
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL MELHADO

**VARIAÇÃO NA TEMPERATURA CORPÓREA,
FREQUÊNCIA ALIMENTAR E PRODUÇÃO DE
LEUCÓCITOS DURANTE A RESPOSTA DE FASE
AGUDA NO MORCEGO *Carollia perspicillata*
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

GABRIEL MELHADO

VARIAÇÃO NA TEMPERATURA CORPÓREA, FREQUÊNCIA ALIMENTAR E PRODUÇÃO DE LEUCÓCITOS DURANTE A RESPOSTA DE FASE AGUDA NO MORCEGO *Carollia perspicillata* (CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)

Orientador: Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2018

599.4 Melhado, Gabriel
M521v Variação na temperatura corpórea, frequência alimentar e
produção de leucócitos durante a resposta de fase aguda no
morcego *Carollia perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) /
Gabriel Melhado. - Rio Claro, 2018
22 f. : il., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Ariovaldo Pereira da Cruz Neto

1. Morcego. 2. Resposta de fase aguda. 3. *Carollia
perspicillata*. 4. LPS. 5. Temperatura corpórea. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que sempre me abençoa e guia os meus passos em direção aos melhores caminhos.

Aos meus pais e ao meu irmão, os quais me incentivam nos estudos e são base de todas as minhas conquistas.

Aos meus professores, por compartilharem todo o conhecimento e experiências que me moldaram durante a minha formação de biólogo.

Ao Professor e Orientador, Dr. Ariovaldo Pereira da Cruz Neto por estar sempre disponível para me orientar, questionar, direcionar e me fazer pensar como um cientista.

Aos meus amigos que colaboraram e foram fundamentais na realização dos experimentos e da pesquisa como um todo: Lucia Martinez, Pedro Miguel (C3), Matheus Luqueta, Fernanda Horikawa, Thiago Daguano Gastaldi, Guilherme Scharf (Jig), Vitor Kamimura (Lilo), Idalina de Oliveira Nogueira, Luiza Freitas Silva, Alison Schmatz (Piá) e todos, que de certa forma, viveram essa experiência ao meu lado e compartilharam suas qualidades e sua sabedoria comigo.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da Unesp (PIBIC), por auxiliar todo o desenvolvimento desta atual pesquisa (Processo Prope-PIBIC 2017/2018 – 43486)

Ao suporte dado pela FAPESP (Processo FAPESP 2014Q16320-7 – Impacts of climate/environmental change on the fauna: na integrative approach.

Muito obrigado a todos!

Resumo

A primeira linha de defesa imunológica dos vertebrados contra patógenos está associada com o sistema imune inato, logo após à infecção, que envolve a ativação de uma cascata de respostas comportamentais e fisiológicas. Essas mudanças comportamentais e fisiológicas são componentes da Resposta de Fase Aguda (RFA). Apesar dessas mudanças acarretarem um alto custo energético, a RFA está presente em todos os vertebrados e tende a acelerar o processo de eliminação dos patógenos, além de potencializar a ativação do sistema imune adaptativo. Não obstante à sua importância clara no combate de patógenos em processos infecciosos e inflamatórios, pouco se sabe como os componentes comportamentais e fisiológicos da RFA variam ao longo do tempo após o início de uma infecção. Para entender melhor como esses componentes se comportam nas primeiras horas da infecção, o morcego-de-cauda-curta (*Carollia perspicillata*) foi utilizado como modelo deste estudo, o qual teve o sistema imune desafiado através da inoculação de lipopolissacarídeo (LPS). A temperatura e a massa corpórea (T_c e M_c) foram mensuradas 24h antes da aplicação de LPS, 24h e 48h depois, assim como também foram realizadas contagens de células brancas, a partir de amostras de sangue processadas pela técnica do esfregaço, e cálculo da frequência alimentar nos mesmos intervalos de tempo. Simultaneamente, os mesmos parâmetros foram medidos e analisados no grupo controle de morcegos injetados com solução salina (PBS). Não houve diferenças significativas de T_c em função dos tratamentos (LPS e PBS), indicando que o desenvolvimento de um estado febril não caracterizou a RFA nesta espécie. A razão de neutrófilos e linfócitos (N/L) no sangue teve um aumento substancial após a inoculação de LPS, modificação esperada dentro da RFA. Da mesma forma, observou-se uma acentuada redução na M_c e na frequência alimentar imediatamente após a inoculação com LPS. Estas alterações também eram esperadas dentro da RFA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1. Captura e manutenção dos animais.....	8
3.2. Quantificação da Massa, Temperatura Corpórea e Frequência Alimentar.....	8
3.3. Injeções de LPS e PBS.....	9
3.4. Esfregaços Sanguíneos e Contagem de Leucócitos.....	10
3.5. Manuseio e Análise dos Dados.....	10
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSSÃO.....	16
6. CONCLUSÃO.....	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. Introdução

O sistema imunológico dos vertebrados atua a partir de duas respostas: inata e adaptativa (ABBAS, 2012). Como reação à uma infecção iminente por um agente patogênico, a resposta imune inata é ativada, tratando-se da primeira linha de defesa do corpo. Durante as primeiras horas de infecção, ela é composta pela Resposta de Fase Aguda (RFA), que por sua vez é composta por elementos celulares (constitutivos) e uma cascata de respostas fisiológicas e comportamentais (BAUMANN; GAULDIE, 1994; OWEN-ASHLEY; WINGFIELD, 2007; VILJOEN et al., 2011). Essas respostas fisiológicas, como febre, mobilização de células brancas específicas no sangue e mudanças no metabolismo de energia e nutrientes, juntamente com as respostas comportamentais, como diminuição no padrão de atividade e frequência alimentar (HART, 1988; BAUMANN; GAULDIE, 1994; KLASING; LESHCHINSKY, 1999; SKOLD-CHIRIAC et al., 2015), tendem a acelerar o processo de eliminação dos patógenos e potencializar a ativação do sistema imune adaptativo (CRAY et al., 2009).

Mesmo diante da importância da atuação da RFA durante infecções, investigações recentes, principalmente em aves e mamíferos, concentram-se em avaliar mecanismos ecológicos e evolucionais, que conduzem variações nas respostas inata e adaptativa do sistema imunológico, refletindo efeitos sobre padrões de história de vida (LEE, 2006); além de outros estudos, que examinaram também as respostas fisiológicas e comportamentais do sistema imune desses animais à curto prazo (SKOLD-CHIRIAC et al., 2014; KACPRZYK, et al., 2017). Contudo, dados sobre como as respostas fisiológicas, comportamentais e imunológicas - componentes da RFA - variam ao longo do tempo, durante todo o período de infecção, ainda são escassos.

Dentre os vertebrados, os morcegos são reconhecidos como sendo animais reservatórios de uma grande diversidade de patógenos, que acometem e causam doenças em animais silvestres, domésticos e também em humanos (O'SHEA et al., 2014; MORATELLI & CALISHER, 2015). Entretanto, a RFA nos morcegos pode contribuir para o controle precoce desses patógenos, evitando possíveis ações deletérias em seus organismos (STOCKMAIER et al., 2015; KACPRZYK, et al., 2017). Tal fato pode ter influenciado a coevolução dos morcegos com essa grande gama de patógenos, que não são virulentos a eles, mas altamente deletérios à saúde de outros animais (STOCKMAIER et al., 2015). Diante disso, a análise do repertório de

respostas imunes (inatas e adaptativas) é fundamental para responder essa questão (SCHOUNTZ, 2014).

Os morcegos, apesar de compartilharem alguns aspectos básicos de seu sistema imune com outros vertebrados, apresentam diferenças qualitativas e quantitativas bem acentuadas em seu sistema imune, quando comparados a aves e demais mamíferos (BAKER et al., 2013). Para entender melhor essas diferenças, o morcego-de-cauda-curta (*Carollia perspicillata*) foi utilizado como modelo deste estudo. Indivíduos dessa espécie tiveram o sistema imune desafiado através da inoculação de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Escherichia coli*. O LPS é uma toxina presente na maior parte das bactérias gram-negativas (KENT et al., 1992), que quando injetada no animal, induz uma RFA, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, letargia e perda de peso (BONNEAUD et al., 2003; MARTIN et al., 2003; MARAIS et al., 2011). Ao desafiar o sistema imune desses animais, componentes da RFA foram testados ao longo do tempo de exposição dos animais ao patógeno.

2. Objetivos

O objetivo principal deste estudo foi testar como respostas comportamentais, fisiológicas e imunológicas, presentes na Resposta de Fase Aguda (RFA), variam ao longo das primeiras 48h de infecção controlada. Para isso, a) *temperatura corpórea* (T_c), b) *massa corpórea* (M_c), c) *frequência alimentar* e d) *razão neutrófilo-linfócito* (SKOLD-CHIRIAC et al., 2014) foram escolhidos a fim de testar a variação temporal desses parâmetros, os quais são componentes integrais da RFA. Como hipóteses, foram previstos que após a inoculação com LPS, haveria redução na frequência alimentar por parte dos morcegos, concomitante a perda de massa corpórea; além das variações na temperatura corpórea (T_c), devido ao possível quadro febril; e na contagem dos diferentes tipos de células brancas no sangue (MARAIS et al., 2011; SKOLD-CHIRIAC et al., 2015; OTAROLA-ARDILA, 2016).

3. Material e Métodos

3.1. Captura e manutenção dos animais

Morcegos machos e adultos da espécie *Carollia perspicillata* ($n = 10$) foram coletados através de redes de neblina em fragmentos florestais no entorno do município de Rio Claro – SP (autorização SISBIO 11321/1). Após a coleta, os indivíduos foram mantidos de 3 a 5 dias, alimentados *ad libitum*, em um viveiro ao ar livre (4x2x3m) para aclimatação.

Após aclimatados, os morcegos foram transferidos para uma câmara climática, onde foram mantidos em gaiolas individuais (45x45x45cm) durante a realização do experimento, para o controle da frequência alimentar (CABRERA-MARTINEZ, 2016). A câmara climática possibilitou a manutenção da temperatura ambiental (T_a) a 25°C - a qual corresponde a zona de neutralidade térmica da espécie estudada (CRUZ-NETO; JONES, 2006) -, a fim de evitar um possível viés sobre padrões de termorregulação dos morcegos, além do controle do fotoperíodo que foi ajustado para 12h noturnas (18h – 05h) e 12h diurnas (06h – 17h).

3.2. Quantificação da Massa, Temperatura Corpórea e Frequência Alimentar

Nas gaiolas individuais, a massa corpórea (M_c) foi medida duas vezes por dia (07h e 17h) por meio de uma balança de precisão (0,01g – Ohaus Precision Balance, Japão) durante o experimento. A temperatura superficial (T_s) dos morcegos foi aferida de forma indireta através de um sensor de temperatura (Sub-Cue Temperature Transmitters - Canadá) que foi colocado, com auxílio de esparadrapo e cola, na região escapular, o qual coletava uma medida de T_s a cada 20 minutos. As medidas de temperatura superficial estimam com alta precisão a temperatura corpórea (T_c) em morcegos (WILLIAMS ET AL., 2009), portanto a denominação T_c será utilizada para se referir às medidas de T_s . Esses sensores pesavam menos que 10% da massa corpórea de *C. perspicillata*, evitando interferência no comportamento alimentar e no voo desses animais. Para que fosse possível calcular a frequência alimentar durante as noites, um volume conhecido de uma mistura de suco de fruta (3,46kJ.mL⁻¹) com caseína (suplemento proteico - HIMEDIA – RM498 - USA), foi oferecido aos morcegos

dentro das gaiolas, durante o experimento às 17h. No dia seguinte, às 07h, o volume restante, do qual os morcegos não se alimentaram, foi pesado e a diferença entre o volume oferecido e o que restou ao amanhecer, representou o consumo total. Em todos os dias do experimento, um recipiente contendo um volume conhecido do mesmo alimento oferecido aos morcegos, foi colocado na câmara climática (às 17h), longe do alcance dos animais, e no dia subsequente, às 07h foi pesado com a finalidade de quantificar a taxa de evaporação de alimento, para evitar um possível viés no cálculo da frequência alimentar. Assim, a frequência alimentar é tratada nesta pesquisa por *consumo de alimento* e consumo médio ajustado pelo peso médio dos morcegos (*consumo/g*).

3.3. Injeções de LPS e PBS

O sistema imune dos morcegos do grupo experimental foi desafiado pela injeção de 50 μ L de uma solução de 1mg.mL⁻¹ (CABRERA-MARTINEZ, 2016) de lipopolissacarídeo (LPS - L2630, Sigma-Aldrich, USA) de *Escherichia coli*, diluída em solução salina de tampão fosfato (PBS - P4417, Sigma-Aldrich, USA). Os morcegos do grupo controle, foram injetados com apenas solução salina (PBS). Ambas as injeções foram subdérmicas, logo abaixo da região escapular, com seringas de precisão (Hamilton Precision Instruments, USA). A escolha de qual injeção – LPS ou PBS – os morcegos iriam receber foi de forma aleatória. Todavia, aqueles que receberam LPS em primeira instância, repetiram todos os procedimentos experimentais após novo período de aclimatação (DEMAS et al., 2011), só que desta vez sendo injetados com PBS. E aqueles que haviam recebido PBS primeiramente, foram injetados com LPS. Desta maneira, foram obtidos resultados tanto para LPS quanto para PBS nos 10 morcegos utilizados nos experimentos. Todas as injeções ocorreram no segundo dia de experimento, antes do período de atividade dos morcegos (às 17h). Assim, foi possível analisar todos os parâmetros dentro de um intervalo de tempo correspondente à 24h antes da injeção até 48h após a mesma.

3.4. Esfregaços Sanguíneos e Contagem de Leucócitos

Amostras de sangue (5 μ l) foram coletadas da veia propatagial dos morcegos, com agulha fina e capilares. Posteriormente este sangue foi fixado com álcool metílico em lâmina, pela técnica do esfregaço e por fim corado com Giemsa, em laboratório. Os esfregaços foram feitos em triplicata para cada período de amostragem de cada indivíduo, sendo eles: 24h pré-injeção, 24h e 48h após injeção. Todos realizados sempre às 17h. As lâminas foram analisadas através da contagem de 4 tipos celulares, neutrófilo, linfócito, eosinófilo e basófilo, com a objetiva de 100x e uso do óleo de imersão. As contagens foram feitas até serem totalizadas 100 leucócitos, dos quais foram calculados os números de neutrófilos e linfócitos de modo que foi possível obter a razão neutrófilo-linfócito (N/L - DAVIS et al., 2008; STOCKMAIER et al., 2015).

3.5. Manuseio e Análise dos Dados

Os períodos de 24h antes, e 24h e 48h após as injeções foram divididos em seus componentes diurnos (dados coletados entre 07h e 17h) e noturnos (dados coletados entre 17h e 07h). Assim, foram formados 6 grupos, doravante chamados de períodos: N-1 e D-1, correspondendo, respectivamente, aos períodos diurno e noturno nas 24h que antecederam a injeção; N+1 e D+1, correspondendo, respectivamente, aos períodos noturno e diurno nas 24h após a injeção; e N+2 e D+2 correspondendo, respectivamente, aos períodos noturno e diurno 48h após a injeção. Dados de T_c coletados em cada período, para cada indivíduo, e para cada tratamento (PBS ou LPS), foram calculados em relação aos seus valores médios, mínimos e máximos, sendo que estes dois últimos valores foram usados para calcular a ΔT_c .

A variação na massa corpórea também foi analisada em função desses períodos e dos tratamentos (LPS ou PBS). Neste caso, os valores coletados no início do período diurno (07h – M_c noturna) foram usados como sendo representativos da massa corpórea da noite anterior, ao passo que os valores de massa coletados ao final do período diurno (17h – M_c diurna) foram usados como sendo representativos dos valores observados durante este período. A variação na massa corpórea (ΔM_c) foi calculada pela diferença entre M_c diurna e M_c noturna para cada dia do experimento (períodos 24h antes, 24h e 48h após a injeção), em função do tratamento (LPS ou PBS).

A frequência alimentar (consumo e consumo/g) foi calculada para os períodos que correspondem a 48h e 24h antes da injeção e 24h e 48h depois da injeção. Esses valores também foram expressos em função da massa corpórea média calculada durante esses períodos. Por fim a razão N/L foi expressa em função dos 3 períodos, quando foi quantificada: 24h antes, e 24h e 48h depois da injeção. Todos os valores das variáveis resposta foram apresentados como média \pm erro-padrão. A variação nestas variáveis, em função do tratamento e período, foi testada através de uma Análise de Variância de dupla classificação com medidas repetidas (2-way ANOVA RM), acompanhada do teste *a posteriori* de Holm-Sidak para analisar, quando foram os casos, diferenças específicas entre tratamentos, períodos e interação entre essas variáveis explanatórias. Um nível α de 0,05 foi considerado para testar a significância dessas análises.

4. Resultados

As T_c oscilaram entre 26,6°C e 33,9°C e variaram entre os períodos ($p < 0,05$), com a diferença sendo significativa entre os períodos diurno e noturno 48h após a injeção (Fig. 1A). Não houve diferença significativa na T_c média em função do tratamento ($p > 0,05$) ou em função da interação entre tratamento-período ($p > 0,05$ – Tabela 1). A amplitude na variação da T_c (ΔT_c – Fig 1B) variou de forma significativa entre os períodos ($p < 0,05$), mas a significância foi somente observada no período diurno após a injeção (D+1). A variação em ΔT_c também sofreu efeito do tratamento, sendo maior em morcegos injetados com PBS ($p < 0,05$). A interação tratamento-período não foi significativa ($p > 0,05$).

A massa corpórea (M_c - Fig. 2A) não apresentou diferença significativa em função do tratamento ($p > 0,05$), mas variou entre períodos ($p < 0,001$). Todavia, essa variação em função dos períodos depende do tratamento e da interação tratamento-período ($p < 0,05$). Essa interação tratamento-período foi encontrada na noite e no dia anteriores à injeção (N+1 e D+1, respectivamente) e na segunda noite e no segundo dia após a injeção (N+2 e D+2, respectivamente). A amplitude na ΔM_c apresentou o mesmo padrão observado para M_c (Fig. 2B), não variando em função do tratamento ($p > 0,05$), mas apresentando diferença significativa em função do período ($p < 0,05$). A interação tratamento-período foi significativa ($p < 0,05$) no grupo experimental que

recebeu LPS, apresentando diferenças entre os períodos 24h e 48h após a injeção e 24h antes e 24h depois da injeção.

Tabela 1. Resultados da Análise de Variância de dupla classificação com medidas repetidas para cada variável quantitativa em relação as variáveis categóricas independentes (Tratamento, Período e Tratamento-Período). As variáveis quantitativas são: **T_c Média**: temperatura corpórea média; **Δ T_c**: diferença entre temperatura máxima e mínima; **M_c**: massa corpórea; **Δ M_c**: variação da massa corpórea; **Consumo**: consumo de alimento médio; **Consumo/g**: consumo de alimento médio ajustado pelo peso médio do morcego (g); **N/L**: razão neutrófilo-linfócito.

	Tratamento X		
	Tratamento	Período	Período
T_c Média	F _{1,102} = 2,74 (p = 0,134)	F _{5,102} = 6,66 (p < 0,001)*	F _{5,102} = 0,29 (p = 0,913)
Δ T_c	F _{1,102} = 8,73 (p = 0,016)*	F _{5,102} = 6,043 (p < 0,001)*	F _{5,102} = 0,87 (p = 0,508)
M_c	F _{1,100} = 0,0006 (p = 0,981)	F _{5,100} = 18,55 (p < 0,001)*	F _{5,100} = 4,04 (p = 0,006)*
Δ M_c	F _{1,48} = 0,75 (p = 0,406)	F _{2,48} = 4,89 (p = 0,019)*	F _{2,48} = 6,19 (p = 0,016)*
Consumo	F _{1,58} = 2,46 (p = 0,157)	F _{3,58} = 19,87 (p < 0,001)*	F _{3,58} = 3,72 (p = 0,033)*
Consumo/g	F _{1,57} = 4,56 (p = 0,065)	F _{3,57} = 19,79 (p < 0,001)*	F _{3,57} = 5,39 (p = 0,010)*
N/L	F _{1,33} = 21,68 (p < 0,001)*	F _{1,33} = 20,31 (p = 0,005)*	F _{2,33} = 13,19 (p = 0,003)*

O consumo de alimento, seja quando expresso em termos absolutos ou relativos (Fig. 3A e 3B), apresentou os mesmos padrões de variação. Esses parâmetros não variaram quando analisados exclusivamente em função do tratamento ($p > 0,05$). Todavia, houve diferença nos mesmos entre os períodos 48h e 24h antes em relação a 24h após a injeção de LPS ($p < 0,001$). A interação tratamento-período também foi significativa em ambos os parâmetros, no período de 24h logo após a injeção ($p < 0,05$).

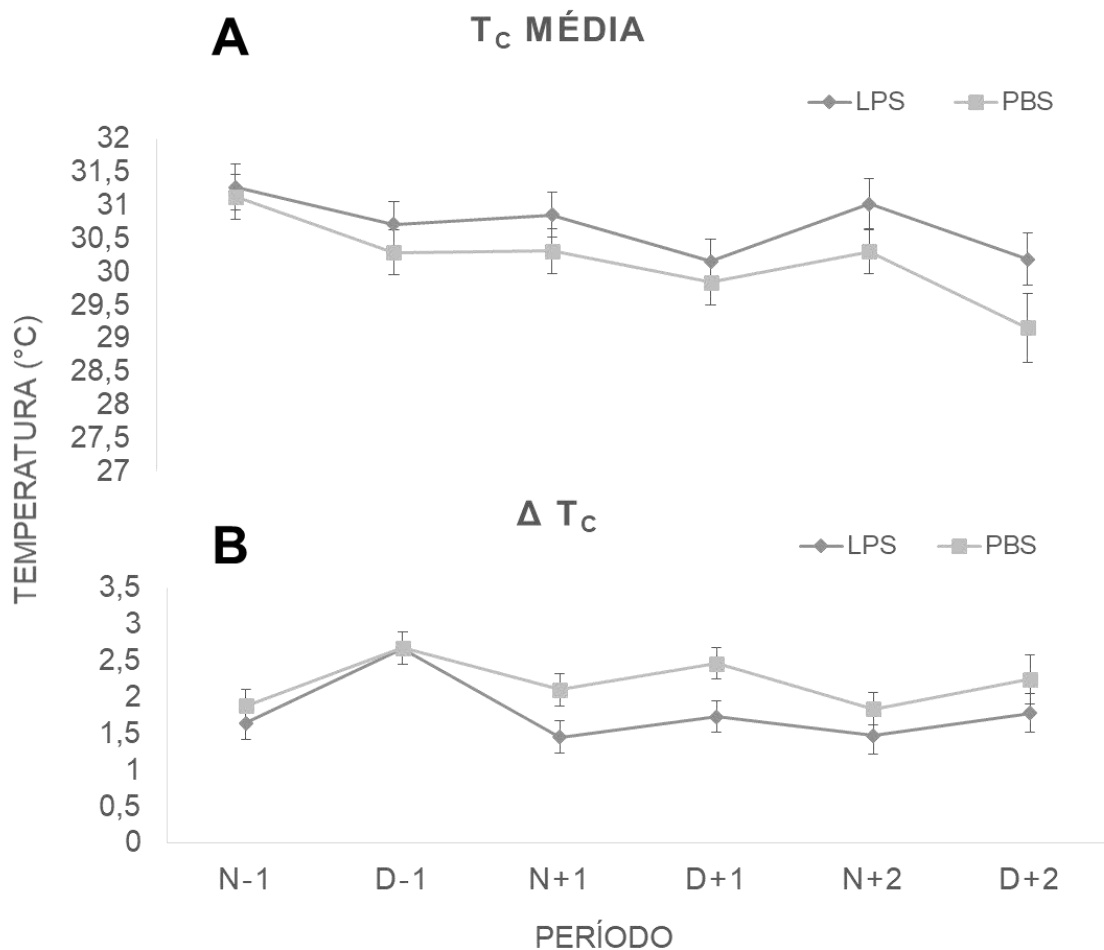


Figura 1. Temperatura corpórea média (A) e variação da temperatura corpórea (máxima – mínima - B) ao longo dos diferentes períodos do experimento, em função do tratamento (LPS ou PBS).

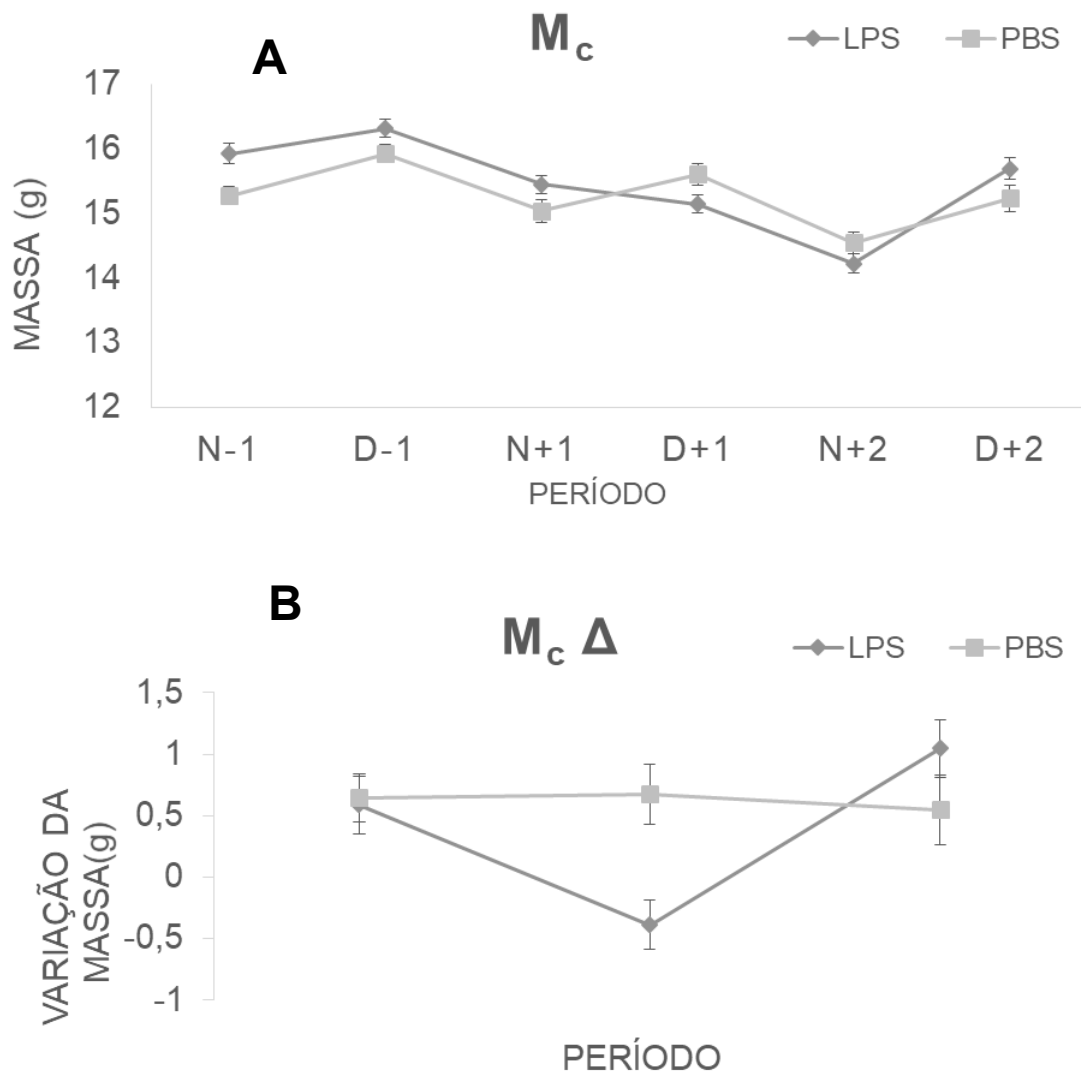


Figura 2. Massa corpórea (A) ao longo dos períodos do experimento, e função dos tratamentos (LPS ou PBS) e variação da massa corpórea (B) entre os períodos 24h antes da injeção e 48h após a injeção (LPS ou PBS).

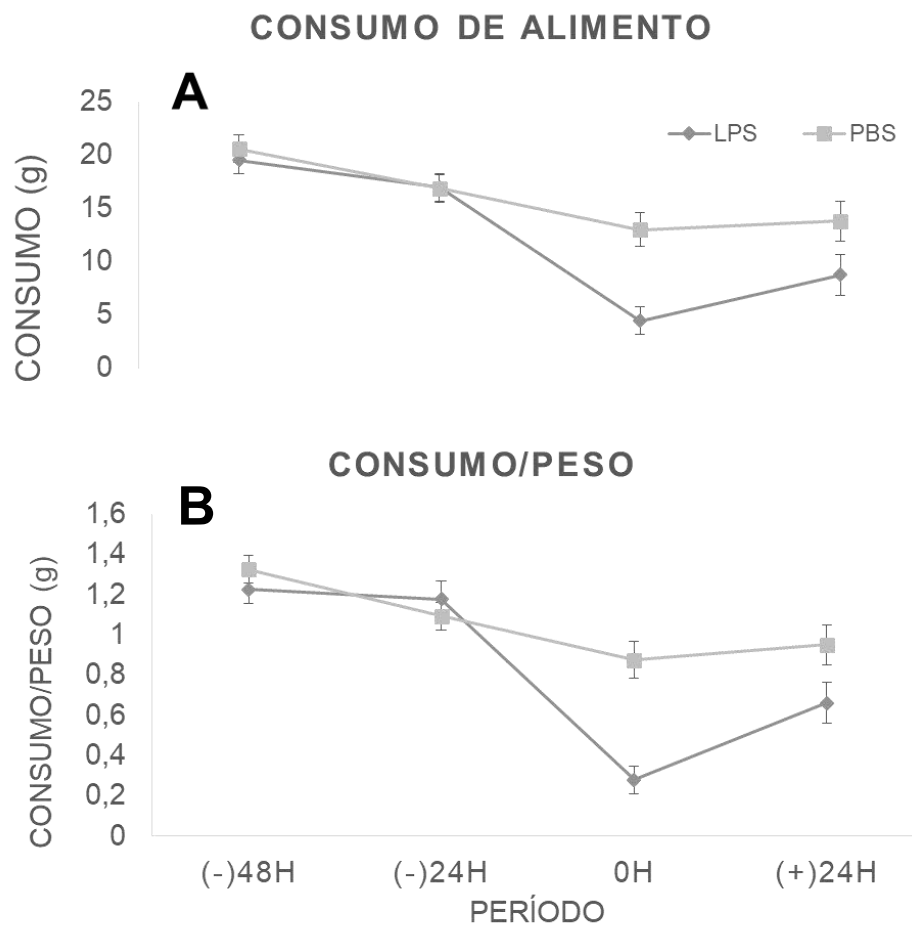


Figura 3. Consumo de alimento médio (A) nos períodos entre 48h antes e 48h depois das injeções (LPS ou PBS) e consumo de alimento médio ajustado pelo peso médio do morcego (B), em função do tratamento (LPS ou PBS).

A razão neutrófilo-linfócito (N/L – Fig. 4) apresentou diferença significativa em função do período ($p < 0,001$), entre 24h antes e após a injeção e 24h e 48h depois da injeção. Também houve diferença significativa entre os tratamentos LPS e PBS ($p < 0,05$), resultando assim em uma interação tratamento-período significativa ($p < 0,05$) em 24h após a injeção de LPS.

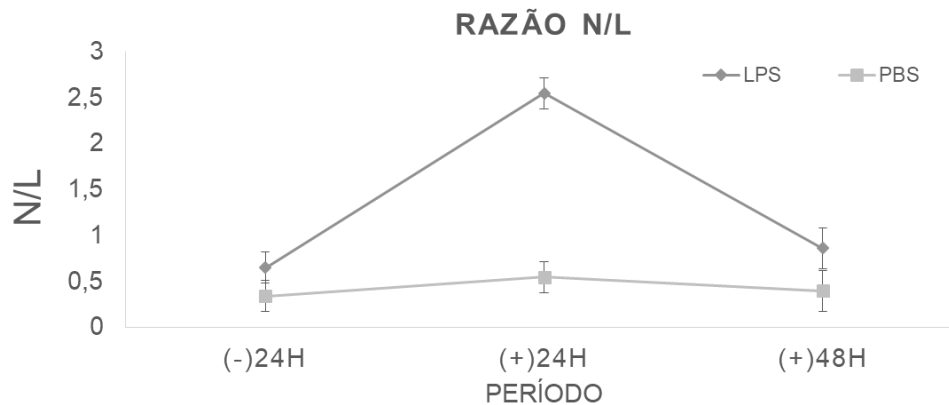


Figura 4. Razão neutrófilo-linfócito (N/L) nos períodos entre (-)24h – (+)48h em relação às injeções de LPS e PBS.

5. Discussão

A amplitude dos valores de T_c para morcegos inoculados com LPS e PBS não extrapolou as T_c máximas em nenhum dos períodos, estando sempre dentro dos limites de temperatura do ciclo circadiano da espécie. Portanto, o estado febril não caracterizou a RFA em *C. perspicillata*. Este resultado difere daqueles encontrados em outros estudos, nos quais foi observada febre em animais desafiados experimentalmente com patógenos. Esses resultados culminam em hipóteses que tratam o aumento da T_c durante a RFA, como uma adaptação fisiológica do organismo, afim de criar um ambiente desfavorável aos antígenos (BLATTEIS, 2003; OTAROLA-ARDILA, 2016).

O’Shea et al (2014) propõem a hipótese “voo-como-febre”, na qual o aumento da T_c , devido ao calor metabólico produzido durante o voo dos morcegos, seja suficiente para otimizar a atuação das respostas inata e adaptativa do sistema imune desses animais, durante uma infecção. E por este motivo, não haveria detecção de respostas febris propriamente ditas, como uma estratégia fisiológica em combate aos patógenos. Nesta presente pesquisa, o voo dos morcegos foi impossibilitado durante o período de atividade noturna, devido a metodologia utilizada, onde os morcegos foram mantidos dentro de gaiolas. A T_c máxima noturna encontrada foi 33,9°C, abaixo da T_c média de voo em *C. perspicillata*, que é 40,2°C (VOIGT et al, 2011). E mesmo assim

não houve febre nos animais desafiados com LPS. Tal resultado não dá suporte a hipótese “voo-como-febre” e sugere que a ausência de febre deve-se à algum outro motivo.

Após experimentos envolvendo aplicações de LPS em aves da espécie *Parus major*, Nord et al (2013) sugeriram que o sistema imune desses animais atuaria em sua melhor performance em temperaturas corpóreas dentro dos limites do ciclo circadiano. Ou seja, a variação diária normal da T_c de *P. major*, seria suficiente para criar um ambiente onde as respostas do sistema imune fossem otimizadas e potencializadas. A ausência de febre em *Carollia perspicillata* e também o fato de não terem sido observadas T_c fora dos limites máximos e mínimos do ciclo circadiano deste morcego - mesmo após a inoculação com LPS - sugerem que estes resultados dão suporte à hipótese de Nord et al (2013). Além do mais, a ausência de febre pode ser simplesmente explicada pela mesma não ser um componente fisiológico da RFA em *C. perspicillata*, como também é sugerido por Stockmaier et al (2015) para a espécie de morcego insetívora *Molossus molossus*, na qual também não foi encontrada febre, após ter sido inoculada com LPS.

A ativação da RFA diante de uma infecção por patógenos demanda alto custo energético (KLASING, 2004). Contudo, foi observada uma diminuição no consumo de alimento em *C. perspicillata* nas primeiras 24h após a inoculação com LPS. Essa alteração na frequência alimentar pode ser uma estratégia comportamental, a fim de evitar possíveis gastos energéticos durante o forrageio, utilizando reservas do organismo como fonte energética, durante o período de baixo consumo calórico (KLASING, 2004; OWEN-ASHELY et al., 2006; SKOLD-CHIRIAC et al., 2015). Essa demanda de uso das reserva energéticas, concomitantemente ao aumento no metabolismo energético, explica a perda de massa corpórea (M_c) após a injeção de LPS. Por outro lado, a infecção pode acarretar diminuição da frequência alimentar, com a finalidade de evitar riscos de predação durante o forrageio (OWEN-ASHLEY et al., 2006). Por fim, a restrição alimentar também pode sugerir uma estratégia de evitar o fornecimento de micronutrientes, que o patógeno possa utilizar em seu próprio benefício durante a infecção (MURRAY, 1977; HART, 1988).

A mobilização de células brancas específicas diante de uma infecção iminente, trata-se também de um dos componentes da RFA. O número de neutrófilos circulantes encontrado em *C. perspicillata* apresentou grande aumento após ser desafiado com LPS, ao mesmo tempo que o número de linfócitos mobilizados diminui. Aumentando

assim a razão de neutrófilo-linfócito (N/L) nas primeiras 24h após serem desafiados com LPS, voltando aos níveis normais após 48h. Diferente dos resultados de Stockmaier et al (2015), que não encontraram diferença alguma na razão N/L, na espécie *Molossus molossus*, após aplicação da mesma endotoxina. O aumento na quantidade de neutrófilo nas primeiras 24h, pode estar associado a sua função no organismo dos vertebrados, o qual é conhecido por fagocitar patógenos nas primeiras horas de infecção, atuando como resposta primária em combate a proliferação do antígeno (ABBAS, 2012). Além disso, o grande aumento de neutrófilos nos animais pode também ser um indicador de stress (DAVIS et al., 2008), à medida que situações estressoras externas estimulam a produção de glicocorticoides pelo fígado (cortisol, e.g.), os quais potencializam respostas do sistema imune, auxiliando indiretamente no combate aos patógenos (WILCKENS; DE RIJK, 1997; SCHNEEBERGER et al., 2013).

6. Conclusão

A Resposta de Fase Aguda tem sido bem estudada em mamíferos não voadores e em aves, mas pouco se sabe como os componentes que a compõe variam ao longo de uma infecção em espécies de morcego. Fato que é evidenciado pelas diferenças nos resultados deste estudo, para temperatura corpórea e contagem de leucócitos principalmente, comparados com dados encontrados na literatura. Sabe-se que os componentes da RFA atuam de forma distinta em espécies diferentes em Chiroptera, portanto mais estudos comparativos devem ser realizados para entender a atuação da RFA, e também como seus componentes fisiológicos e comportamentais interagem entre si ao longo do processo infeccioso. Conhecendo a interação dos componentes da RFA ao longo da infecção e como estes variam em função do tempo, também será possível entender uma ligação entre a importância da RFA com o fato dos morcegos lidarem com muitos patógenos que não são deletérios aos seus organismos, porém são capazes de causar diversas doenças em outros animais silvestres e até mesmo em humanos.

7. Referências Bibliográficas

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- BAKER, M. L.; SCHOUNTZ, T.; WANG, L. F. 2013. **Antiviral Immune Response of bats: A Review**. *Zoonoses and Public Health* 60: 104-116.
- BAUMANN, H.; J. GAULDIE. 1994. **The acute phase response**. *Immunology Today*, 15: 74–80.
- BLATTEIS, C.M. 2006. **Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management**. *Pharm. Therap.* 111:194-223.
- BONNEAUD, C.; MAZUC, J.; GONZALEZ, G.; HAUSSY, C.; CHASTEL, O.; FAIVRE, B.; ET AL. 2003. **Assessing the cost of mounting an immune response**. *Am. Nat.*; 161: 367-379. doi: 10.1086/346134 PMID: 12703483
- CABRERA-MARTINEZ, L.V. 2016. **Magnitude do custo energético a ativação do sistema imune em morcegos: Efeitos sazonais e da restrição alimentar**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia, IB, UNESP, Rio Claro.
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N.H. 2009. **Acute phase response in animals: a review**. *Comp. Med.* 59: 517-526.
- CRUZ-NETO, A.P.; JONES, K.E. 2006. **Exploring the evolution of basal metabolic rate in bats**. In **Functional Ecology of Bats**. Oxford University Press.
- DAVIS, A.K.; MANEY, D.L.; MAERZ, J.C. 2008. **The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists**. *Funct. Ecol.* 22:760-772.
- DEMAS, G.E.; ZYSLING, D. A.; BEECHLER, B.R.; MUEHLENBEIN, M.P.; FRENCH, S.S. 2011. **Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts**. *J. Anim. Ecol.* 80, 710–30.

HART, B.L. 1988. **Biological basis of the behavior of sick animals.** *Neurosci. Biobehav. Rev.* 12(2):123–37.

KACPRZYK, J.; HUGHES, G.M.; PALSSON-MCDERMOTT; EVA M.; QUINN, S.R.; PUECHMAILLE, S.J., O'NEILL, L.A.J.; TEELING, E.C. 2017. **A potent anti-inflammatory response in bat macrophages may be linked to extended longevity and viral tolerance.** *Acta Chiropterologica*, 19 (2):219-228.

KENT, S.; BLUTHÉ, R.; KELLEY, K.W.; DANTZER, R. 1992. **Sickness behavior as a new target for drug development.** *Trends Pharmacol. Sci.* 13:24-28.

KLASING, K.C.; LESHCHINSKY, T.V. 1999. **Functions, costs, and benefits of the immune system during development and growth.** *Ostrich* 69:2817–32.

KLASING K.C. 2004. **The costs of immunity.** *Acta Zool. Sinica* 50:961–969

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.

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 Biol Sci.*; 270: 153-158. doi: 10.1098/rspb.2002.2185 PMID: 12590753

MORATELLI, R.; CALISHER, C.H. 2015. **Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110: 1-22.

MURRAY, J.; MURRAY, A. 1977. **Suppression of infection by famine and its activation by refeeding-a paradox?** *Persp. Biol.* 20:471-484.

NORD, A.; SKOLD-CHIRIAC, S.; HASSELQUIST, D.; NILSSON, J.A. 2013. **Endotoxin injection attenuates rest-phase hypothermia in wintering great tits through the onset of fever.** *Funct. Ecol.* 27:236-244.

O'SHEA, T.; CRYAN, P.M.; CUNNINGHAM, A.A.; FOOKS, A.R.; HAYMAN, D.S.; LUIS, A.D.; PEEL, A.J.; PLOWRIGHT, R.K.; WOOD, J.L. 2014. **Bat flight and zoonotic viruses.** *Emer. Infect. Diseases.* 20:741-745.

OTÁLORA-ARDILA, A.; L.G. HERRERA M. J.J.; FLORES-MARTÍNEZ K.C.; WELCH JR. 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* 28;11(10):e0164938.

OWEN-ASHLEY, N.T.; WINGFIELD, J.C. 2007. **Acute phase responses of passerine birds: characterization and seasonal variation.** *J. Ornithol.* 148: 583-591. doi: 10.1007/s10336-007-0197-2.

SCHNEEBERGER, K.; CZIRJÁK, G.A.; VOIGT, C.C. 2013. **Measures of the constitutive immune system are linked to diet and roosting habits of neotropical bats.** *Plos ONE* 8(1):e54023.

SKOLD-CHIRIAC, S.; NORD, A.; TOBLER, M.; NILSSON, J.; HASSELQUIST, D. 2014. **Physiological and behavioral responses to an acute-phase response in Zebra Finches: Immediate and short-term effects.** *Phys. And Bioch. Zoology.* DOI: 10.1086/674789.

SKOLD-CHIRIAC, S.; NORD, A.; TOBLER, M.; NILSSON, J.; HASSELQUIST, D. 2015. **Body temperature changes during simulated bacterial infection in a songbird: fever at night and hypothermia during the day.** *J. of Exp. Biology.* 218: 2961-2969.

SCHOUNTZ, T. 2014. **Immunology of bats and their viruses: challenges and opportunities.** *Viruses.* 6, 4880-4901; doi:10.3390/v6124880.

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 a**

insectivorous bat. Biol Lett; 11:20150576.

VILJOEN H.; BENNETT N.C.; LUTERMANN H. 2011. **Life-history traits, but not season, affect the febrile response to a lipopolysaccharide challenge in highveld mole-rats.** J. Zool. 285: 222-229. doi: 10.1111/j.1469-7998.2011.00833.x.

WILCKENS, T.; DE RIJK, R. 1997. **Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new frontiers.** Immunol. Today. 18: 418-424.

WILLIAMS, J.B., TIELEMAN, B.I., SHOBRAK, M. 2009. **Validation of temperature-sensitive radio transmitters for measurement of body temperature in small animals.** Ardea; 97:120-124.