o seu estado nutricional e até mesmo o período do ano no qual ocorre o processo imunológico de defesa (Lee, 2006; Martin et al., 2008). Conforme mencionado anteriormente, a suposição de que a ativação da resposta imune requer alto gasto de energia, postula-se que muito desta variação deve-se as possíveis soluções de compromisso entre o custo de ativar o sistema imune e a alocação de energia para outras funções. No caso específico da RFA, este compromisso seria mais evidente em situações de baixa disponibilidade de alimento no ambiente ou alta demanda energética como, por

exemplo, durante o inverno (Bronson, 1987; Kunz et al., 1998; Moreno-Rueda, 2011). Em ambas as situações, seria esperado que os organismos priorizassem as respostas menos custosas em termos de energia, isto é as respostas do sistema imune adaptativo (respostas específicas não inflamatórias – Lee, 2006). Por exemplo, foi observado que em aves da espécie *Passer montanus* com altas taxas reprodutivas possuem respostas de memória imunológica fracas, porém fortes respostas inflamatórias não específicas em comparação com indivíduos da espécie *Passer domesticus*, os quais possuem taxas reprodutivas menores (Lee et al., 2006). Assim também, durante o período reprodutivo, foi observado que aves da espécie *Anas platyrhynchos* produzem uma versão truncada de anticorpo durante a resposta imune, a qual minimiza a resposta inflamatória contra a invasão de bactérias (Humphrey et al., 2004), diminuindo assim o custo da mesma. Em um estudo com primatas (*Macaca mulata*) foi observado uma diminuição da produção de citocinas (as quais requerem alto custo energético, porém, aumento na proliferação de linfócitos (que requerem menor custo energético) durante a ativação de uma resposta imune no inverno, que coincide com a estação reprodutiva desta espécie (Mann et al., 2000). Tal resultado sugere que esta espécie prioriza a ativação do sistema imune adquirido durante o período reprodutivo (Mann et al., 2000). Assim também, durante a resposta imune indivíduos da espécie *Passer domesticus* submetidos a uma dieta de baixa qualidade foram capazes de produzir uma alta quantidade de anticorpos (Buchanan et al., 2003), enquanto que quando submetidos a uma dieta de alto teor proteico, isto é, indivíduos em bom estado nutricional, produziram uma baixa quantidade de anticorpos, porém apresentaram forte resposta inflamatória (Gonzalez et al., 1999). As variações nos padrões da resposta imune observadas nos trabalhos citados anteriormente confirmam a importância de considerar diversos parâmetros imunológicos em diferentes situações às quais os organismos são expostos durante o seu ciclo de vida (como períodos com alta demanda de energia e baixa disponibilidade de alimento) quando se tem como objetivo a compreensão dos processos relacionados à ativação da resposta imune.

Variações sazonais como diminuição da temperatura ambiental, redução da disponibilidade de alimento, migração, confinamento, falta de refugio e aumento na taxa de predação podem causar alterações na função imunológica de aves e mamíferos, comprometendo a sua sobrevivência (John, 1994; Lochmiller et al., 1994; Nelson and Demas, 1996). Por exemplo, num estudo realizado com roedores da espécie *Peromyscus maniculatus*, os autores observaram que indivíduos mantidos a 8°C apresentavam níveis menores de anticorpos do que indivíduos mantidos a 20°C (Demas and Nelson, 1998), e em aves da espécie *Saxicola torquata*, os autores observaram que quando mantidas em temperaturas

baixas (~10°C), as aves apresentavam menor capacidade bactericida contra *Escherichia coli* do que aves mantidas a temperaturas mais altas (~20°) (Versteegh et al., 2014). Estudos também tem observado que a redução na disponibilidade de alimento pode afetar a imunocompetência dos organismos. Por exemplo, no estudo realizado por Nakamura e col (1990) com ratos de laboratório, os autores observaram que ratos submetidos à restrição alimentar apresentavam perda da massa dos órgãos linfáticos (timo 25% e baço 27%) e diminuição da atividade de células exterminadoras naturais em comparação com o grupo controle (alimentado *ad libitum*), assim como aumento de cortisol e catecolaminas no plasma sanguíneo os quais acredita-se, atuam como supressores das respostas mitogênicas dos linfócitos (Syvalahti, 1987). Assim também, Alonso-alvarez e Tella (2001) realizaram um estudo com aves da espécie *Larus cachinnans*, as quais eram submetidas a três regimes alimentares: jejum, restrição (um terço da ingestão média diária) e aves alimentadas *ad libitum*. Os autores detectaram correlação entre a condição corpórea dos indivíduos e a sua capacidade de ativar uma resposta imune inflamatória.

No presente trabalho nos analisamos a presença e magnitude da RFA em morcegos. Morcegos são os mamíferos de maior diversidade e distribuição geográfica, podendo ser encontrados em todos os continentes com exceção da Antártida (Schipper et al., 2008). A sua capacidade de voar e cobrir longas distâncias, habilidade para habitar diversos refúgios e ocupar nichos ecológicos variados, torna os morcegos um dos organismos mais sucedidos do planeta, porém também os faz eficientes vetores na transmissão de doenças (Bernard et al., 2012; Calisher et al., 2006; Kuzmin et al., 2011; Wong et al., 2007; Woo et al., 2009). Por exemplo, o seu comportamento de agregação nos refúgios facilita a transmissão de doenças entre indivíduos, e o deslocamento entre refúgios ou mesmo o comportamento migratório pode facilitar a transmissão entre colônias da mesma espécie ou ainda de espécies distintas. Morcegos são hospedeiros de diversos microrganismos como bactérias, fungos, vírus e parasitas (Bausch and Schwarz, 2014; Brook and Dobson, 2015; Calisher et al., 2006; Mühldorfer, 2013). Existem diversos estudos sobre doenças emergentes em morcegos, porém a maioria se concentra no estudo de vírus e parasitas (Bausch and Schwarz, 2014; Calisher et al., 2006; Plowright et al., 2015; Saéz et al., 2014). De fato, morcegos são vulneráveis a diversas doenças como vírus Nipah, Hendra, Ebola, Marburg, ou de coronavírus do tipo SARS (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2011; Kuzmin et al., 2011), mas também a bactérias como *Pasteurella*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Yersinia* spp.

(Mühldorfer, 2013) que podem causar doenças nos próprios morcegos, mas que também podem ser transmitidas para seres humanos e animais domésticos.

Baker e col. (2013) fizeram uma revisão detalhada sobre as respostas do sistema imune inato e adaptativo em morcegos, e observaram que embora compartilhem diversos componentes do sistema imune com outros vertebrados, a sua imunocompetência é diferenciada em termos quantitativos e qualitativos. Porém os padrões das respostas imunes podem variar ainda entre espécies de morcegos. Diversos estudos tem avaliado a imunocompetência de morcegos e os resultados tem sido controversos. Por exemplo, Schneeberger e col. (2013a) desafiaram o sistema imune de morcegos da espécie *C. perspicillata* com injeção de LPS e observaram leucocitose e aumento do estresse oxidativo após a resposta inflamatória. Assim também, Stockmaier e col. (2015) induziram uma RFA através de injeção de LPS em morcegos da espécie *Molossus molossus*, os quais apresentaram perda de massa corpórea mas não desenvolveram febre nem leucocitose. Os autores concluíram que a resposta febril pode não ser uma característica conservativa entre mamíferos e que o fato de não terem observado leucocitose pode estar associado às variações de temperatura corpórea da espécie, já que existem evidências de baixas temperaturas corpóreas reduzirem o número de leucócitos circulando na corrente sanguínea em outros mamíferos. Pelo contrário, Otálora-Ardila e col. (2016) observaram febre e aumento da taxa metabólica de morcegos da espécie *Myotis vivesi* após induzir uma resposta imune através de injeção de LPS. Estes trabalhos sugerem que os padrões de resposta do sistema imune podem variar mesmo entre espécies taxonomicamente próximas. Isso torna de suma importância o estudo da ativação da RFA em diversas espécies de morcegos, assim como em diversas situações às quais os mesmos estão expostos durante o ciclo de vida. Somente dessa forma será possível aumentar a nossa compreensão sobre a imunocompetência destes organismos, podendo contribuir para planos que visem a sua conservação.

Dentro deste contexto, nos analisamos se determinados componentes da RFA (perda de massa corpórea, febre, aumento na razão neutrófilo/linfócito, na contagem total de leucócitos e na taxa metabólica) estariam presentes no morcego frugívoro *C. perspicillata*, após seu sistema imune ter sido desafiado com a inoculação de LPS. Estes parâmetros foram avaliados durante duas estações do ano (verão e inverno) e em morcegos submetidos a dois regimes alimentares (alimentados *ad libitum* e restrição alimentar). Por fim, o custo energético de ativação da RFA foi estimado com base em medidas da taxa metabólica. *C. perspicillata* possui hábito frugívoro, e tem preferência por frutos de *Piper* sp. (Mello et al., 2004), os quais são escassos durante o inverno. Sendo assim, durante essa estação, os

morcegos são susceptíveis à diminuição na disponibilidade de recursos energéticos, e ao aumento da demanda de energia para outras funções fisiológicas tais como termoregulação (Lochmiller and Deerenberg, 2000; Nelson and Demas, 1996; Schetter et al., 1998). Porém, é importante considerar que os organismos podem desenvolver adaptações que lhes permitiram ter sucesso durante períodos de condições mais severas (Nelson and Demas, 1996). Se *C. perspicillata* tiver desenvolvido adaptações para se antecipar a possíveis variações ambientais durante o ciclo anual, nós esperamos que em ambas as estações e ambos os regimes alimentares, os indivíduos consigam ativar uma RFA, e que o custo da mesma seja semelhante entre os grupos. Porém, se a espécie não for adaptada para lidar com tais variações, esperamos que morcegos no verão e alimentados *ad libitum* consigam ativar a RFA com menor custo energético, e morcegos no inverno e em restrição alimentar apresentem o maior custo de ativação da RFA. Esperamos detectar perda de massa corpórea em todos os grupos experimentais, porém devido a contradições nos resultados de estudos anteriores, realizados com morcegos, as nossas hipóteses sobre febre e aumento nos parâmetros hematológicos não são concretas. Entender o efeito de tais variações na imunocompetência dos morcegos e de outros organismos é fundamental para entender os fatores que determinam a sua sobrevivência na natureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-alvarez, C., Tella, J.L., 2001. Effects of experimental food restriction and body- mass changes on the avian T-cell-mediated immune response 105, 101–105.
- Appenheimer, M.M., Chen, Q., Girard, R.A., Wang, W.-C., Evans, S.S., 2005. Impact of fever-range thermal stress on lymphocyte-endothelial adhesion and lymphocyte trafficking. *Immunol. Invest.* 34, 295–323. doi:10.1081/IMM-200064501
- Ardia, D.R., 2005. Tree swallows trade off immune function and reproductive effort differently across their range. *Ecology* 86, 2040–2046. doi:10.1890/04-1619
- Baker, M.L., Schountz, T., Wang, L.F., 2013. Antiviral Immune Responses of Bats: A Review. *Zoonoses Public Health* 60, 104–116. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x
- Bausch, D.G., Schwarz, L., 2014. Outbreak of Ebola Virus Disease in Guinea: Where Ecology Meets Economy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, 8–12. doi:10.1371/journal.pntd.0003056
- Bernard, E., Aguiar, L.M.S., Brito, D., Cruz-Neto, A.P., Gregorin, R., Machado, R.B., Oprea, M., Paglia, A.P., Tavares, V.C., 2012. Uma análise de horizontes sobre a conservação de morcegos no Brasil, in: *Mamíferos Do Brasil: Genética, Sistemática, Ecologia E*

- Conservação. Sociedade Brasileira de Mastozoologia, Rio de Janeiro, pp. 19–35.
- Bronson, F.H., 1987. Susceptibility of the fat reserves of mice to natural challenges. *J. Comp. Physiol. B* 157, 551–554. doi:10.1007/BF00700974
- Brook, C.E., Dobson, A.P., 2015. Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends Microbiol.* 23, 172–180. doi:10.1016/j.tim.2014.12.004
- Buchanan, K.L., Evans, M.R., Goldsmith, A.R., 2003. Testosterone, dominance signalling and immunosuppression in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 55, 50–59. doi:10.1007/s00265-003-0682-4
- Burness, G., Armstrong, C., Fee, T., Tilman-Schindel, E., 2010. Is there an energetic-based trade-off between thermoregulation and the acute phase response in zebra finches? *J. Exp. Biol.* 213, 1386–1394. doi:10.1242/jeb.027011
- Cabrera-Martinez, L., Herrera M, G.L., P Cruz-Neto, A., n.d. The energetic costs of mounting an immune response in Pallas’s long-tongued bat (*Glossophaga soricina*).
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K. V., Schountz, T., 2006. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 531–545. doi:10.1128/CMR.00017-06
- Costantini, D., Møller, A.P., 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 153, 339–344. doi:10.1016/j.cbpa.2009.03.010
- Cutrerera, a P., Zenuto, R.R., Luna, F., Antenucci, C.D., 2010. Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco): implications for intraspecific and interspecific variation in immunological traits. *J. Exp. Biol.* 213, 715–724. doi:10.1242/jeb.037887
- Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S., Bos, N., 1997. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc. R. Soc. B-Biological Sci.* 264, 1021–1029. doi:10.1098/rspb.1997.0141
- Demas, G.E., Nelson, R.J., 1998. Photoperiod, ambient temperature, and food availability interact to affect reproductive and immune function in adult male deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Biol. Rhythms* 13, 253–262. doi:10.1177/074873098129000093
- Evans, S.S., Repasky, E. a, Fisher, D.T., 2015. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 335–349. doi:10.1038/nri3843
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. Schalm’s Veterinary Hematology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, London.
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2011. Investigating the role of bats in emerging zoonoses, Organization.
- Gonzalez, G., Sorci, G., Møller, A.P., Ninni, P., Haussy, C., De Lope, F., 1999.

- Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *J. Anim. Ecol.* 68, 1225–1234. doi:10.1046/j.1365-2656.1999.00364.x
- Hart, B.L., 1988. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12, 123–137. doi:10.1016/S0149-7634(88)80004-6
- Humphrey, B.D., Calvert, C.C., Klasing, K.C., 2004. The ratio of full length IgY to truncated IgY in immune complexes affects macrophage phagocytosis and the acute phase response of mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Dev. Comp. Immunol.* 28, 665–672. doi:10.1016/j.dci.2003.11.003
- John, J.L., 1994. The avian spleen: A neglected organ. *Q. Rev. Biol.* 69, 327–351.
- King, M.O., Swanson, D.L., 2013. Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216, 2097–2102. doi:10.1242/jeb.079574
- Klasing, K.C., Leshchinsky, T. V., 1999. Functions, costs and benefits of the immune system during development and growth. *Ostrich* 69, 2817–2835.
- Kluger, M.J., 1979. *Fever. Its biology, evolution and function.* Princeton University Press, Princeton.
- Ksiazek, A., Konarzewski, M., Chadzińska, M., Cichoń, M., 2003. Costs of immune response in cold-stressed laboratory mice selected for high and low basal metabolism rates. *Proc. Biol. Sci.* 270, 2025–2031. doi:10.1098/rspb.2003.2474
- Kunz, T.H., Wrazen, J.A., Burnett, C.D., 1998. Changes in body mass and fat reserves in pre-hibernating little brown bats (*Myotis lucifugus*). *Ecoscience*.
- Kuzmin, I. V., Bozick, B., Guagliardo, S.A., Kunkel, R., Shak, J.R., Tong, S., Rupprecht, C.E., 2011. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerg. Health Threats J.* 4, 1–17. doi:10.3402/ehth.v4i0.7159
- Kyriazakis, I., Tolkamp, B., Hutchings, M., 1998. Towards a functional explanation for the occurrence of anorexia during parasitic infections. *Anim. Behav.* 56, 265–274. doi:10.1006/anbe.1998.0761
- Lee, K.A., 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1000–1015. doi:10.1093/icb/icl049
- Lee, K.A., Martin, L.B., Hasselquist, D., Ricklefs, R.E., Wikelski, M., 2006. Contrasting adaptive immune defenses and blood parasite prevalence in closely related *Passer* sparrows. *Oecologia* 150, 383–392. doi:10.1007/s00442-006-0537-6
- Lochmiller, R.L., Deerenberg, C., 2000. Trade-Offs in Evolutionary Immunology: Just What Is the Cost of Immunity? *Oikos* 88, 87–98. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x
- Lochmiller, R.L., Vestey, M.R., McMurray, S.T., 1994. Temporal Variation in Humoral and

- Cell-Mediated Immune Response in a *Sigmodon Hispidus* Population. *Ecology* 75, 236–245.
- Lwoff, A., 1971. From protozoa to bacteria and viruses. Fifty years with microbes. *Ann. Rev. Microbiol* 25, 1–26. doi:10.1146/annurev.biochem.64.1.721
- Mann, D.R., Akinbami, M.A., Gould, K.G., Ansari, A.A., 2000. Seasonal Variations in Cytokine Expression and Cell-Mediated Immunity in Male Rhesus Monkeys. *Cell. Immunol.* 200, 105–115. doi:10.1006/cimm.2000.1623
- Marais, M., Maloney, S.K., Gray, D.A., 2011. The metabolic cost of fever in Pekin ducks. *J. Therm. Biol.* 36, 116–120. doi:10.1016/j.jtherbio.2010.12.004
- Martin, L.B., Scheuerlein, A., Wikelski, M., 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. B-Biological Sci.* 270, 153–158. doi:10.1098/rspb.2002.2185
- Martin, L.B., Weil, Z.M., Nelson, R.J., 2008. Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363, 321–339. doi:10.1098/rstb.2007.2142
- Mello, M.A.R., Schittini, G.M., Selig, P., Bergallo, H.G., 2004. Seasonal variation in the diet of the bat *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) in an Atlantic Forest area in southeastern Brazil. *Mammalia* 68, 49–55. doi:10.1515/mamm.2004.006
- Moreno-Rueda, G., 2011. Trade-off between immune response and body mass in wintering house sparrows (*Passer domesticus*). *Ecol. Res.* 26, 943–947. doi:10.1007/s11284-011-0848-x
- Mühldorfer, K., 2013. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses Public Health* 60, 93–103. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x
- Nakamura, K., Aoike, A., Hosokawa, T., Rokutan, K., Koyama, K., Nishi, Y., Yoshida, A., Kawai, K., 1990. Effect of Food-Restriction Stress on Immune-Response in Mice. *J. Neuroimmunol.* 30, 23–29. doi:10.1016/0165-5728(90)90049-S
- Nelson, R., Demas, G.E., 1996. Seasonal Changes in Immune Function. *Q. Rev. Biol.* 71, 511–548. doi:10.1086/419555
- Osawa, B.Y.E., Iel, L.H.M., 1964. Studies relating to the serum resistance of certain gram-negative bacteria. *J. Exp. Med.* 119, 41–51.
- Otálora-Ardila, A., Herrera M, L.G., Flores-Martínez, J.J., Welch Jr., K.C., 2016. Metabolic cost of the activation of immune response in the fish eating myotis the effects of inflammation and the acute phase response. *PLoS One* in press.
- Ots, I., Kerimov, A.B., Ivankina, E. V, Ilyina, T.A., Horak, P., Hörak, P., 2001. Immune challenge affects basal metabolic activity in wintering great tits. *Proc. R. Soc. B-Biological Sci.* 268, 1175–1181. doi:10.1098/rspb.2001.1636

- Owen-Ashley, N.T., Turner, M., Hahn, T.P., Wingfield, J.C., 2006. Hormonal, behavioral, and thermoregulatory responses to bacterial lipopolysaccharide in captive and free-living white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Horm. Behav.* 49, 15–29. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.04.009
- Owen-Ashley, N.T., Wingfield, J.C., 2006. Seasonal modulation of sickness behavior in free-living northwestern song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J. Exp. Biol.* 209, 3062–3070. doi:10.1242/jeb.02371
- Plowright, R.K., Eby, P., Hudson, P.J., Smith, I.L., Westcott, D., Bryden, W.L., Middleton, D., Reid, P.A., McFarlane, R.A., Martin, G., Tabor, G.M., Skerratt, L.F., Anderson, D.L., Cramer, G., Quammen, D., Jordan, D., Freeman, P., Wang, L.-F., Epstein, J.H., Marsh, G.A., Kung'u, N.Y., McCallum, H., 2015. Ecological dynamics of emerging bat virus spillover. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282, 20142124. doi:10.1098/rspb.2014.2124
- Råberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D., Svensson, E., 1998. On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proc. Biol. Sci.* 265, 1637–1641. doi:10.1098/rspb.1998.0482
- Ricklefs, R.E., Wilkelski, M., 2002. The physiology/life history nexus. *Trends Ecol. Evol.* 17, 462–469. doi:10.1016/S0169-5347(02)02578-8
- Saéz, A.M., Weiss, S., Nowak, K., Lapeyre, V., Kaba, M., Regnaut, S., Zimmermann, F., Düx, A., Ku, H.S., Merkel, K., Sachse, A., Thiesen, U., Villányi, L., Boesch, C., Dabrowski, P.W., Nitsche, A., Leendertz, S.A.J., Petterson, S., Becker, S., Krähling, V., Couacy-hymann, E., Akoua-Koffi, C., Weber, N., Schaade, L., Fahr, J., Borchert, M., Gogarten, J.F., Calvignac-spencer, S., Leendertz, F.H., Saez, A.M., Weiss, S., Nowak, K., Lapeyre, V., Zimmermann, F., Dux, A., Kuhl, H.S., Kaba, M., Regnaut, S., Merkel, K., Sachse, A., Thiesen, U., Villanyi, L., Boesch, C., Dabrowski, P.W., Radonic, A., Nitsche, A., Leendertz, S.A.J., Petterson, S., Becker, S., Krahling, V., Couacy-hymann, E., Akoua-Koffi, C., Weber, N., Schaade, L., Fahr, J., Borchert, M., Gogarten, J.F., Calvignac-spencer, S., Leendertz, F.H., 2014. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol. Med.* 7, 17–23. doi:10.15252/emmm.201404792
- Schetter, T.A., Lochmiller, R.L., Leslie, D.M., Engle, D.M., Payton, M.E., 1998. Examination of the nitrogen limitation hypothesis in non-cyclic populations of cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *J. Anim. Ecol.* 67, 705–721. doi:10.1046/j.1365-2656.1998.00240.x
- Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., et al., 2008. The Status of the World's Land and Marine Mammals: Diversity, Threat, and Knowledge. *Science* (80-.). 322, 225–230. doi:10.1126/science.1165115
- Schneeberger, K., Czirják, G.Á., Voigt, C.C., 2013. Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *J. Exp. Biol.* 216, 4514–4519. doi:10.1242/jeb.090837
- Sheldon, B.C., Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11, 317–321. doi:10.1016/0169-5347(96)10039-2

- Sköld-Chiriac, S., Nord, A., Tobler, M., Nilsson, J.-A., Hasselquist, D., 2015. Body temperature changes during simulated bacterial infection in a songbird: fever at night and hypothermia at day. *J. Exp. Biol.* 218, 2961–2969. doi:10.1242/jeb.122150
- Stockmaier, S., Dechmann, D.K.N., Page, R.A., O'Mara, M.T., 2015. No fever and leucocytosis in response to a lipopolysaccharide challenge in an insectivorous bat. *Biol. Lett.* 11, 20150576. doi:10.1098/rsbl.2015.0576
- Syvalahti, E., 1987. Endocrine and immune adaptation in stress. *Ann. Clin. Res.* 19, 70–77.
- Versteegh, M.A., Helm, B., Kleynhans, E.J., Gwinner, E., Tieleman, B.I., 2014. Genetic and phenotypically flexible components of seasonal variation in immune function. *J. Exp. Biol.* 217, 1510–1518. doi:10.1242/jeb.097105
- Whitaker, S., Fair, J., 2002. The costs of immunological challenge to developing mountain chickadees, *Poecile gambeli*, in the wild. *Oikos* 99, 161–165. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.990116.x
- Wong, S., Lau, S., Woo, P., Yuen, K.-Y., 2007. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* 17, 67–91. doi:10.1002/rmv
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Huang, Y., Yuen, K.-Y., 2009. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 234, 1117–27. doi:10.3181/0903-MR-94
- Zera, A.J., Harshman, L.G., 2001. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 95–126.