



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
ECOLOGÍA

**INMUNIDAD Y DEMOGRAFÍA EN MURCIÉLAGOS: PERSPECTIVAS
METODOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES SILVESTRES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

DAVID ALFONSO RIVERA RUIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS GERARDO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LUISA I. FALCÓN

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, MAYO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

OFICIO CPCB/400/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **15 de febrero de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **ECOLOGÍA** del estudiante **RIVERA RUIZ DAVID ALFONSO** con número de cuenta **519493971** con la tesis titulada **“INMUNIDAD Y DEMOGRAFÍA EN MURCIÉLAGOS: PERSPECTIVAS METODOLÓGICAS PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES SILVESTRES”**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS GERARDO HERRERA MONTALVO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS
Vocal: DR. JOSÉ JUAN FLORES MARTÍNEZ
Vocal: DRA. OSIRIS GAONA PINEDA
Vocal: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO
Secretario: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 03 de mayo de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y al Instituto de Biología por todas las oportunidades, espacios y herramientas académicas que me brindaron durante el desarrollo de esta maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM (beca de investigación IN204219 al Dr. Luis Gerardo Herrera Montalvo) por el apoyo económico que me ha permitido realizar mis estudios.

Al Dr. Luis Gerardo Herrera Montalvo por el apoyo académico que me brindo durante el transcurso de esta maestría. Específicamente por compartirme sus conocimientos sobre la fisiología de los murciélagos, y por permitirme el acceso al estudio de poblaciones silvestres en México, que han enriquecido mi experiencia como biólogo. Respecto a los miembros de mi comité de tutores, a la Dra. Luisa Falcón por los consejos ofrecidos en el diseño experimental de la toma de muestras, y en el espacio ofrecido en su laboratorio. Al Dr. Carlos Rosales por el espacio que me ofreció en su laboratorio, y por los consejos y asesorías relacionadas con el diseño de los ensayos inmunológicos. Y en términos generales, a cada uno de los tutores por su paciencia y preguntas en torno a la temática de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia por apoyarme incondicionalmente en mi decisión de estudiar en México. Especialmente a mi madre, Victoria Eugenia Rivera por su apoyo económico y emocional que me ha permitido crecer como persona.

A mis amigos, por las risas, los buenos momentos y la compañía que me han brindado.

Por último, me gustaría reitera mi agradecimiento al Dr. Luis Gerardo Herrera Montalvo porque además del apoyo académico, su buena actitud y disposición fueron un gran apoyo durante mi estancia en México.

A la estación de Biología en Chamela de la UNAM, por el espacio ofrecido para trabajar y alojarme durante mi estancia en Jalisco.

Al laboratorio de la Unidad de Genética Molecular del Instituto de Ecología por permitirme el acceso a sus instalaciones. En especial al Dr. Marco Tulio Solano, técnico encargado del laboratorio por el apoyo ofrecido respecto al uso de los equipos y las instalaciones dentro del laboratorio.

Al Dr. José Juan Flores Martínez y a Luis Omar Calva Pérez por la colaboración en el trabajo de campo que contribuyo al desarrollo de esta tesis. A la Dra. Osiris Gaona por su apoyo técnico en el laboratorio de Ecología y por ofrecerme la oportunidad de conocer los murciélagos en Álamos.

A la Universidad de Colima por facilitarme el acceso a sus instalaciones, específicamente al Dr, Enrique Alejandro Sánchez Pastor, director del laboratorio de uso común que me permitió el acceso a las instalaciones. De igual manera a la Dra Georgina Valencia Cruz y a Adriana Guadalupe Hernández Leal, encargadas del laboratorio y a la Dra Elena Margarita Castro Rodríguez por permitirme hacer uso de los congeladores

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis amigos, a mi familia, a mis tutores y a los hermosos murciélagos que habitan en México.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
Ecoinmunología	11
Demografía	12
~ <i>Edad</i>	12
~ <i>Sexo</i>	13
~ <i>Estado reproductivo</i>	13
Migración	14
Perspectivas metodológicas	16
~ <i>Acción bactericida del plasma (ABP)</i>	17
~ <i>Inmunoglobulina G (IgG)</i>	18
~ <i>Isotopos estables de carbono ($\delta^{13}C$)</i>	19
Murciélagos como organismos modelo	20
Murciélagos como reservorios de agentes infecciosos	21
Leptonycteris yerbabuena como organismo modelo.....	22
OBJETIVOS	26
ANTECEDENTES	27
Demografía e inmunidad en murciélagos	27
~ <i>Edad</i>	27
~ <i>Sexo</i>	28
~ <i>Reproducción</i>	29
~ <i>Migración e inmunidad en murciélagos</i>	29
~ <i>Leptonycteris yerbabuena</i>	30
METODOLOGÍA	31
- Cumplimiento de normas éticas	31
- Zona de muestreo	31
Captura de murciélagos	32
Colecta de muestras	32

Caracterización fenotípica y morfométrica	33
Estatus migratorio.....	34
Selección y preparación de la cepa bacteriana	34
Acción bactericida del plasma (ABP).....	35
Concentración de inmunoglobulina G (IgG)	36
Análisis estadístico.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Inmunidad en individuos inmaduros	38
~ <i>Acción bactericida del plasma (ABP)</i>	38
~ <i>Inmunoglobulina G (IgG)</i>	42
Condición corporal de las cohortes adultas	44
Migración	44
<i>Isotopos estables de carbono ($\delta^{13}C$)</i>	44
~ <i>Hembras migratorias</i>	47
Sexo.....	48
Estado reproductivo.....	50
~ <i>Machos</i>	52
<i>Acción bactericida del plasma (ABP)</i>	52
<i>Inmunoglobulina G (IgG)</i>	55
~ <i>Hembras</i>	56
~ <i>Gestación y migración</i>	57
<i>Acción bactericida del plasma (ABP)</i>	57
<i>Inmunoglobulina G (IgG)</i>	59
~ <i>Lactancia</i>	61
CONCLUSIONES.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
APÉNDICE 1.....	112
APÉNDICE 2.....	113

RESUMEN

El contexto natural que rodea la vida de especies silvestres se encuentra enmarcado por una variabilidad de factores que afectan la función inmunitaria. La compleja relación entre ambiente e inmunidad depende del estado fisiológico del individuo, por lo cual, el sistema inmune exhibe un perfil inmunitario particular que depende del sexo, la edad y el estado reproductivo. Aunque esta interacción entre inmunidad y demografía ha sido estudiada en detalle en humanos y animales modelo, existe un gran vacío de conocimiento en animales de vida silvestre, como es el caso de los murciélagos. Este grupo de mamíferos voladores presenta una serie de estrategias fisiológicas y reproductivas que le han permitido colonizar un amplio rango de nichos ecológicos. Dicha diversidad biológica de los quirópteros puede verse representada en grandes cambios metabólicos que pueden afectar la función inmunitaria, como es el caso de la evolución del vuelo. La interacción entre inmunidad y vuelo parece estar vinculada con la capacidad que tienen algunos miembros de este grupo para albergar agentes infecciosos letales para otros mamíferos. Estas singulares características de los quirópteros los convierte en organismos ideales para probar hipótesis relacionadas con el área de la ecoinmunología. Acorde con esta idea, se tomaron muestras de plasma de individuos juveniles, y adultos reproductivos activos e inactivos de ambos sexos para caracterizar el estado basal de la inmunidad humoral innata (acción bactericida del plasma, ABP) y adquirida (concentración de inmunoglobulina G, IgG). Adicionalmente, se colectaron muestras de la fase celular de la sangre de los individuos adultos para establecer las firmas isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) que presentan machos y hembras durante su ciclo fenológico, con el objetivo de identificar a los individuos migratorios y residentes de la población. Desafortunadamente no fue posible procesar las muestras en el tiempo estipulado para esta maestría debido a la emergencia sanitaria provocada por el SARS-CoV-2. Por lo cual, el objetivo de esta tesis se centra en la argumentación de una propuesta de investigación que permita caracterizar la inmunidad en diferentes cohortes demográficas de *Leptonycteris yerbabuena*. Los datos morfométricos de esta investigación indican que, durante la temporada reproductiva, tanto machos como hembras experimentan una mejora en la condición corporal. Estos datos sugieren que es poco probable que existan compromisos energéticos entre inmunidad y reproducción. Se espera que los individuos inmaduros (2 a 3 meses de vida) exhiban valores inmunitarios inferiores a los de los adultos debido al desarrollo ontogénico del sistema inmunitario y a compromisos energéticos con el crecimiento. Respecto a los adultos, las diferencias hormonales que exhiben machos y hembras deberían verse

reflejadas en una mayor ABP en los machos y una mayor concentración de IgG en las hembras. El incremento de hormonas androgénicas como la testosterona, en asociación con el riesgo de infección que experimentan los machos durante la temporada reproductiva, debería verse reflejado en un incremento de la ABP, y en un efecto nulo o negativo sobre los niveles de IgG. En el caso de las hembras, se espera que durante la gestación los niveles de IgG y la ABP se vean potenciados por el reordenamiento fisiológico de la gestación y el riesgo de infección asociado con la migración. Las hembras lactantes deberían exhibir una ABP y una concentración de IgG similar a la de cohortes en estado reproductivo inactivo, debido a que los efectos de lactancia sobre la inmunidad son temporales y únicamente pronunciados durante las etapas iniciales de la lactancia. Finalmente, se espera que los análisis de $\delta^{13}\text{C}$ de las hembras permitan identificar a las hembras migratorias de las residentes en la zona centro-oeste de México, y se espera que las hembras gestantes que fueron capturadas en la región noroeste de México exhiban valores de $\delta^{13}\text{C}$ cercanos a los de la vegetación de la región centro-oeste de México.

PALABRAS CLAVE: inmunidad humoral innata y adquirida, demografía, ecoinmunología, *Leptonycteris yerbabuena*, edad, sexo, estado reproductivo

ABSTRACT

The natural context that surrounds the life of wild species is framed by a great variability of factors that affect immune function. The complex relationship between environment and immunity depends on the physiological state of the individual, therefore, the immune system exhibits a particular immune profile that depends on the sex, age and reproductive status. Although this interaction between immunity and demography has been studied in great detail in humans and model animals, there is a large knowledge gap in wildlife, as is the case of bats. This group of flying mammals presents a wide range of physiological and reproductive strategies that have allowed them to colonize a wide range of ecological niches. This biological diversity of chiropterans can be represented in large metabolic changes that can affect immune function, as is the case with the evolution of flight. The interaction between immunity and flight seems to be related to the ability of some members of this group to harbor infectious agents that are lethal to other mammals. These unique characteristics of Chiropterans make them very interesting organisms to test hypotheses related to the area of ecoimmunology. In accordance with this idea, plasma samples were taken from juvenile individuals, and active and inactive reproductive adults of both sexes to characterize the basal state of innate humoral (plasma bactericidal action, ABP) and acquired (immunoglobulin G, IgG) immunity. Additionally, samples of the cell phase of the blood of the adult individuals were collected to establish the isotopic signatures of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) that males and females present during their phenological cycle, in order to identify migratory and resident individuals of the population. Unfortunately, it was not possible to process the samples in the time stipulated for this master's degree due to the health emergency caused by SARS-CoV-2. Therefore, the objective of this thesis is focused on the argumentation of a research proposal that allows characterizing the immunity in different demographic cohorts of *Leptonycteris yerbabuena*. Morphometric data from this research indicates that, during the reproductive season, both males and females experience an improvement in body condition. Data suggest that it is unlikely that there are energy compromises between immunity and reproduction. Immature individuals (2 to 3 months old) are expected to exhibit lower immune values than adults, due to ontogenetic development of the immune system and energy compromises with growth. With regard to adults, the hormonal differences exhibited by males and females should be reflected in a higher ABP in males and a higher concentration of IgG in females. The increase in androgenic hormones such as testosterone, in association with the risk of infection experienced by males during the reproductive season, should be reflected in an

increase in ABP, and in a null or negative effect on IgG levels. In the case of females, IgG and ABP levels are expected to be enhanced during pregnancy by the physiological rearrangement of gestation and the risk of infection associated with migration. Lactating females should exhibit an ABP and IgG concentration similar to that of cohorts in the inactive reproductive state, because the effects of lactation on immunity are temporary and only pronounced during the early stages of lactation. Finally, it is expected that the $\delta^{13}\text{C}$ analyzes of the females will allow the identification of migratory females of the residents in the central-western zone of Mexico, and it is expected that the pregnant females that were captured in the northwestern region of Mexico will exhibit $\delta^{13}\text{C}$ values close to those of the vegetation of the central-western region of Mexico.

KEY WORDS: innate and acquired humoral immunity, ecoimmunology, *Leptonycteris yerbabuena*, age, sex, reproductive stage.

INTRODUCCIÓN

Ecoinmunología

En el entorno se encuentran una serie de factores bióticos y abióticos que pueden afectar el sistema inmunitario de un individuo¹⁻³. Esta influencia del ambiente sobre la inmunidad puede alterar la capacidad de un individuo para regular la presencia de organismos comensales, parásitos y simbioses que son cruciales para su bienestar⁴⁻⁹. Estos organismos que logran colonizar el cuerpo de un animal se encuentran representados principalmente por diversas y ubicuas formas de vida microscópicas^{10,11}. La presencia de estos microorganismos (u otro tipo de organismos) y las condiciones energéticas del ambiente determinan en gran medida el estado inmune de un individuo, y podrían ser una de las causas asociadas a las variaciones temporales del sistema inmunitario^{3,8,12-15}. Estos cambios inmunológicos tienen una gran influencia sobre la historia evolutiva de una especie, debido a que tienen que coordinarse y operar en conjunto con otros rasgos de historia de vida^{3,16-21}. La relevancia de esta interacción entre el contexto ecológico y el sistema inmunitario, ha fomentado el desarrollo e interés por parte de la comunidad científica en el área de la ecoinmunología.

En vertebrados, el sistema inmune presenta un amplio arsenal de células y moléculas que tienen la capacidad de reconocer, eliminar e incluso tolerar la presencia de diversos virus y microorganismos⁷. Esta gran diversidad de funciones y componentes pueden organizarse en una estructura jerárquica compuesta de dos grandes ramas que se encuentran íntimamente ligadas entre sí: una rama innata con la cual se reconocen patrones moleculares característicos de grandes grupos de microorganismos y una rama más específica, conocida como inmunidad adquirida^{7,22}. En el contexto de la relación hospedero-parasito, la inmunidad innata brinda una rápida e inespecífica respuesta que es efectiva para contener patógenos nuevos, mientras la inmunidad adquirida es relevante en la eliminación de agentes infecciosos crónicos por su capacidad de generar memoria inmunitaria²³. Esta capacidad de reconocimiento se asocia con diversos mecanismos efectores^{7,22}, los cuales pueden incurrir en un costo (energético, de desarrollo o inmunopatológico) que afecta la supervivencia del individuo²³. Por lo tanto, el sistema inmunitario es un componente fisiológico que tiene la capacidad de regular su funcionamiento, dependiendo del riesgo de infección y el estado metabólico del individuo²³⁻²⁷.

Demografía

La gran plasticidad que exhibe el sistema inmunitario puede reflejarse en diferencias inmunitarias asociadas con la edad, el sexo, el estado reproductivo y la migración²⁸⁻³⁰. A continuación, se describe la influencia que pueden tener estos demográficos sobre el sistema inmunitario.

~ Edad

Al igual que otros componentes fisiológicos³¹, el sistema inmunitario sufre un proceso de cambio y maduración a través del tiempo^{28,32-40}. Es conocido que múltiples parámetros inmunitarios difieren entre individuos inmaduros, adultos y senescentes^{28,38}. Aunque la gran mayoría de los estudios asociados al desarrollo temporal del sistema inmunitario en mamíferos se han realizado en organismos modelo y en el ser humano, estudios realizados en especies de vida silvestre muestran que algunos fenómenos como la inmunosenescencia juegan un papel importante en la historia de vida de un individuo³⁴. Respecto a las etapas de vida temprana, la evidencia actual sugiere que la gran susceptibilidad que exhibe esta cohorte de individuos es producto del contexto ontogénico y metabólico de los individuos en desarrollo, los cuales, exhiben un fenotipo inmunológico más tolerante que el de los adultos^{28,35,38,41-48}.

La inmunidad atenuada y tolerante que presentan los individuos inmaduros puede verse representada en la baja actividad que presentan mecanismos de defensa como el complemento^{43-45,48-52} y la producción de inmunoglobulinas⁵³⁻⁵⁵. Este fenotipo inmunológico puede ser consecuencia de una inmunidad inexperta en términos de exposición antigénica⁵⁶⁻⁵⁸, el cual requiere tolerar la presencia de microorganismos simbiotes y comensales que son claves para el desarrollo normal de los individuos inmaduros⁴¹. Además de esta inmadurez inmunitaria, la alta demanda energética asociada con el crecimiento⁵⁹⁻⁶¹ podría comprometer el sistema inmunitario³, ya que la función inmune requiere de una considerable cantidad de energía y nutrientes para su funcionamiento^{4,60,62-65}. Por ejemplo, la restricción de alimento en ratones disminuye la respuesta inmunitaria frente a la hemocianina de la lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés)⁶⁶ y algunos nutrientes como el selenio⁶⁷, la vitamina E⁶⁸ y el aminoácido arginina⁶⁹ son claves para el funcionamiento de la inmunidad. Este compromiso por recursos entre inmunidad y crecimiento debería ser de especial relevancia para especies de vida silvestre, ya que la disponibilidad de alimento es limitada en un contexto natural¹⁷.

~ *Sexo*

El sexo es un factor demográfico que afecta e influye en el fenotipo inmunológico que presentan los individuos dentro de una población^{29,70-72}. En términos generales, los machos exhiben una respuesta inmunitaria inferior que las hembras, la cual se asocia con una mayor susceptibilidad a agentes infecciosos⁷³⁻⁷⁶. Esta potencia inmunitaria de las hembras puede verse reflejada en el funcionamiento de la inmunidad humoral adquirida^{73,77-80}, en la capacidad de respuesta de linfocitos^{77,81} y células presentadoras de antígeno⁸¹, y en una elevada expresión de genes pro inflamatorios y receptores tipo TLR 3, 7 y 9^{70,82} (siglas en inglés “*Toll like recognition*”). Sin embargo, vale la pena resaltar que algunos parámetros no se encuentran afectados por el sexo^{44,79,83-86}, ciertas vías inmunitarias presentan una mayor activación en los machos (ej. producción de TNF (siglas en inglés “*Tumor necrosis factor*”) en humanos en respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS)^{72,87,88}) y algunos mecanismos de la defensa humoral como el complemento se encuentran disminuidos en las hembras^{71,89}.

Estas diferencias inmunitarias pueden ser consecuencia del acervo genético particular de cada sexo⁹⁰, la expresión diferencial de genes inmunitarios^{70,82}, el perfil hormonal^{30,73,74,91,92}, y las diferencias conductuales que exhiben machos y hembras²⁹. El fenotipo inmunitario particular de cada sexo puede ser consecuencia de presiones evolutivas diferentes, las cuales, están íntimamente relacionadas con la inversión reproductiva de cada sexo y el contexto natural en el que se desarrollan⁹³. Por lo cual, es posible que este patrón de variación inmune entre sexos no sea completamente homogéneo entre especies, dada la diversidad de contextos naturales y estrategias de vida que exhiben los miembros del reino animal⁹⁴.

~ *Estado reproductivo*

Aunque existen excepciones⁹⁵⁻⁹⁹, el estado reproductivo de un individuo incurre en un reordenamiento metabólico¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ que puede afectar negativamente la función inmune^{4,21,60,105-107}. Este antagonismo entre inmunidad y reproducción ha sido evidenciado en múltiples especies de animales, desde invertebrados como insectos^{108,109} y moluscos¹¹⁰, hasta vertebrados como aves¹¹¹⁻¹²⁰, roedores¹²¹⁻¹²⁴ y reptiles^{125,126}. La disputa por recursos energéticos es una de las principales causas que se atribuyen a esta incompatibilidad entre inmunidad y reproducción^{60,64,110-112,117,118,126}, ya que el presupuesto energético de un individuo es limitado y debe distribuirse eficientemente entre múltiples rasgos de historia de vida¹. La magnitud de

este compromiso depende del estado energético de un individuo^{66,127,128}, por lo cual, se ha propuesto que esta disyuntiva energética debería influenciar el desarrollo de la historia evolutiva de especies de vida silvestre, ya que en condiciones naturales la disponibilidad de alimento es limitada¹⁷.

Además de estas restricciones energéticas, durante la temporada reproductiva ocurren cambios hormonales que pueden afectar la función inmunitaria. Por ejemplo, la testosterona es una hormona clave en el desarrollo de caracteres sexuales masculinos^{129,130}, que puede potenciar algunos parámetros inmunitarios asociados con la inmunidad innata^{131,132}, pero también puede tener un efecto inmunosupresor sobre la inmunidad humoral adquirida¹³³ y otros parámetros inmunitarios²⁹. En el caso de las hembras, durante la gestación y la lactancia ocurren cambios significativos en hormonas como el estrógeno, la progesterona y la prolactina^{134,135}, las cuales afectan la función inmunitaria¹³⁵⁻¹³⁸. Por ejemplo, el estrógeno es una hormona que puede potenciar la inmunidad humoral adquirida¹³⁹, la progesterona inhibe la producción de citosinas pro-inflamatorias en células dendríticas^{140,141} y la prolactina puede afectar la activación de los linfocitos T y B¹⁴². Finalmente, durante la reproducción ocurren una serie de cambios conductuales que pueden afectar indirectamente la función inmunitaria, debido a que estos comportamientos consumen una considerable cantidad de recursos^{105,106,111,114} y pueden incrementar el riesgo de contraer una infección¹⁴³⁻¹⁴⁵.

En conclusión, la edad, el sexo y el estado reproductivo de un individuo pueden afectar el funcionamiento del sistema inmunitario, debido a que cada uno de estos factores afectan el desarrollo del sistema inmunitario (inmaduro, maduro o senescente), el riesgo de infección y el estado metabólico (energético y hormonal) del individuo. La mayoría de la evidencia asociada con esta temática se ha limitado principalmente a un número reducido de animales como el ser humano, animales domésticos, especies de laboratorio y algunas especies de vida silvestre (principalmente aves¹⁴⁶). Por lo cual, las investigaciones en fauna de vida silvestre son escasas, dentro de la cual, los murciélagos son un grupo de mamíferos que presenta una serie de características excepcionales para estudios ecoinmunológicos¹⁴⁷.

Migración

La migración es una estrategia de desplazamiento que se caracteriza por los movimientos periódicos que realizan algunas especies (o incluso poblaciones e individuos) de animales entre dos ambientes distantes

entre sí, los cuales exhiben condiciones climáticas estacionales¹⁴⁸. Estos desplazamientos cíclicos que realizan los individuos migratorios les permite evitar condiciones ambientales desfavorables, y explotar al máximo los beneficios estacionales que ofrecen los ambientes en los que se distribuyen¹⁴⁸. Además de los beneficios, también existen costos asociados con la migración¹⁴⁹. La relación costo-beneficio de la migración está determinada por la ingesta y el gasto de energía, los beneficios reproductivos, y el escape o encuentro con depredadores, parásitos y patógenos¹⁴⁹. Por tanto, las repercusiones específicas que puede tener la migración sobre la biología de una especie, población o individuo, van a depender de los rasgos de historia de vida particular de cada especie y el contexto ecológico en el que ocurren¹⁴⁶.

La influencia de la migración sobre el sistema inmune es un tema que ha sido ampliamente estudiado en aves. El costo energético asociado con la actividad física de los movimientos migratorios puede comprometer la función inmune, ya que la demanda energética de la migración puede afectar los recursos necesarios para el funcionamiento de la inmunidad^{150,151}. Además del costo energético, el alto estrés oxidativo que se asocia con la migración^{152,153} puede alterar el funcionamiento de la inmunidad¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. En línea con esta idea, la simulación artificial del vuelo en túneles de viento del Estornino pinto (*Sturnus vulgaris*) afecta negativamente la concentración de haptoglobina, y la capacidad de lisis y aglutinación del plasma¹⁵⁸. Esta relación negativa entre inmunidad y migración también se ha observado en condiciones naturales, como es el caso de algunas especies de Zorzales (*Catharus ustulatus*, *C. fuscescens* y *Hylocichla mustelina*), las cuales presentan una reducción en la concentración basal de leucocitos durante la temporada migratoria¹⁵⁹. Similarmente, individuos migratorios del Mirlo común (*Turdus merula*) exhiben una inmunidad humoral innata (capacidad microbicida del plasma y una actividad asociada a la haptoglobina) inferior a la de individuos residentes¹⁶⁰, cuyo funcionamiento puede comprometer las defensas antioxidantes¹⁶¹. Sin embargo, hay que resaltar que este efecto negativo de la migración sobre la inmunidad no es generalizado, ya que algunos parámetros basales del sistema inmunitario no se encuentran afectados por la migración^{160,162}, o incluso pueden potenciarse durante esta temporada¹⁶².

Además de afectar los valores basales de la inmunidad, la migración también puede comprometer la respuesta inmunitaria, ya que la inducción artificial de un fenotipo premigratorio en el Zorzalito de Swainson (*Catharus ustulatus*) reduce la respuesta celular inducida por la fitohemaglutinina¹⁶³. Sin embargo, la respuesta inmune frente al lipopolisacárido bacteriano (LPS) en la Alondra común (*Alauda arvensis*) no se encuentra afectada por la temporada migratoria¹⁶⁴. En línea con la idea de que la respuesta

inmunitaria no se encuentra afectada por la actividad física de la migración, la simulación artificial del vuelo en túneles de viento no afecta la producción de anticuerpos (antígenos de la difteria y el tétano), ni el proceso inflamatorio inducido por la fitohemaglutinina en el Playero Rojizo (*Calidris canutus*)¹⁶⁵. Estos resultados ponen de manifiesto que la relación entre inmunidad y migración es compleja, y depende del parámetro inmunitario, la especie y el contexto ecológico en el que ocurren^{146,159,160,162,164,165}.

En términos generales, la mayor parte de la evidencia sugiere que la migración compromete el funcionamiento de la inmunidad, lo cual debería representar un riesgo para los individuos migratorios, ya que la migración puede incrementar el contacto con agentes infecciosos¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Para compensar estos efectos negativos de la migración, se ha propuesto que las especies migratorias presentan un acervo inmunitario más potente que las especies residentes, lo cual puede verse representado en órganos inmunitarios más desarrollados¹⁶⁹. Sin embargo, en algunos contextos específicos la migración puede disminuir el riesgo de contraer una infección¹⁷⁰⁻¹⁷³. Por tanto, no es posible generar conclusiones generales respecto a la influencia que tiene la migración sobre el riesgo de infección, ya que la relación de estos dos factores está determinada por el contexto ecológico particular de cada especie^{162,166-173}.

En línea con la evidencia reportada en aves, el único estudio realizado en mamíferos (murciélago *Pipistrellus nathusii*) muestra que la migración puede modular el funcionamiento de algunos componentes inmunitarios¹⁷⁴. Esta información pone de manifiesto que la inmunidad en mamíferos puede exhibir un funcionamiento particular durante la temporada migratoria. Para llenar este vacío de conocimiento, los murciélagos representan organismos de estudio ideales para abordar esta temática, ya que la gran diversidad biológica que exhiben los murciélagos, en asociación con su exclusiva capacidad del vuelo, han permitido que varios de sus miembros exhiban esta estrategia de desplazamiento en diferentes contextos ecológicos¹⁷⁵. Por tanto, la migración puede exponer a los individuos a diferentes cargas de microorganismos y estados metabólicos que pudiesen afectar de manera particular el funcionamiento de la inmunidad^{149,171}.

Perspectivas metodológicas

Existe un amplio repertorio de ensayos inmunológicos que no requieren de reactivos especie-específicos y que han sido utilizados con éxito en animales de vida silvestre^{20,21,176}. Este escrito se enfoca en dos

ensayos inmunológicos que permitirían caracterizar el estado de algunos componentes asociados con la inmunidad innata (acción bactericida del plasma, ABP) y adquirida (concentración total de inmunoglobulina G, IgG). Por tanto, se espera que cada uno de estos parámetros inmunitarios se encuentren afectados de manera particular por los diferentes estados metabólicos y ecológicos que caracterizan a las diferentes cohortes demográficas de *L. yerbabuena*. Por otro lado, estos dos ensayos inmunológicos representan una estrategia viable para caracterizar la inmunidad de fauna de vida silvestre, ya que estos ensayos pueden ser realizados a partir de muestras de plasma que pueden ser congeladas en el campo hasta su procesamiento en el laboratorio. Para determinar el estatus migratorio de los individuos de *L. yerbabuena* se propone el uso del análisis de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), ya que esta población migratoria de murciélagos se alimenta de plantas con firmas isotópicas contrastantes a través de su rango de distribución¹⁷⁷.

~ *Acción bactericida del plasma (ABP)*

La acción bactericida del plasma (ABP) es una técnica utilizada en estudios de ecoinmunología para medir la capacidad microbicida del componente humoral innato de un animal frente a un determinado microorganismo. Específicamente, este ensayo cuantifica principalmente la actividad antimicrobiana del complemento y de anticuerpos naturales¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. El amplio rango de especies en las que se ha realizado exitosamente este ensayo demuestra su gran potencial para caracterizar la función inmune en animales de vida silvestre. Por ejemplo, el componente humoral innato del ser humano¹⁸¹⁻¹⁸³, la salamandra de piel rugosa *Taricha granulosa* y la serpiente *Thamnophis elegans*¹⁷⁸ es incapaz de eliminar algunos tipos de bacterias Gram-positivas. Sin embargo, otras especies de animales como el caimán norteamericano *Alligator mississippiensis*¹⁷⁹ y el coyote *Canis latrans*¹⁷⁸ presentan un componente humoral capaz de eliminar bacterias Gram-positivas. En línea con la idea de la gran variabilidad taxonómica que presenta la ABP, se ha observado que la eficacia para eliminar a *Escherichia coli* varía notablemente en distintos grupos de vertebrados^{178-180,184-190}. Aunque esta evidencia sugiere que la inmunidad humoral innata de cada especie ha tomado distintos caminos evolutivos, vale la pena resaltar que existen diferencias metodológicas que impiden una comparación estricta entre estudios. Por ejemplo, la cepa específica del microorganismo, el procedimiento experimental (conteo de unidades formadoras de colonia en placas de agar o espectrofotometría) y variables intrínsecas al contexto del individuo (estado metabólico y el contexto ecológico) que usualmente no son tenidos en cuenta.

La inmunidad innata es un conservado mecanismo de defensa¹⁹¹ que tiene la capacidad de adaptarse a distintas condiciones ambientales, como el riesgo de infección y el estado metabólico del individuo^{192,193}. La medición de la ABP puede ser útil para detectar el efecto que tiene el contexto ecológico, y diferentes estrategias de vida y estados fisiológicos sobre el componente humoral innato. Por ejemplo, la ABP puede verse comprometida durante la temporada migratoria en *Turdus merula*^{160,161}, y diferentes factores antropogénicos que puedan elevar los niveles de corticosterona (estrés) en aves¹⁸⁸ y reptiles¹⁸⁷ pueden afectar negativamente este parámetro inmunitario. Sin embargo, la influencia de estos factores depende en gran medida de la especie, ya que la ABP en feliformes se encuentra íntimamente ligada con la filogenia del grupo pero no se ve influenciada por factores sociales y alimenticios¹⁸⁹. Esta discrepancia que se observa entre distintos grupos de animales sugiere que la ABP es un parámetro inmunitario que puede verse afectado solo en situaciones concretas. Esto no es de sorprender si tenemos en cuenta que el sistema inmunitario puede regular su función en base a la especie, y a distintos factores intrínsecos y extrínsecos al individuo.

~ *Inmunoglobulina G (IgG)*

La IgG es un tipo de anticuerpo que hasta el momento ha sido detectado en todas las especies de mamíferos que se han estudiado¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Esta es la clase predominante de inmunoglobulina en sangre en el ser humano¹⁹⁷, y al igual que en otros animales domésticos, se ha demostrado que tiene un papel fundamental en la protección contra agentes infecciosos^{55,84,198-201}. Aunque existen anticuerpos naturales de la clase IgG que son polireactivos y que se encuentran ligados con la inmunidad innata²⁰²⁻²⁰⁴, la producción principal de IgG se encuentra asociada con la inmunidad humoral adquirida. En animales aparentemente sanos, los niveles totales de esta inmunoglobulina presentan una variación considerable. Por ejemplo, en adultos la IgG total en humanos puede variar entre 700 y 1600mg/dl²⁰⁵, en perros entre 710 y 2100mg/dl²⁰⁶ y en vacas entre 600 y 1510mg/dl⁵⁵. Aunque es claro que los valores absolutos de estos resultados se encuentran fuertemente asociados por la metodología empleada²⁰⁷, esta información pone de manifiesto que existe una gran variabilidad intraespecífica de la IgG total en individuos aparentemente sanos. Vale la pena resaltar que estos ejemplos se enfocan en un grupo de animales que tienen acceso a una serie de comodidades artificiales que les brinda un entorno favorable.

En condiciones adversas, como en caso de desnutrición o de infección, se ha observado que los niveles de IgG totales pueden verse afectados significativamente^{200,208-210}. Por tanto, la fauna de vida silvestre debería presentar un amplio rango de variación en los niveles de IgG debido a que el contexto ecológico en el que se desarrollan naturalmente se encuentra enmarcado por una incertidumbre energética y un riesgo de infección mayor que el del ser humano y otros animales domésticos. Congruente con esta idea, especies de roedores que han sido mantenidos en cautiverio (acceso ilimitado a comida y ambientes libres de patógenos) presentan menores niveles de IgG basales que sus contrapartes silvestres²¹¹⁻²¹³. Dichas diferencias se encuentran íntimamente ligadas con el grado de exposición a agentes infecciosos²¹¹.

~ *Isotopos estables de carbono ($\delta^{13}C$)*

El tejido de un animal presenta una firma isotópica característica de carbono (relación entre ^{13}C y ^{12}C) que está determinada principalmente por su dieta²¹⁴. Esta relación isotópica entre dieta y tejido del animal permite rastrear el origen de las fuentes de carbono utilizadas para construir el tejido, por lo cual, es posible identificar el origen geográfico de los individuos de una población, si su rango de distribución exhibe un gradiente en los valores de $\delta^{13}C$ de su alimento²¹⁵. Este enfoque ha sido utilizado ampliamente por los ecólogos para rastrear los movimientos, el origen geográfico y la dieta de varias especies de animales. Por ejemplo, las firmas isotópicas de $\delta^{13}C$ en el ganso blanco (*Chen caerulescens caerulescens*) muestran la gran variabilidad individual que exhibe la dieta y los movimientos de esta especie entre algunas regiones de Estados Unidos²¹⁶. En murciélagos, esta técnica ha permitido reconstruir los patrones estacionales de la alimentación de *L. yerbabuena* a lo largo de su rango de distribución en México, gracias a la existencia de un gradiente isotópico latitudinal de las plantas de las que se alimenta. En otoño e invierno, este murciélago se alimenta de plantas que usan la vía fotosintética C_3 en el centro de México, mientras que en primavera-verano las hembras se alimentan de plantas que usan la vía fotosintética CAM en el norte de México y Suroeste de Estados Unidos¹⁷⁷. Las características fotosintéticas de las plantas C_3 y CAM se asocian con valores isotópicos de $\delta^{13}C$ característicos de cada planta, en donde las plantas C_3 presentan valores de $\delta^{13}C$ cercanos a -25‰ y las plantas CAM valores cercanos a -14‰^{177,217}. Por tanto, es posible inferir el origen geográfico de los individuos migratorios con base a la firma isotópica particular de $\delta^{13}C$ del tejido y de la fuente alimenticia a partir de la cual se construye²¹⁸⁻²²⁰. Para ello, es fundamental la selección de un tipo de tejido cuya tasa de recambio coincida con la dieta asociada a los desplazamientos geográficos de los individuos migratorios²²¹.

Murciélagos como organismos modelo

Con más de 1200 especies conocidas en el mundo, los murciélagos han logrado colonizar una amplia gama de nichos ecológicos alrededor del planeta²²². Esta ubicua distribución se encuentra asociada a un gran repertorio de estrategias de vida²²³, dentro de las cuales, el vuelo es una de las características más conspicuas. Este tipo de locomoción incurre en un costo energético y metabólico que puede afectar el funcionamiento del sistema inmunitario^{224–226}. A pesar de estas consecuencias fisiológicas, el vuelo es una estrategia de desplazamiento eficiente, la cual le ha permitido a los murciélagos viajar grandes distancias y colonizar distintos ambientes¹⁴⁷. La amplia movilidad de los murciélagos incrementa la posibilidad de entrar en contacto con diferentes tipos de microorganismos y agentes infecciosos, por lo cual, los murciélagos son considerados como vectores de amplio rango²²⁷. Además del vuelo, los murciélagos exhiben un diverso repertorio de estrategias fisiológicas y comportamentales que afectan el presupuesto energético de los individuos (ej. migración, torpor e hibernación)²²⁸. Por tanto, los quirópteros son un grupo de animales que exhiben una amplia gama de estrategias de vida, las cuales deberían afectar el funcionamiento del sistema inmunitario.

Los murciélagos poseen rasgos de historia de vida que le permiten prosperar en distintos contextos ecológicos²²³, los cuales se encuentran caracterizados por distintas condiciones bióticas y abióticas que pueden afectar la función inmunitaria. Por ejemplo, parámetros de la inmunidad innata y adquirida se relacionan con el tipo de refugio y la densidad poblacional en individuos de *Tadarida brasiliensis*²²⁹. Similarmente, parámetros constitutivos humorales de la inmunidad innata se relacionan con el grado de permanencia en el refugio, y los niveles basales de leucocitos circulantes en sangre se relacionan con la dieta en especies sintópicas de murciélagos Neotropicales²³⁰. Incluso, factores antropogénicos como la abundancia de ganado tienen un efecto significativo sobre la modulación del sistema inmunitario del murciélago hematófago *Desmodus rotundus*²⁷. Esta evidencia sugiere que la diversidad de contextos ecológicos en los que se encuentran los murciélagos, afectan de manera particular el sistema inmunitario de estos mamíferos voladores.

Las singulares características de los quirópteros los convierte en organismos ideales para probar hipótesis relacionadas con el área de la ecoinmunología, las cuales, podrían ayudar a entender cómo coexisten con agentes infecciosos que son letales para otros mamíferos^{228,231–235}.

Murciélagos como reservorios de agentes infecciosos

Aunque existen similitudes entre el sistema inmune de los murciélagos y otras especies de mamíferos²³⁶⁻²⁴¹, algunas vías y componentes exhiben un comportamiento único en los murciélagos^{242,243}. Estas diferencias inmunitarias podrían explicar cómo los murciélagos logran albergar virus de ARN letales para otros mamíferos sin exhibir síntomas de un proceso patológico^{233,244-247}. En términos generales, los murciélagos exhiben un fenotipo antiviral^{235-237,240,248} que evita una inflamación exacerbada, la cual es la principal responsable de la mortalidad en otras especies de mamíferos²⁴⁹⁻²⁵². Otros aspectos únicos de los murciélagos es la amplia expresión tisular de genes antivirales como IRF7 (Factor regulador de interferón 7) en *Pteropus alecto*²⁵³, y las diferencias inter específicas que se observan entre *P. alecto*²⁵⁴ y *Rousettus aegyptiacus*²⁴² respecto a la expresión basal de IFN- α . Esta evidencia pone de manifiesto que los murciélagos exhiben grandes diferencias inmunitarias dentro del grupo y respecto a otras especies de mamíferos.

Aunque los murciélagos son resistentes a virus de ARN, muestran una mayor susceptibilidad a virus de ADN²⁵⁵. Esta susceptibilidad puede ser una consecuencia indirecta del alto metabolismo que se asocia con el vuelo^{256,257}. Este elevado metabolismo incurre en un estrés oxidativo que favorece la liberación de ADN endógeno²⁵⁸. La liberación endógena de ADN conllevaría a una estimulación excesiva del sistema inmunitario, la cual podría comprometer el presupuesto energético de los individuos²⁵⁹ e iniciar un proceso inmunopatológico^{250,251,255}. Para mitigar estos efectos adversos del vuelo, los murciélagos han sufrido cambios en las vías de reconocimiento de ADN, las cuales comparten elementos con la inmunidad innata²²⁶, en especial las vías de control de la inflamación^{226,250,251,255}. Los cambios inmunitarios asociados con la evolución del vuelo también pueden afectar la respuesta contra otro tipo de agentes de infecciosos, ya que la inflamación es un proceso fundamental para el desarrollo de una respuesta inmunitaria en términos generales²⁶⁰. Sin embargo, existe un gran vacío de conocimiento debido a que la mayoría de investigaciones se han enfocado a estudiar la relación de los murciélagos con los virus de ARN.

Además de los virus, los murciélagos albergan otro tipo de microorganismos patógenos^{232,261-263}. Vale la pena resaltar que las estrategias inmunitarias que presentan los murciélagos para coexistir con agentes infecciosos tales como *Histoplasma capsulatum*^{264,265}, *E. coli*^{266,267}, *Lepstospira spp*²³¹, *Bartonella spp*²⁶⁸ y *Pseudogymnoascus destructans*²⁶⁹, están poco caracterizadas (excepción *P. destructans*²⁷⁰⁻²⁷²). Respecto

a la respuesta inmunitaria frente a bacterias, se ha observado que existen grandes diferencias en mecanismos conservados de la inmunidad innata. Por ejemplo, individuos de *Molossus molossus* no exhiben una respuesta pirogénica frente al LPS²⁷³, a pesar de que la fiebre es una estrategia inmunitaria conservada en otras especies de mamíferos²⁷⁴ (incluyendo otras especies de murciélagos^{275,276}). La leucocitosis es otro indicador de la activación de la fase aguda de respuesta, sin embargo *M. molossus*²⁷³ y *Artibeus lituratus*²⁷⁶ no exhiben síntomas de un proceso de leucocitosis tras el reto con LPS, contrario a lo que se observa en *Carollia perspicillata*²⁷⁷ y *Chaerephon plicatus*²⁷⁸. Esta divergencia inmunitaria, sugiere que los cambios asociados con la evolución del vuelo en murciélagos no son homogéneos dentro del grupo. Aunque la ausencia de una respuesta pirogénica en *M. molossus* puede estar fuertemente influenciada por la evolución del vuelo²⁷³, es posible que el riesgo de infección al que se encuentran expuestos los individuos tenga una gran influencia sobre los resultados observados, ya que una exposición crónica a endotoxinas puede comprometer la activación futura de la inmunidad innata^{192,279–281}.

Independientemente del agente infeccioso que se evalúe, queda claro que no es posible formular conclusiones generales sobre el sistema inmunitario de los murciélagos con base a un número limitado de especies. La evidencia colectada hasta el momento sugiere que cada especie de murciélago presenta una respuesta inmune particular, tanto para virus como para bacterias. Además, la gran variabilidad a nivel de individuo que se observa en algunas investigaciones^{27,229,271,282–284} ponen de manifiesto la influencia que pueden tener factores intrínsecos y extrínsecos al individuo, los cuales pueden estar asociados con parámetros demográficos y ecológicos.

***Leptonycteris yerbabuena* como organismo modelo**

Teniendo en cuenta la importancia evolutiva que tiene el sistema inmunitario para los murciélagos²⁸⁵, y la gran capacidad de cambio de este sistema de defensa³, en esta propuesta de investigación se propone al murciélago magueyero *Leptonycteris yerbabuena* como organismo modelo para probar hipótesis relacionadas en el área de la ecoinmunología. Esta especie de murciélago habita en cuevas y se alimenta principalmente de néctar, polen y frutos²⁸⁶. Su rango de distribución ocurre desde el sur de Arizona y Nuevo México en los Estados Unidos, hasta Honduras y El Salvador en Centro América²⁸⁶. Dentro de este rango de distribución existe una población migratoria que se distribuye desde la zona centro-oeste de México, hasta la zona norte de México y sur de Estados Unidos²⁸⁷. Esta población puede utilizar dos rutas

migratorias para viajar desde el centro de México hasta latitudes mayores: una a lo largo de la costa pacífica de México que concluye en la costa de Sonora y el sur-oeste de Arizona, y otra a través de la Sierra Madre Occidental, hasta la zona sur-centro y sur-este de Arizona, y sur-oeste de Nuevo Mexico²⁸⁸.

La población que se distribuye a lo largo de la costa pacífica de México se aparea en la región centro-oeste de México, en octubre y diciembre, justo después del arribo de hembras migratorias provenientes de la región noroeste de México y suroeste de Estados Unidos^{289,290}. Después del apareamiento, la mayor parte de las hembras abandona esta región en enero, y migra hacia el norte para tener a sus crías^{287,288,290}. Las hembras migratorias arriban a la región noroeste de México afínales de mayo y principios de abril²⁹¹, en donde forman colonias de maternidad y cuidan a sus crías durante 4 a 8 semanas²⁸⁶. Transcurrido el periodo de la lactancia, las hembras migran hacia la región centro-oeste de México, entre mediados y finales de julio²⁹¹. Aunque una parte de las hembras exhibe esta estrategia migratoria, existe evidencia de que una pequeña fracción de hembras son residentes anuales en la región centro-oeste de México^{290,292}. Por lo cual, esta población de *L. yerbabuena* se encuentra compuesta por machos y hembras residentes en la región centro-oeste de México, y hembras migratorias que se distribuyen entre la zona centro-oeste y noroeste de México. Estas particularidades demográficas, deberían verse representadas por diferentes patrones inmunitarios dentro del mismo sexo (hembras migratorias y residentes) y entre sexos (machos residentes y hembras migratorias) en esta población de murciélagos.

Los desplazamientos migratorios de las hembras coinciden con dos etapas reproductivas: la gestación y la poslactancia^{287,288,290}. Por tanto, las hembras migratorias están asumiendo el costo energético de la gestación y la migración durante su viaje al noroeste de México, y solo el de la migración cuando regresan a la zona centro-oeste. En el caso de las hembras gestantes migratorias, el costo energético de la gestación y la migración podría conducir a un compromiso inmunitario^{150,151,293}. Además del costo energético, la migración^{152,153,156} y la gestación²⁹⁴ incrementan los niveles de estrés oxidativo en los individuos, cuyos efectos podrían restringir el funcionamiento del sistema inmunitario¹⁵⁴⁻¹⁵⁷. Por otro lado, la inmunidad de las hembras poslactantes que migran hacia el centro-oeste de México a finales de verano, debería verse afectada únicamente por el costo metabólico de la migración. Además del costo fisiológico de la migración, la ocupación estacional de diferentes áreas geográficas podría exponer a los individuos migratorios a un mayor¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ o menor riesgo de infección¹⁷⁰⁻¹⁷³, el cual, podría reflejarse en el sistema inmunitario de las hembras migratorias. Por tanto, en la región centro-oeste de México se encuentra una

población mixta de hembras migratorias y residentes durante la temporada de apareamiento (octubre-diciembre), en las cuales podría evaluarse el efecto de la migración sobre la inmunidad.

La disponibilidad de alimento ha sido considerada como una de las principales razones por las cuales las hembras de *L. yerbabuena* migran para completar su ciclo reproductivo^{177,288-290,295}. La fracción de hembras residentes que permanecen en la zona centro-oeste de México^{290,292} disponen de una fuente de alimento constante a través del año, que se encuentra enmarcada por la temporada reproductiva de las plantas C₃ (principal tipo de vegetación del bosque seco tropical) durante octubre y enero, y junio y julio^{289,290,292}. Por otro lado, las regiones ubicadas en el norte de México y sur de Estados Unidos ofrecen recursos alimenticios estacionales, los cuales están representados principalmente por la floración y fructificación de cactus y agaves (plantas CAM) durante la primavera y el verano^{177,286,291,295}. Las hembras migratorias permanecen durante un periodo de 4 meses aproximadamente en la zona centro-oeste y noroeste de México, y el viaje migratorio lo realizan en una ventana de tiempo de entre 2 a 3 meses²⁸⁹⁻²⁹¹. Por lo cual, es posible rastrear el origen geográfico de los individuos residentes (machos y algunas hembras) y migratorios en base a la composición isotópica de un tejido que ofrezca una ventana de tiempo de entre 2 a 6 meses. En particular, el carbono de la fase celular de la sangre tiene una vida media de 48-78 días por lo que su análisis permitiría registrar los cambios isotópicos relacionados con los movimientos geográficos de *L. yerbabuena*^{296,297}.

Además de las diferencias intrínsecas que caracterizan a machos y a hembras en términos generales, *L. yerbabuena* exhibe una serie de rasgos particulares durante la temporada reproductiva. En particular, la formación de un parche dorsal en la zona escapular de los machos durante la temporada reproductiva^{298,299} podría tener un papel en el funcionamiento inmunológico. Este parche dorsal se encuentra repleto de microorganismos³⁰⁰, los cuales pueden estar implicados en la producción de sustancias químicas relacionadas con el cortejo³⁰⁰⁻³⁰². Dentro de esta carga de microorganismos se encuentran varios grupos bacterianos que podrían incurrir en un proceso patológico³⁰⁰, por lo cual es probable que el sistema inmune potencie su funcionamiento durante esta temporada para evitar un proceso infeccioso. En línea con esta idea, existe evidencia que sugiere que el desarrollo de este parche sebáceo en *L. yerbabuena* y *L. curasoae* pueda ser una señal indirecta del fenotipo inmunológico de los machos^{298,303,304}. Sin embargo, la actividad reproductiva de los machos no tiene ningún efecto significativo sobre la carga de ectoparásitos en *L. yerbabuena*³⁰⁵.

La diversidad biológica que presentan las cohortes demográficas de la población migratoria de *L. yerbabuena*, deberían tener una influencia sobre el sistema inmunitario. Para evidenciar el efecto de estos factores demográficos sobre la inmunidad, se tomaron muestras de plasma de esta población migratoria durante su ciclo fenológico. A partir de estas muestras se planteó un ensayo de la ABP como un indicador del estado humoral innato, y una evaluación de los niveles de IgG como una medida del componente adquirido. Para determinar el estatus migratorio de las hembras, y poder discriminar a los individuos residentes y migratorios en el centro-oeste de México, se colectaron tejidos para el análisis de isotopos estables de carbono. Desafortunadamente, la emergencia sanitaria provocada por el SARS-CoV-2 no permitió que se pudieran procesar las muestras en el tiempo estipulado para esta maestría. Por lo cual, los objetivos iniciales de esta tesis han sido modificados para proponer y discutir un modelo de investigación que permita abordar el estudio del sistema inmunitario en diferentes cohortes demográficas del murciélago *L. yerbabuena*.

Se espera que los individuos juveniles de *L. yerbabuena* exhiban una inmunidad inmadura y comprometida, la cual debería verse representada en una ABP y una concentración de IgG inferior a la de los adultos. Respecto al sexo, se plantea que los machos no reproductivos tengan una ABP mayor que la de hembras inactivas, debido a que esta cohorte de individuos podría exhibir una mayor concentración de testosterona³⁰⁶. Estas diferencias entre sexos deberían ser más pronunciadas durante la temporada reproductiva, ya que la escrotación de los machos debería incrementar los niveles de testosterona, y por ende, la actividad del complemento en los machos^{131,132}. En línea con esta idea, planteamos que los machos escrotados deberían exhibir una mayor ABP que sus congéneres inactivos. Por el contrario, los niveles de IgG deberían disminuir durante la temporada reproductiva de los machos, ya que la testosterona puede afectar negativamente la producción de anticuerpos¹³³. En el caso de las hembras, el perfil hormonal de esta cohorte de individuos debería incidir positivamente sobre los niveles de IgG³⁰⁷, por lo cual, se espera que las hembras exhiban mayores niveles de este anticuerpo en relación a los machos. Dicho incremento en los niveles de IgG debería ser más pronunciado durante el periodo de la gestación, ya que este periodo se caracteriza por un fenotipo hormonal (más estrógeno y menos testosterona) y comportamental (migración) que debería incrementar la producción de IgG. El reordenamiento fisiológico de la gestación también podría incrementar la ABP³⁰⁸, por lo cual se espera que las hembras gestantes exhiban una mayor ABP que las hembras inactivas y lactantes. Respecto a la cohorte femenina, planteamos que las hembras

migratorias en estado reproductivo inactivo deberían exhibir mayores niveles de IgG que las hembras inactivas residentes. Por el contrario, los cambios fisiológicos asociados con la lactancia no deberían afectar la ABP y los niveles de IgG. Para discriminar a individuos migratorios y residentes se usará el análisis de isotopos estables de carbono, donde se predice que los individuos migratorios tengan valores de $\delta^{13}\text{C}$ menos negativos que los de los individuos residentes.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación es generar un modelo de investigación que contribuya al entendimiento del efecto que tienen los distintos estados fenológicos de un individuo sobre el sistema inmunitario en murciélagos migratorios. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la capacidad microbiciada del plasma y determinar la concentración de IgG en el plasma de individuos adultos y juveniles de *L. yerbabuena*, para evaluar el efecto de la edad sobre el estado constitutivo humoral del sistema inmunitario innato y adquirido.
- Evaluar el efecto que tiene el sexo en individuos de *L. yerbabuena* sobre el componente humoral innato y adquirido por medio de la acción bactericida del plasma y la determinación de la concentración de IgG, respectivamente.
- Determinar la influencia del estado reproductivo en machos y hembras de *L. yerbabuena* sobre el componente humoral innato y adquirido por medio de la medición de la acción bactericida del plasma y la determinación de la concentración de IgG plasmática, respectivamente.
- Determinar el estado migratorio de las hembras en base a las firmas isotópicas de carbono que presenta la fase celular de la sangre en las hembras durante la temporada de copula en el centro-oeste de México.
- Determinar el efecto de la migración en hembras de *L. yerbabuena* sobre el componente humoral innato y adquirido por medio de la medición de la acción bactericida del plasma y la determinación de la concentración de IgG en el plasma, respectivamente.

ANTECEDENTES

Demografía e inmunidad en murciélagos

Al igual que en otros vertebrados, el funcionamiento del sistema inmune en murciélagos puede verse afectado por factores demográficos como la edad, el sexo y el estado reproductivo. Estas etapas de vida se caracterizan por comportamientos, estados metabólicos y riesgos de infección particulares que pueden afectar la inmunidad. El estado energético puede ser una de las causas que contribuyan a esta variación inmunitaria, ya que la activación del sistema inmune en murciélagos incurre en un costo energético^{275,276,309} que puede afectar el comportamiento y la movilidad del animal³¹⁰. Al igual que otros mamíferos, los murciélagos presentan un fenotipo hormonal que se relaciona con el sexo y el estado reproductivo de un individuo^{311,312}. Estas diferencias hormonales deberían verse representadas en la función inmune de individuos pertenecientes a distintas cohortes demográficas, ya que las hormonas pueden interactuar directa e indirectamente con el sistema inmunitario^{29,30,136}. Además de estos factores hormonales, los murciélagos son un grupo de mamíferos que presentan un diverso repertorio de estrategias comportamentales y ecológicas que varían en función del sexo y el estado reproductivo. En el caso de la población migratoria de *L. yerbabuena*, existe evidencia que sugiere que una gran parte de las hembras realizan desplazamientos periódicos entre la zona centro-oeste y noroeste de México, mientras que los machos y una fracción de las hembras son residentes en la zona centro-oeste²⁸⁶. Estas diferencias comportamentales entre machos y hembras podrían verse reflejados en un perfil inmunitario característico de cada sexo y estatus migratorio. Por ejemplo, en el murciélago *Pipistrellus nathusii* se observa que la migración puede afectar el estado basal del componente inmunitario celular, y la respuesta humoral frente a endotoxinas¹⁷⁴.

~ *Edad*

La edad es un factor demográfico que se encuentra relacionado con el desarrollo ontogénico de la inmunidad, en donde se ha observado que componentes inmunitarios asociados con la ABP^{43-45,48-52} y los niveles de IgG⁵³⁻⁵⁵ se encuentran atenuados durante las primeras etapas de vida. El estado del sistema inmunitario en individuos juveniles ha sido un tema poco explorado en murciélagos. Por ejemplo, se ha observado que cohortes inmaduras de *T. brasiliensis*³¹³ y *P. alecto*³¹⁴ exhiben una reducida capacidad para

producir anticuerpos, ya que los niveles de anticuerpos específicos para el virus de la rabia³¹³ y el virus Hendra³¹⁴ disminuyen radicalmente después del destete. Por otro lado, la similitud de la respuesta celular de individuos juveniles y hembras lactantes de *T. brasiliensis*, sugiere que los individuos inmaduros no presentan un compromiso inmunitario²⁸³. Sin embargo, es probable que estas hembras adultas presenten un sistema inmune comprometido por la lactancia²⁸³. Congruente con la idea de que el sistema inmune sufre cambios asociados con la edad, individuos de *Saccopteryx bilineata* exhiben un conteo leucocitario y una concentración de IgG que cambia con la edad de los individuos³¹⁵. A pesar de que esta evidencia sugiere que la edad afecta la función inmunitaria de los murciélagos, algunos componentes inmunitarios son más estables a través del tiempo, como es el caso de *S. bilineata*³¹⁵.

Congruente con la idea de que los individuos inmaduros exhiben una función inmune reducida, en murciélagos se ha observado que las cohortes adultas exhiben una menor carga de ectoparásitos que los jóvenes. Aunque diferentes factores comportamentales y ecológicos pueden afectar la carga de ectoparásitos³¹⁶⁻³²⁰, el sistema inmunitario puede combatir directamente a estos organismos³²¹. Por tanto, la carga de ectoparásitos puede estar ligada al estado inmune del individuo. En línea con la idea de una inmunidad atenuada, individuos inmaduros de *Myotis myotis*³¹⁷ y *Myotis daubentonii*^{318,319} albergan más ectoparásitos que los adultos. Dicha susceptibilidad puede ser consecuencia de una inmunidad inmadura, incapaz de equiparar las defensas inmunitarias que presentan los adultos.

~ *Sexo*

Aunque existe una cantidad considerable de estudios enfocados a caracterizar la función inmune de los murciélagos, la relación entre inmunidad y sexo en este grupo de mamíferos está poco caracterizada. Congruente con la idea de un acervo inmune particular en cada sexo, hembras de *Myotis vivesi* exhiben una respuesta celular superior a la de los machos³²². Sin embargo, la relación entre inmunidad y sexo depende del parámetro inmune que se evalué, ya que la capacidad microbicida del plasma de los machos de *M. daubentonii* es superior a la de las hembras, y otros parámetros inmunitarios como la concentración de IgG, la hemólisis y la hemaglutinación no difiere entre sexos³⁰⁶. Además de que la relación entre inmunidad y sexo depende del componente que se evalúe, es probable que dichas diferencias se encuentren fuertemente influenciadas por la especie y el contexto ecológico.

En línea con la idea de que la carga de ectoparásitos puede ser interpretada como una medida indirecta del estado inmunológico de los individuos^{301,304,321}, hembras de *Megaderma lyra*³²³ y *M. daubentonii*^{318,319} exhiben una mayor carga de ectoparásitos que los machos, lo que sugiere que pueden existir diferencias inmunológicas entre sexos. Sin embargo, en *L. yerbabuena* se observa que la relación entre el sexo y la carga de parásitos, depende del estado reproductivo y del parásito que se evalúa³⁰⁵. Por lo cual, esta evidencia sugiere que la relación entre parasitismo y sexo depende de la especie.

~ **Reproducción**

La influencia de la actividad reproductiva sobre el funcionamiento de la inmunidad, depende del parámetro inmune, el sexo y la especie que se evalúa. Por ejemplo, el componente celular inmune de hembras preñadas de *M. myotis*³¹⁷ y machos reproductivos de *M. daubentonii*³⁰⁶ se encuentra disminuido en relación a individuos no reproductivos. Aunque esta evidencia sugiere una relación antagónica entre inmunidad y reproducción, hembras en estado reproductivo de *M. daubentonii* exhiben un incremento en la concentración de IgG durante la gestación, mientras que en la lactancia la capacidad de hemólisis se encuentra potenciada respecto a las hembras inactivas³⁰⁶. En línea con la idea de que la reproducción puede afectar el funcionamiento de la inmunidad, los machos en estado reproductivo de *M. daubentonii* exhiben una carga de ectoparásitos superior a la de sus congéneres inactivos³¹⁸. Sin embargo, existe un patrón totalmente opuesto respecto a la influencia del estado reproductivo sobre la susceptibilidad a ectoparásitos en los machos de *Noctilio albiventris*³²⁴.

~ **Migración e inmunidad en murciélagos**

El gradiente latitudinal de la vegetación xerofítica ($\delta^{13}\text{C} \sim -14\text{‰}$) y del bosque seco tropical ($\delta^{13}\text{C} \sim -25\text{‰}$) a lo largo del rango de distribución de la población migratoria de *L. yerbabuena*, permitiría identificar el origen de los individuos migratorios a partir del perfil isotópico de sus tejidos¹⁷⁷. En murciélagos solo hay un estudio experimental que ha examinado la influencia de la migración sobre el sistema inmunitario¹⁷⁴. En esta investigación se encontró que los individuos migratorios del murciélago *Pipistrellus nathusii* tienen una reducción en la proporción de neutrófilos, y un incremento en los linfocitos que no se observa en los individuos premigratorios. Este efecto de la migración sobre el estado constitutivo de la inmunidad solo se observa en el componente celular, ya que los niveles de haptoglobina basales no

difieren entre las temporadas pre y migratoria. Por el contrario, la respuesta inmunitaria de los murciélagos migratorios exhibe un patrón opuesto al que se observa en condiciones basales, ya que la administración de LPS no tiene ningún efecto sobre el componente celular, mientras que los niveles de haptoglobina solo incrementan significativamente durante la temporada migratoria. Estos resultados sugieren que la migración es una estrategia de desplazamiento que puede afectar la regulación del sistema inmunitario en murciélagos.

~ *Leptonycteris yerbabuenae*

La población de *L. yerbabuenae* que se distribuye a lo largo de la costa pacífico de México se caracteriza porque los machos son residentes anuales en la zona centro-oeste de México, mientras que la mayoría de las hembras realizan desplazamientos migratorios hacia latitudes mayores^{287,289,290,295}. Los desplazamientos periódicos que realizan las hembras están íntimamente ligados con su ciclo reproductivo y con la floración y fructificación de la vegetación xerofítica. Estas diferencias comportamentales, en asociación con las particularidades metabólicas que caracterizan a machos y a hembras durante su ciclo de vida, deberían verse reflejadas en un perfil inmunitario particular de cada sexo y estadio reproductivo.

No existen estudios que hallan caracterizado directamente el efecto de la edad, el sexo y el estado reproductivo sobre el sistema inmunitario de *L. yerbabuenae*. Existe evidencia que puede estar relacionada con el estado inmunológico de los individuos ya que las hembras de la población migratoria de *L. yerbabuenae* exhiben una menor abundancia del acaro *Periglischrus paracaligus* en relación a las hembras de la población residente del sur de México³⁰⁵. Sin embargo, la abundancia del díptero *Nycterophilia coxata* no se encuentra afectada por la estrategia migratoria en las hembras³⁰⁵, lo que sugiere que el efecto de la migración sobre la carga de ectoparásitos depende de la relación específica hospedero-parásito. En línea con la idea de que los factores demográficos pueden estar asociados con la carga de ectoparásitos, machos y hembras residentes de *L. yerbabuenae* en actividad reproductiva exhiben una menor abundancia de *N. coxata* que hembras residentes en estado reproductivo inactivo³⁰⁵. Esta evidencia sugiere que es probable que la inmunidad de *L. yerbabuenae* se encuentre afectada por factores demográficos como el sexo y el estado reproductivo, y hasta el momento no hay ningún tipo de evidencia relacionada con el estado inmunitario de los individuos juveniles.

Finalmente, existe evidencia que sugiere que la población migratoria de *L. yerbabuena* exhibe un fenotipo inmunológico diferente al de la población residente, ya que la sangre de la población migratoria presenta una mayor expresión de genes claves para la regulación del sistema inmunitario³²⁵. Aunque dichas diferencias son marginales, y deben ser interpretadas con cautela, esta evidencia sugiere que la población migratoria de *L. yerbabuena* exhibe un fenotipo inmunológico más tolerante que sus contrapartes residentes, quizá como consecuencia del costo metabólico (gasto energético y estrés oxidativo) y el incremento del riesgo de infección que pudiesen estar afrontando los individuos migratorios³²⁵, o quizá, de la microbiota particular que presenta cada población³²⁶. Esta evidencia preliminar sugiere que la migración ha impactado la actividad del sistema inmunitario en *L. yerbabuena*, cuyos efectos pudiesen verse reflejados en un perfil inmune característico de las hembras migratorias y los machos y hembras residentes.

METODOLOGÍA

- Cumplimiento de normas éticas

Este proyecto se realizó con base a las recomendaciones y permisos estipulados por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental de México, dentro de la cual la Dirección General de Vida Silvestre autoriza todos los procedimientos utilizados en esta investigación (Oficio No SGPA/DGVS/8053/19).

- Zona de muestreo

Los individuos de *L. yerbabuena* se capturaron en el centro-oeste y noroeste de México durante un periodo de un año (Figura 1). Estas dos regiones representan los puntos extremos del rango de distribución de las hembras migratorias, las cuales se aparean en la zona centro-oeste de México durante los meses de octubre-diciembre y migran al noroeste de México y suroeste de EE.UU en primavera-verano para dar luz a sus crías^{288,289,295}. En la primera toma de muestras se capturaron hembras grávidas (n= 10), lactantes (n= 6) e inactivas (n= 3) en el noroeste del país, en la cueva de la Mariana, Hermosillo, Sonora (29°35'25.9"N, 110°48'8.9"O), durante mayo de 2019. A finales de junio y principios de julio de 2019 se realizó la segunda toma de muestras en la cueva de la Mariana, en donde se capturaron individuos juveniles (n=18), y hembras lactantes (n= 14), preñadas (n= 1) e inactivas (n= 4). Los 4 siguientes muestreos se realizaron

en la zona centro-oeste de México, en mayo, octubre y diciembre de 2019 y febrero de 2020. Durante estos meses se tomaron muestras de individuos pertenecientes a dos localidades diferentes: la primera localidad se encuentra ubicada en una isla cercana a la costa de Chamela (Isla de los Murciélagos), Jalisco (19°32'08.4"N, 105°05'18.8"O), mientras que la segunda cueva se encuentra ubicada en la localidad de Coquimatlan, Colima (19°09'05.8"N, 103°50'06.9"O). En la cueva de la isla se capturaron machos adultos en estado reproductivo activo (n=23) e inactivo (n=46), y hembras adultas inactivas (n=29) y lactantes (n= 2). En la cueva de Coquimatlan se capturaron machos adultos en estado reproductivo activo (n=10) e inactivo (n=10), y una hembra no reproductiva. Los resultados del número de individuos capturados se resumen en la Tabla 1 (Apéndice 1).

Captura de murciélagos

Evidencia preliminar en murciélagos sugiere que algunos parámetros inmunitarios pueden presentar fluctuaciones circadianas²⁷⁸. Por tanto, todos los individuos utilizados en esta investigación fueron capturados y procesados entre las 00:00 y las 07:00 horas. Se utilizó esta ventana de tiempo en específico para capturar individuos que hubieran tenido tiempo de realizar actividad física y consumir alimento, lo que facilita la adquisición de muestras de sangre. Para capturar a los individuos de la isla se utilizó una red de mano con una abertura de 1 m de diámetro y una longitud de 1.5 m, lo que permitía obtener un promedio de 3 murciélagos por captura. En la cueva de la Mariana se instaló una red de niebla de 6 m de largo a fuera de la cueva debido a que la topografía y la profundidad en la cual residía la colonia de *L. yerbabuena* dificultaba mucho el trabajo dentro de la cueva. Una vez capturados, los murciélagos fueron dispuestos en bolsas individuales de tela hasta su procesamiento.

Colecta de muestras

A pesar de que en algunas especies de murciélagos se ha detectado que la captura induce una rápida producción de glucocorticoides (estrés)^{327,328}, la manipulación post captura (fuente de estrés) de los individuos no tiene ningún efecto sobre la ABP^{329,330}. Sin embargo, esta evidencia se limita a un número reducido de especies, si tenemos en cuenta la diversidad taxonómica de los murciélagos. Por lo cual, se registró la ventana de tiempo entre la captura de cada individuo y la toma de muestras de sangre ($prom = 28.35 \text{ min}$, $DE = 38.25$). A cada individuo se le tomó un volumen de sangre no mayor al 1.5% del peso

del animal como se indica en la guía de la Sociedad Americana de Mastozoología³³¹. Previo a la extracción de sangre, se limpió el área de la punción con etanol al 70%, el cual se dejó evaporar antes de realizar la punción en la vena antebraquial con agujas hipodérmicas (30G x 1/2´´). Inmediatamente después de la punción, la sangre fue colectada utilizando puntas de micropipeta estériles previamente impregnadas con heparina (Inhepar®, 5000UI/ml). La sangre fue dispuesta en tubos Eppendorf impregnados con heparina para realizar la centrifugación a 6000 RPM por 4 minutos. El plasma fue colectado en criotubos y guardado en nitrógeno líquido hasta su disposición final a -80°C en el laboratorio, y la fase celular de la sangre fue guardada en tubos Eppendorf con alcohol al 96% hasta su transporte al laboratorio, en donde las muestras se guardaron a 4°C, ya que estas condiciones deberían ser suficientes para preservar la integridad de las muestras³³².

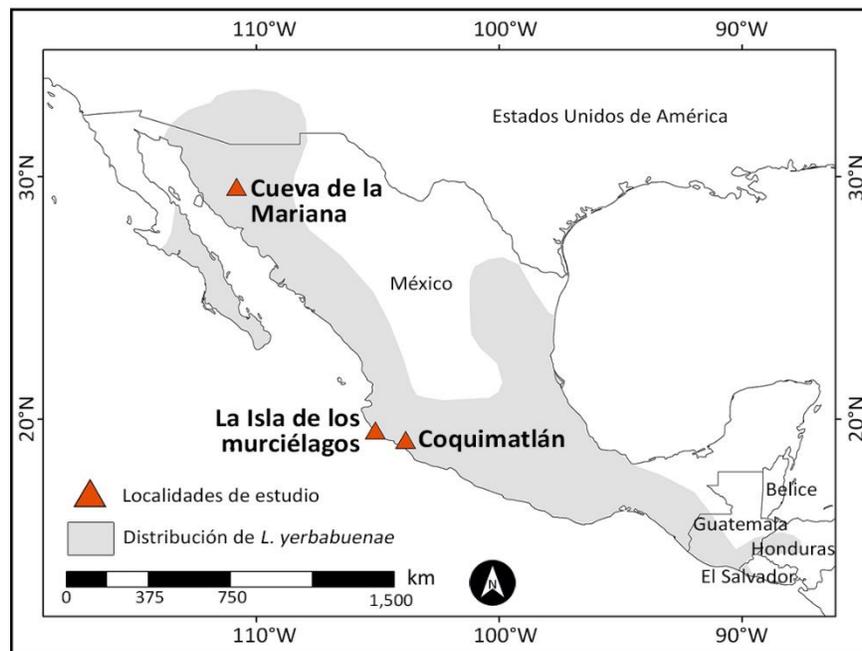


Figura 1. Mapa de distribución de *L. yerbabuena* y sitios de colecta de muestras en México durante el periodo 2019-2020. El rango de distribución está basado en el mapa de distribución propuesto por la IUCN-2016.

Caracterización fenotípica y morfométrica

Después de tomar las muestras de sangre, se procedió a realizar la caracterización de cada individuo en base al sexo, la edad (adulto o juvenil) y el estado reproductivo. La edad de los individuos fue estimada

en base al grado de osificación de la sutura epifalangeal, el peso y la coloración del pelaje³³³. El estado reproductivo de los machos fue caracterizado en base a la escrotación de los testículos (N= 33), que en algunos de los casos se asocia con la presencia de un parche dorsal en la zona escapular (N = 10), el cual se ha propuesto que se encuentra implicado en la selección sexual^{298,299}. El estado reproductivo de las hembras se determinó en base a los estadios de gestación (palpación abdominal) y lactancia (pezón descubierto de pelo que produce leche al ser presionado). Adicionalmente, se tomaron medidas del peso y del antebrazo de los individuos utilizando una balanza digital (Ohaus, Nueva Jersey, USA, 0.1 g) y un calibrador digital (Mitutoyo, Japón, 0.01mm). En donde se calculó el índice de condición corporal (ICC) en base a la relación del peso y el antebrazo de los individuos^{334,335}.

Estatus migratorio

Para determinar el estatus migratorio de las hembras, se analizará la composición isotópica de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) a partir de las muestras de la fase celular de la sangre en los individuos de la población migratoria de *L. yerbabuena*. Cada muestra será secada y pulverizada por medio de un mortero, en donde se pesará 1 mg de cada muestra para ser analizada en un espectrómetro de masas atómicas en la Universidad de California en Davis, EUA. Los resultados del análisis se expresarán como $\delta^{13}\text{C}$ (‰). En el área cercana a la Isla de los Murciélagos, en la región centro-oeste de México, predomina la vegetación de bosque seco tropical, la cual se encuentra caracterizada principalmente por plantas que realizan la fotosíntesis vía C_3 ($\delta^{13}\text{C} \sim -25\text{‰}$). Por el contrario, en la cueva de la Mariana, en la región noroeste de México, predomina un tipo de vegetación xerofítica caracterizada por una gran abundancia de plantas CAM ($\delta^{13}\text{C} \sim -14\text{‰}$). Esta contrastante abundancia, respecto al tipo de vegetación que predomina en los extremos del rango de distribución de la población migratoria de *L. yerbabuena* permitiría establecer la fuente alimenticia a partir de la cual se construyó el tejido en los murciélagos^{177,214,336}. A partir de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de la fase celular de la sangre, se identificará el origen de las hembras migratorias presentes en la Isla de los Murciélagos y a la cueva de la Mariana.

Selección y preparación de la cepa bacteriana

Se utilizó a *E. coli* como microorganismo modelo para caracterizar la capacidad microbicida del plasma de *L. yerbabuena*. Esta bacteria Gram-negativa es parte de la microbiota intestinal de los mamíferos, y

en algunas situaciones específicas puede inducir un proceso patológico en el hospedero³³⁷. Este microorganismo también coexiste con los murciélagos^{267,338,339}, y varias cepas patogénicas han sido identificadas en este grupo²⁶⁶. Por tanto, existe la posibilidad de que este microorganismo pueda incurrir en un proceso patogénico natural en *L. yerbabuena*. Adicionalmente, *E. coli* es un modelo experimental ampliamente utilizado en el campo de la ecoinmunología^{178,179,185,187,189,190}, lo que brinda la posibilidad de contrastar los resultados con otras investigaciones en murciélagos^{230,271,306,322,329}. Finalmente, la susceptibilidad de este microorganismo a la acción del complemento^{179,180,271} y los anticuerpos naturales¹⁸⁰ es otra de las razones por las cuales se ha utilizado. Específicamente se utilizó una cepa liofilizada de *E. coli* (ATCC No 8739, Microbiologics), la cual se cultivó durante 24 horas a 37°C en caldo nutritivo (Sigma-Aldrich, Nutrient Broth No. 4) para su activación. Este cultivo saturado de bacterias se mezcló en proporciones iguales con glicerol (Sigma-Aldrich) y se dispuso en varias alícuotas que fueron guardadas a -80°C hasta los experimentos.

Acción bactericida del plasma (ABP)

La actividad bactericida del plasma es una medida funcional de la capacidad microbicida del componente humoral de la sangre para eliminar un determinado microorganismo^{179,180,185,271}. Esta simple pero informativa técnica permite evaluar el estado basal del componente inmune humoral de un animal en diferentes contextos ecológicos. El protocolo experimental que se propone en esta tesis se basa en Liebl³⁴⁰ y French¹⁷⁸, con algunas ligeras modificaciones. Se realizarían tres diluciones seriales (1/10, 1/20 y 1/40) de plasma utilizando una solución buffer de fosfato 1X (PBS, Sigma Aldrich) como disolvente. La primera dilución (1/10) se debe preparar utilizando un volumen de 7 µL de plasma en 63 µL de PBS. A partir de esta primera dilución se realizarían dos diluciones seriales de plasma (1/20 y 1/40) utilizando PBS como disolvente.

Después de diluir el plasma a las concentraciones previamente mencionadas (1/10, 1/20 y 1/40), se dispondrían 10 µL de cada dilución en una microplaca de 96 pozos por triplicado (Corning 3596, Kennebunk, ME, USA). A cada uno de los pozos con plasma, se le adicionaría un volumen de 5 µL de una suspensión bacteriana que presente una concentración de 10⁵ bacterias/ml (Apéndice 2). Esta mezcla inicial de plasma con bacterias se incubaría durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo se adicionaría un volumen de 250 µL de caldo nutritivo a cada uno de los pozos experimentales, y se

procedería a medir la absorbancia a 300 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Epoch, Biotek). Esta lectura de la absorbancia inicial se contrastaría con la absorbancia registrada después de 12 horas de incubación (absorbancia final) a 37°C (Tiempo en el cual, el crecimiento bacteriano alcanza la fase máxima de crecimiento logarítmico). A la par con las muestras experimentales se realizaría un control negativo (10 µl de PBS + 255 µl de caldo nutritivo) y dos controles positivos (10 µl de PBS + 250 µl de caldo nutritivo + 5 µl de la suspensión bacteriana 1 x10⁵ bacterias/ml) para calcular el efecto del plasma sobre el crecimiento microbiano por medio de la siguiente formula:

$$ABP = 1 - \left(\frac{(absorbancia\ final - absorbancia\ inicial)\ muestra}{(absorbancia\ final - absorbancia\ inicial)\ control\ positivo} \right) * 100\%$$

Concentración de inmunoglobulina G (IgG)

Como una medida del estado constitutivo humoral de la inmunidad adquirida, se determinaría la concentración total de IgG en el plasma sanguíneo de los murciélagos. Este es el principal tipo de inmunoglobulina que circula en la gran mayoría de mamíferos que se han estudiado, cuya presencia ha sido detectada en todas las especies de mamíferos que se han evaluado hasta el momento^{194,195}. Para determinar la dilución óptima de plasma se realizaría una prueba piloto con 10 muestras de individuos, las cuales serían diluidas en serie con una solución de 0.1M de NaHCO₃ a pH de 9.6. La primera dilución se realizaría mezclando 2 µL de plasma con 998 µL de NaHCO₃ en microplacas de 96 pozos (Corning 3596, Kennebunk, ME, USA). A partir de esta primera dilución se realizarían 7 diluciones seriadas dobles para alcanzar una dilución final de 1:64000.

Una vez concluidas las diluciones seriales, se procedería a cubrir y a incubar la placa durante 1 hora a 37°C, y luego a 4°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo de incubación, se añadirían 100 µL de albumina sérica bovina (BSA, al 1% diluido en PBS) a todos los pozos. Esta reacción se incubaría durante 2 horas a temperatura ambiente (25°C). Después, la placa se lavaría dos veces con PBS-Tween-20 al 0.05%, y luego se añadirían 50 µL del anticuerpo anti-IgG de murciélagos (“*Goat polyclonal anti-bat IgG conjugate with HRP*”, Novus Biologicals, NB7238) a una dilución de 1/10000 partes de PBS-Tween-20 al 0.05%. La placa se incubaría durante 2 horas a 25°C, y luego se realizarían cuatro lavados con PBS-Tween-20 al 0.05% previo a la adición de 50µL de solución reveladora (SIGMAFAST OPD, Sigma

Aldrich). Finalmente, se añadirían 100 μL de H_2SO_4 al 0.1% al momento de observar un cambio en la coloración, para posteriormente medir la absorbancia a 405nm en un lector de microplacas (Epoch, Biotek).

A partir de esta prueba piloto se obtendrían las absorbancias individuales de 10 muestras de plasma a través de un rango de diluciones seriales que varían desde 1:500 hasta 1:64000. Las absorbancias de todos los individuos a una dilución determinada se promediarían para construir una curva general de absorbancia promedio en función de la dilución de plasma, con la cual se seleccionaría la dilución óptima en base a aquella dilución que presentase la pendiente más pronunciada. A partir de esta dilución se procesarían todas las muestras de plasma para realizar los análisis de la concentración de IgG en murciélagos.

Análisis estadístico

Los datos morfométricos del peso (g), el antebrazo (mm) y el índice de condición corporal (g/mm) fueron evaluados estadísticamente entre los individuos pertenecientes a distintas cohortes demográficas. La evaluación estadística de estos factores permite comprobar la influencia que tienen los cambios metabólicos y ambientales sobre el estado energético de los individuos^{334,335}. Estos cambios en la condición corporal del individuo son de gran importancia para soportar las hipótesis que se mencionan y argumentan en la sección de resultados y discusión. Los individuos juveniles se compararon únicamente con los adultos reproductivamente inactivos, ya que el factor reproductivo en la cohorte inmadura no tiene ningún significado biológico. Respecto a los adultos, las hembras preñadas no fueron tenidas en cuenta en el análisis debido al peso extra del embrión en la madre. Con base al comportamiento de los datos en ambos grupos (validación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas), se realizó una prueba de muestras independientes de t-Student para comparar el peso y el antebrazo de las cohortes juveniles y adultas. Por el contrario, las cohortes adultas se evaluaron por medio de una prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la masa corporal y el ICC, y una prueba exacta de suma de rangos de Wilcoxon (análisis *post hoc*) para determinar las interacciones significativas entre los grupos. Los análisis se evaluaron con un valor alfa de 0.05 utilizando el software estadístico R versión 1.3.1093³⁴¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha mencionado previamente, el objetivo de esta tesis se centra en el planteamiento de una estrategia metodológica que permita caracterizar el funcionamiento del sistema inmunitario en diferentes cohortes demográficas de la población migratoria de *L. yerbabuena* que se distribuye a lo largo de la costa pacífica de México. La discusión pretende plantear y argumentar los posibles resultados que se obtendrían con la estrategia experimental propuesta. Por último, vale la pena recordar que no fue posible procesar las muestras colectadas debido a la emergencia sanitaria provocada por el SARS-CoV-2.

Inmunidad en individuos inmaduros

Congruente con la información fenológica de la población migratoria de *L. yerbabuena*^{290,291}, a inicios de mayo se capturaron exclusivamente hembras preñadas y lactantes en la zona noroeste de México (cueva de la Mariana, Hermosillo, Sonora). A principios de julio se capturaron individuos juveniles y hembras poslactantes en esta misma localidad (Tabla 1), lo que nos permite estimar que estos individuos juveniles deberían presentar una edad de entre dos a tres meses de vida. Estos individuos juveniles deberían presentar una función inmune atenuada respecto a cohortes adultas, la cual podría verse reflejada en la ABP y la concentración de IgG en la sangre. Congruente con la idea de que estos individuos juveniles deberían estar en una etapa de crecimiento, la masa corporal de los individuos inmaduros (*media* = 22 g, *DE* = 1.44) es menor que la de los adultos (*media* = 23.36 g, *DE* = 3.37) no reproductivos ($t(158)=3.12$; $P=0.00216$). Por el contrario, la longitud del antebrazo de los individuos inmaduros (*media* = 53.3 mm, *DE* = 1.31) y los adultos (*media* = 53.75 mm, *DE* = 1.28) no exhiben diferencias significativas ($t(149)=1.25$; $P=0.2126$).

~ *Acción bactericida del plasma (ABP)*

La ABP frente a *E. coli* es un ensayo inmunológico que cuantifica la capacidad microbicida del componente humoral innato de la sangre. Específicamente, se ha propuesto que la actividad del complemento y la presencia de anticuerpos naturales son los principales responsables en la eliminación de *E. coli*¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Durante la infancia, varios componentes del complemento^{43-45,47-52} y moléculas asociadas a su activación (MBL)^{342,343} se encuentran reducidas. La precariedad del sistema del complemento puede

ser consecuencia de una función hepática inmadura³⁴⁴⁻³⁴⁶. Esta deficiencia inmunitaria también se observa en la producción de anticuerpos en infantes^{46,347}, y otras especies de vida silvestre como el bisonte europeo⁸⁵ y la foca de puerto³⁴⁸. Aunque es probable que el rápido desarrollo corporal que exhibe *L. yerbabuena*³⁴⁹ pueda verse representado en la función inmunitaria, lo más probable es que esta etapa de crecimiento comprometa el desarrollo inmunitario. Esta es una paradoja similar a la que experimentan animales con una gran capacidad cerebral como los primates³⁵⁰. Por ende, los individuos juveniles de *L. yerbabuena* que se muestrearon en esta investigación (2 a 3 meses de vida) deberían exhibir una inmunidad inmadura, incapaz de equiparar la función humoral innata de los adultos (Figura 2).

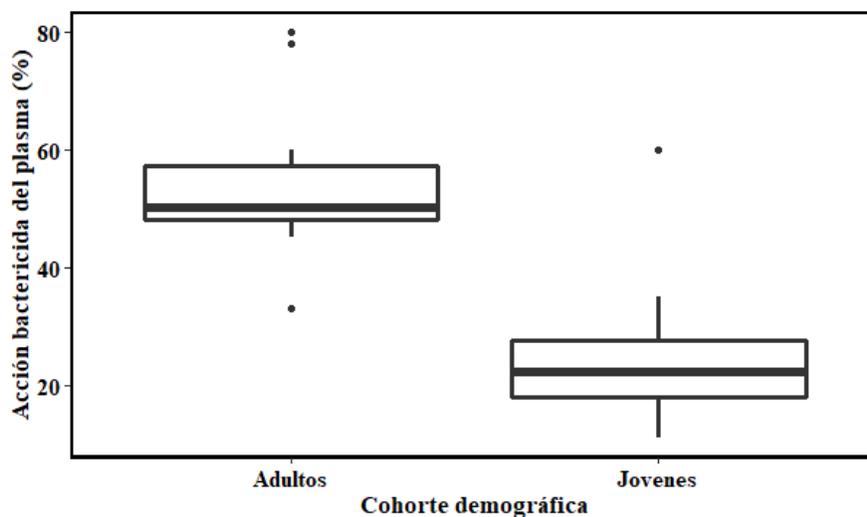


Figura 2. Acción bactericida hipotética del plasma (ABP) en individuos juveniles y adultos no reproductivos en la población migratoria de *L. yerbabuena* en México.

En murciélagos, la única investigación asociada a caracterizar el desarrollo ontogénico del sistema inmunitario se ha realizado en *S. bilineata*, en donde se observa que aunque la concentración de IgG se relaciona positivamente con la edad, la ABP no muestra ninguna tendencia³¹⁵. Esta aparente discrepancia puede ser consecuencia de que los individuos clasificados como juveniles, presentan un amplio rango de edad (menores a 1 año), en donde es probable que se encuentren individuos inmaduros y maduros, ya que existe evidencia de que *S. bilineata* alcanza la madurez en un periodo menor a 1 año^{351,352}. De hecho, al explorar visualmente los datos se observa que dentro de la cohorte juvenil se encuentra un grupo de individuos con valores bajos de ABP (probablemente individuos realmente inmaduros), que no se observa en otros grupos etarios³¹⁵. Por el contrario, las muestras colectadas de individuos juveniles de *L.*

yerbabuena deberían presentar un menor rango de edad (2 a 3 meses), el cual debería estar representado exclusivamente por individuos inmaduros.

La existencia de un compromiso energético entre inmunidad y crecimiento, es otro factor que permite soportar la idea de que los individuos inmaduros deberían exhibir una ABP reducida. Durante esta etapa de vida, los individuos inmaduros exhiben un fenotipo anabólico que requiere de una considerable cantidad de recursos³⁵³. El costo de esta demanda energética puede verse evidenciado en la relación sinérgica y bidireccional que mantienen factores como la desnutrición y la infección sobre el crecimiento en infantes³⁵⁴. El compromiso energético entre inmunidad y crecimiento debería ser pronunciado en *L. yerbabuena*, ya que esta especie adquiere la capacidad de vuelo durante los primeros 20 a 30 días de vida³⁴⁹. Este rápido crecimiento corporal debería incurrir en una alta demanda energética y nutricional, que pudiese retrasar el desarrollo del sistema inmunitario. Por lo cual, es probable que además de la inmadurez del sistema inmunitario, exista un compromiso de recursos entre inmunidad y crecimiento.

En línea con la idea de que los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* deberían presentar una ABP inferior a la de los adultos, en humanos se ha establecido que la inmadurez inmunitaria es una de las principales razones por las cuales los infantes tienen una mayor mortalidad y morbilidad que los adultos frente a agentes infecciosos²⁸. Por tanto, el grado de susceptibilidad a parásitos puede ser considerado como una evidencia indirecta del estado inmunitario de un individuo. En murciélagos, se ha observado que los individuos inmaduros son más susceptibles a ectoparásitos, como es el caso de *M. daubentonii*^{318,319} y *M. myotis*³¹⁷. Es probable que esta susceptibilidad a ectoparásitos pueda verse reflejada en la ABP, ya que los niveles de parasitismo en *T. brasiliensis* pueden estar ligados con la ABP²²⁹. Por tanto, existe evidencia indirecta en murciélagos que indica que los individuos juveniles pueden presentar una inmunidad comprometida, la cual pudiese verse reflejada en la ABP.

Aunque la evidencia reportada hasta el momento permite plantear que los individuos juveniles de *L. yerbabuena* deberían presentar una inmunidad humoral innata reducida, hay que tener en cuenta la historia de vida de esta especie y las implicaciones que tendría una inmunidad reducida para los individuos juveniles. Al igual que otras especies de murciélagos cavernícolas, las hembras dan a luz a sus crías en cuevas²⁸⁶, las cuales, brindan un microclima ideal para la homeostasis de algunas especies de murciélagos^{228,355}. Sin embargo, estos ambientes se encuentran repletos de excrementos de murciélagos,

los cuales albergan virus y microorganismos potencialmente infecciosos³⁵⁶⁻³⁵⁸. En este caso particular, los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* que fueron capturados en la cueva de la Mariana habitan con otras 6 especies de murciélagos³⁵⁹. Por tanto, las cuevas ocupadas por los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* deberían representar un desafío para el sistema inmunitario de sus ocupantes, en especial para los individuos inmaduros, ya que la probabilidad de infección debería ser mucho mayor que la de los adultos.

Habitar en una cueva implica estar expuesto a un constante riesgo de infección, por lo cual, es pertinente tener en cuenta que es probable que estos individuos inmaduros logren un rápido desarrollo del sistema inmunitario. Este hecho podría ser soportado en caso de que la ABP de los individuos inmaduros presenten valores similares a la de los adultos, lo cual, sugeriría que los juveniles de *L. yerbabuena* exhiben un rápido desarrollo de la inmunidad humoral innata, quizá, como consecuencia del entorno donde habitan. Sin embargo, lo más probable es que se registre una ABP inferior en los individuos inmaduros, debido a que además de los factores previamente mencionados (inmadurez inmunitaria y compromisos energéticos), la inmunopatología es otro factor a tener en cuenta. Las consecuencias de sufrir un proceso inmunopatológico en individuos inmaduros, ha sido considerado como uno de los factores que subyacen a la gran tolerancia que exhibe el sistema inmune de los infantes^{28,41,360,361}. Este hecho puede ser de especial relevancia para los juveniles de *L. yerbabuena*, ya que esta cohorte de individuos se desarrolla en un entorno repleto de antígenos y microorganismos, los cuales, podrían conducir a una activación crónica y desmesurada de la inmunidad que conllevaría a un proceso inmunopatológico.

Independientemente de los resultados, es claro que las crías de *L. yerbabuena* logran sobrevivir en estos entornos agrestes para el sistema inmunitario. Por lo cual, los individuos juveniles deberían exhibir una estrategia inmunitaria que les permita controlar la incidencia de un proceso infeccioso e inmunopatológico. Es posible que la inmunidad transferida por la madre vía placenta o leche materna sea de suma importancia para la homeostasis inmunológica de los individuos inmaduros^{313,314}. Incluso, es probable que otros componentes inmunitarios tengan una mayor relevancia para enfrentar adecuadamente el entorno antigénico donde se desarrollan los individuos inmaduros de *L. yerbabuena*.

~ *Inmunoglobulina G (IgG)*

Al igual que la inmunidad innata, la inmunidad adquirida sufre cambios temporales durante la vida de un individuo. La transición de inmaduro a adulto se caracteriza por un rápido crecimiento corporal que puede limitar el desarrollo del sistema inmunitario², en especial el adquirido, ya que la generación de defensas específicas tiene un alto costo de desarrollo²³. Acorde con esta idea, en humanos se ha observado que la transferencia de IgG de la madre al neonato es fundamental para su desarrollo durante los primeros meses de vida³⁶²⁻³⁶⁴. Esta inmunidad transferida se ve reflejada en altos niveles de IgG durante los primeras semanas de vida^{46,53,365}. Transcurrido este tiempo, se observa que los niveles de IgG disminuyen radicalmente, e incrementan progresivamente con el transcurso del tiempo hasta la adultez^{53,54,365}. Al igual que en el ser humano, otras especies de mamíferos también presentan niveles reducidos de IgG durante los primeros meses de vida^{55,84,85,348,366,367}. El cambio cronológico que se asocia con la concentración de IgG sugiere que, durante las primeras etapas de vida, los individuos inmaduros no tienen la capacidad de mantener una producción de IgG como las cohortes adultas. Este hecho podría verse reflejado en las cohortes maduras e inmaduras de *L. yerbabuena*, en donde es probable que los individuos inmaduros exhiban una concentración de IgG menor que los adultos (Figura 3).

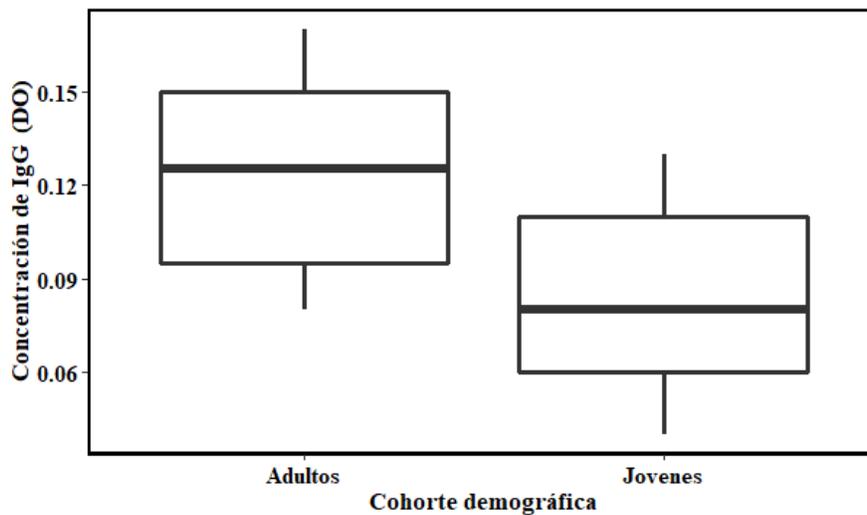


Figura 3. Concentración hipotética de IgG en individuos adultos y juveniles de la población migratoria de *L. yerbabuena* en México.

La reducida producción de inmunoglobulina G en los individuos inmaduros es producto del desarrollo ontogénico que sufren las células B en el ser humano³⁶⁸. La principal fuente de IgG en el ser humano

proviene de un grupo especializado de células, las células plasmáticas, las cuales se diferencian a partir de los linfocitos B2^{369,370}. En infantes, se ha observado que la proporción de los linfocitos B2 es reducida en comparación a los adultos, ya que esta cohorte de individuos inmaduros presenta una gran proporción de las células B1 que generan principalmente IgM^{40,371}. Adicionalmente, los linfocitos B2 de los individuos inmaduros exhiben una baja expresión de correceptores de activación que limitan la producción de IgG^{368,372}. Por último, se ha observado que las células plasmáticas presentan una baja sobrevivencia en las células estomáticas de la médula ósea, que es donde naturalmente residen y se convierten en células plasmáticas de larga vida³⁷³. Esta rica evidencia que se ha generado en el ser humano, permite argumentar que es posible que los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* presenten una población de células B incapaz de equiparar la producción de IgG en los adultos.

El grado de exposición a microorganismos y otros agentes infecciosos, también debería verse reflejado en una menor concentración de IgG en individuos juveniles. La única evidencia reportada en murciélagos³¹⁵ y la gran mayoría de estudios realizados en otras especies de animales, muestran una correlación positiva entre edad y concentración de IgG^{315,357,359,374,375}, la cual puede ser consecuencia de la experiencia del individuo en términos de exposición antigénica^{315,374,375}. Este hecho puede ser de suma importancia en *L. yerbabuena*, ya que los adultos tienen la capacidad de recorrer aproximadamente 100 km por noche en busca de alimento^{376,377}, lo que implica que los adultos han entrado en contacto con más flores que los individuos juveniles. Por lo cual, los adultos deberían tener una mayor experiencia antigénica que los juveniles. Aunque la carga microbiana que presentan las flores que visita *L. yerbabuena* no han sido determinadas, en insectos polinizadores se ha observado que las flores pueden ser focos de transmisión de agentes infecciosos^{378,379}. Congruente con esta idea, se ha observado que las poblaciones silvestres de *M. musculus* exhiben una concentración de IgG superior a la de sus conspecíficos de laboratorio, lo cual parece que se encuentra íntimamente ligado al riesgo de infección al que están expuestos los individuos silvestres^{211–213}.

Aunque es plausible asumir que una inmunidad en desarrollo y un menor grado de exposición antigénica, conlleve a que los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* presenten valores de IgG inferiores a los de los adultos, hasta el momento, es incierto el tiempo de desarrollo del sistema inmunitario en murciélagos. Por lo cual, hay que resaltar que existe la probabilidad de que el rápido desarrollo corporal que exhiben los individuos inmaduros de *L. yerbabuena*, incluya al componente inmunitario. Este hecho podría verse

reflejado en una concentración similar de IgG en individuos inmaduros y adultos. La existencia de este escenario alternativo, sugeriría que los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* logran un rápido desarrollo del componente humoral adquirido, quizá, como consecuencia del riesgo de infección que implica habitar en una cueva.

Condición corporal de las cohortes adultas

Los datos de masa corporal (*Kruskal-Wallis*, $x^2 = 60.259$, $d.f = 3$, $P < 0.001$), y el índice de condición corporal (ICC) (*Kruskal-Wallis*, $x^2 = 58.538$, $d.f = 3$, $P < 0.001$) de los adultos sugieren que el estado energético de la población migratoria de *L. yerbabuena* varía en función del sexo y el estado reproductivo. Los análisis *pos hoc* utilizando la prueba exacta de suma de rangos de Wilcoxon muestra que tanto las hembras como los machos no reproductivos exhiben una masa corporal e ICC inferior a la de sus contrapartes activas ($P < 0.001$) (Figura 4 y 5). Por el contrario, los machos reproductivos y las hembras lactantes (ICC P -valor = 0.93, masa corporal $P = 0.97$), y los adultos no reproductivos de ambos sexos (ICC $P = 0.5$, masa corporal $P = 0.37$) no difieren significativamente (Figura 4 y 5). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de alimento que se asocia con la temporada reproductiva de los individuos, en las zonas centro-oeste^{289,290,295} y noroeste^{177,295} de México, mejora la condición corporal de ambos sexos. Dicha mejora en la condición corporal indica que es poco probable que exista un compromiso energético entre reproducción e inmunidad, durante la temporada reproductiva de la población migratoria de *L. yerbabuena*.

Migración

Isotopos estables de carbono ($\delta^{13}C$)

La población de hembras reproductivamente inactivas que fueron capturadas durante octubre y diciembre en el centro-oeste de México (Figura 1), podría estar compuesta de hembras migratorias provenientes de latitudes cercanas a los 30°N, y hembras residentes de la zona^{289,290}. En términos generales, las hembras migratorias permanecen durante un periodo aproximado de tres meses en cada uno de los extremos de su rango de distribución, en donde los desplazamientos migratorios entre estos sitios duran aproximadamente

entre dos a tres meses²⁸⁹⁻²⁹¹. La vegetación predominante de la zona centro-oeste de México es el bosque seco tropical, con valores de $\delta^{13}\text{C}$ cercanos a las -25‰ ^{289,292}, mientras que en el extremo norte predominan plantas xerofíticas con valores de $\delta^{13}\text{C}$ cercanos a las -14‰ ^{177,288,291,295}. Por lo cual, la fuente de alimento que utiliza *L. yerbabuena* a través de su rango de distribución en la costa pacífica de México exhibe diferencias isotópicas que pueden rastrearse en los tejidos del animal¹⁷⁷.

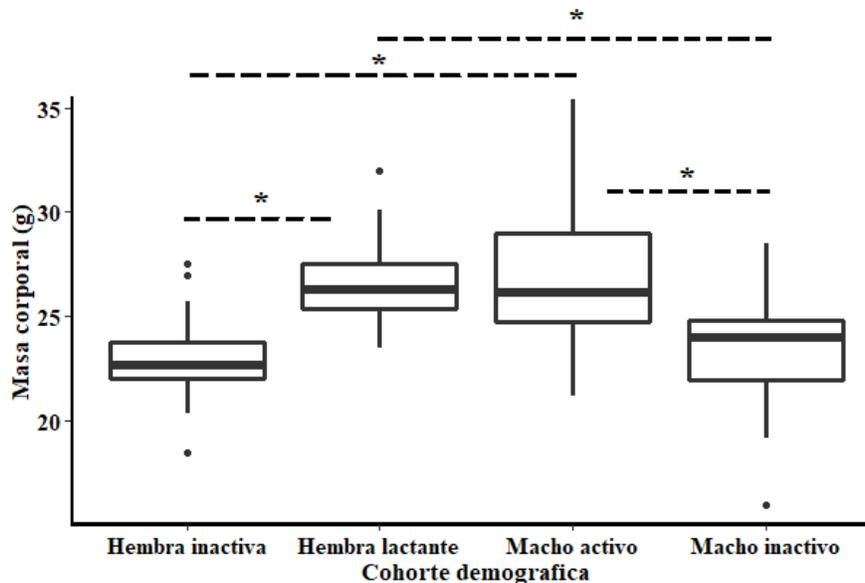


Figura 4. Masa corporal de *L. yerbabuena* en diferentes cohortes adultas de la población migratoria de México. Los términos “inactivos” y “activos” se refieren a la presencia o ausencia de signos de actividad reproductiva. Las líneas horizontales con asteriscos (*) indican los grupos que exhibieron diferencias significativas.

Para identificar el origen geográfico de los individuos migratorios, es indispensable utilizar un tejido cuya tasa de recambio de carbono refleje el alimento consumido por el animal en un periodo de dos a seis meses previos a la toma de la muestra. La tasa de recambio de carbono en la sangre de murciélagos nectarívoros es de 48 a 78 días, lo que da una ventana de tiempo de aproximadamente dos meses en condiciones de cautiverio²⁹⁶. Es probable que la tasa de recambio de carbono de la sangre brinde una ventana de tiempo estrecha para determinar el estado migratorio de las hembras, ya que *L. yerbabuena* realiza desplazamientos diarios de 100 km por noche^{376,377}, y un incremento en la tasa metabólica aumenta el recambio de las células sanguíneas³⁸⁰ y la tasa de recambio de carbono en la sangre³⁸¹, sin embargo, algunas investigaciones sugieren que el recambio de carbono en las células sanguíneas es mínimamente afectado por la tasa metabólica³⁸². La membrana alar pudiese brindar una ventana tiempo más amplia que la fase celular de la sangre, debido a su composición específica y actividad metabólica^{297,383}, sin embargo,

la única investigación en donde se ha calculado la tasa de recambio de este tejido, utilizan una dieta reducida en proteínas, que no refleja la dieta natural de los individuos y que pudiese sobreestimar el tiempo de recambio de carbono natural de la membrana alar^{296,297}.

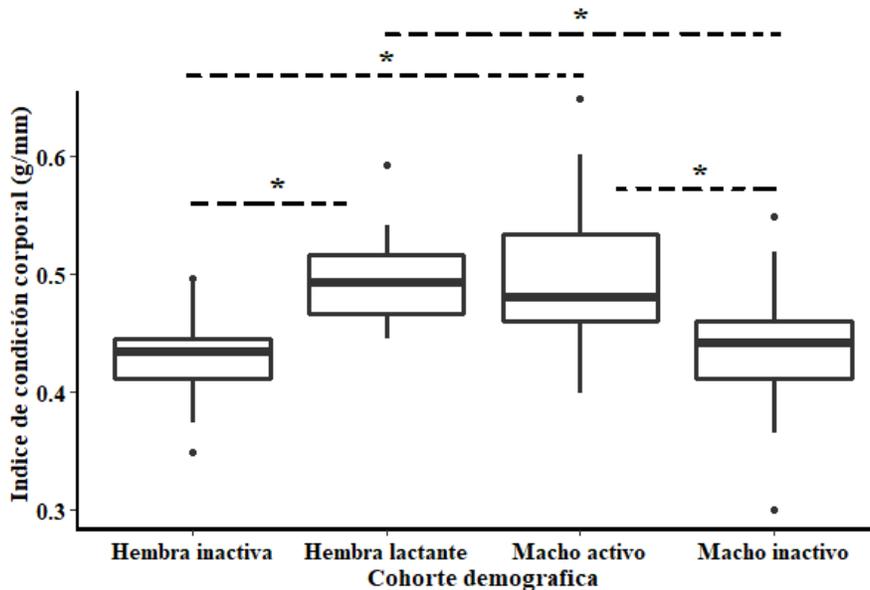


Figura 5. Índice de condición corporal (ICC) de *L. yerbabuena* en diferentes cohortes adultas de la población migratoria de México. Los términos “inactivos” y “activos” se refieren a la presencia o ausencia de signos de actividad reproductiva. Las líneas horizontales con asteriscos (*) indican los grupos que exhibieron diferencias significativas.

El músculo es otro tejido que pudiese representar el origen migratorio de los individuos. Aunque en murciélagos no se ha establecido la vida media y la tasa de recambio de carbono de este tejido, en otras especies de mamíferos se ha observado que el músculo presenta una tasa de recambio de carbono similar a la de la sangre^{221,384}. Sin embargo, la toma de muestras de sangre no implicaría sacrificar al individuo o lastimarlos por medio de biopsias, por lo cual, la sangre representa el tejido el más viable para estimar el estatus migratorio de las hembras. La fase celular de la sangre brinda una ventana de tiempo de entre 48 a 78 días²⁹⁶, la cual podría reflejar la dieta del animal en el periodo premigratorio. Las muestras de sangre de las hembras reproductivamente inactivas que fueron capturadas en la región centro-oeste de México, y que presenten valores de $\delta^{13}\text{C}$ cercanos a -14‰, probablemente sean hembras provenientes de la región noroeste de México que han migrado para completar su ciclo reproductivo. Por otro lado, las muestras de las hembras gestantes que fueron capturadas en mayo y julio en la Cueva de la Mariana (Noroeste de México) deberían exhibir valores de $\delta^{13}\text{C}$ cercanos a -25‰, ya que la gran mayoría de la evidencia sugiere

que la presencia de hembras en esta región es estacional y está determinada principalmente por la etapa reproductiva de la vegetación xerofítica de la zona^{177,291,295}.

~ *Hembras migratorias*

La coincidencia entre la gestación y los desplazamientos migratorios que realizan las hembras de *L. yerbabuena* desde la región centro-oeste de México hacia latitudes mayores impide comprobar el efecto exclusivo de la migración sobre el sistema inmunitario, ya que la gestación afecta significativamente la inmunidad. Por otro lado, el viaje migratorio de las hembras poslactantes que retornan a la región centro-oeste de México para la temporada de copula permitirían establecer el efecto de la migración sobre el sistema inmunitario.

La migración es una estrategia de desplazamiento que incurre en un costo energético y metabólico que puede comprometer el funcionamiento de algunos componentes inmunitarios. Este efecto negativo de la migración sobre la inmunidad ha sido documentado en varias especies de aves^{150,151,158-160}. En el caso de los murciélagos, se ha observado que el componente celular de los individuos de *P. nathusii* no se encuentra afectado por la inducción artificial de una respuesta inmunitaria¹⁷⁴. Sin embargo, los individuos migratorios de *P. nathusii* exhiben una elevada producción de haptoglobina frente al LPS que no se observa en los individuos premigratorios¹⁷⁴. Estos resultados sugieren que la migración atenúa la activación de los mecanismos efectores de la inmunidad celular, y prioriza las defensas humorales innatas durante un proceso infeccioso¹⁷⁴. En el caso particular de *L. yerbabuena*, es poco probable que las hembras experimenten un compromiso energético durante la temporada migratoria que ocurre a finales del verano, debido a la óptima condición corporal que exhiben las hembras lactantes premigratorias (Figura 4 y 5) y a la existencia de plantas que pueden ofrecer alimento durante el viaje a la zona centro-oeste de México^{290,385}. Por lo cual, es poco probable que la disponibilidad de recursos en la zona comprometa el estado energético de las hembras migratorias. En línea con esta idea, los grandes desplazamientos diarios que presenta esta especie^{376,377}, y el amplio lapso temporal en el cual realiza la migración (2 a 3 meses), sugieren que los movimientos migratorios no deberían representar un desafío energético para *L. yerbabuena*.

Los cambios metabólicos, conductuales y ambientales asociados con la migración pueden afectar la microbiota de los individuos migratorios^{386,387}, y por ende afectar el funcionamiento del sistema inmunitario^{14,15,388}. Dentro de estos cambios asociados con la carga de microorganismos que presentan los individuos migratorios, vale la pena resaltar la presencia de diferentes organismos patógenos³⁸⁷. En consecuencia, las hembras migratorias provenientes del extremo norte de México podrían estar expuestas a un mayor¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ o menor¹⁷⁰⁻¹⁷³ riesgo de infección que los individuos residentes. Este murciélago nectarívoro ha sido considerado como una especie de hábitos cavernícolas²⁸⁶, por lo cual, lo más probable es que las hembras utilicen cuevas como refugios temporales durante la migración. Este rasgo particular de *L. yerbabuena* debería incrementar el riesgo de infección durante la migración, ya que las cuevas albergan una gran diversidad de virus y microorganismos potencialmente patógenos³⁵⁶⁻³⁵⁸.

La exposición a agentes infecciosos podría incrementar la ABP en las hembras migratorias, ya que el complemento es un componente inmunitario que potencia su funcionamiento durante un proceso infeccioso³⁸⁹⁻³⁹¹. Sin embargo, en aves se ha observado que la migración afecta negativamente la capacidad microbicida del plasma de los individuos^{160,161}. Por tanto, es difícil predecir un escenario específico sobre el cambio que debería sufrir la ABP en las hembras migratorias, ya que la única investigación realizada en murciélagos sugiere que los niveles basales de la inmunidad innata no se encuentran afectados por la migración¹⁷⁴ y el efecto de la migración sobre la inmunidad depende de la especie y el contexto específico en el que se desarrolla¹⁶⁶⁻¹⁷³. En el caso de los niveles de IgG, es probable que las hembras migratorias exhiban una mayor concentración de IgG que las hembras residentes, ya que los niveles de este anticuerpo se relacionan positivamente con la diversidad antigénica a la que se encuentran expuestos los individuos en su ambiente²¹¹⁻²¹³. Por tanto, se predice que las hembras migratorias deberían exhibir mayores niveles de IgG que las hembras residentes, si efectivamente se encuentran expuestas a una mayor diversidad de microorganismos durante su viaje migratorio.

Sexo

Aunque la actividad reproductiva y el sexo de un individuo son dos factores demográficos que se encuentran íntimamente ligados entre sí²⁹, esta sección de la discusión se centra únicamente en las cohortes adultas no reproductivas de machos y hembras, ya que el efecto de la actividad reproductiva de cada sexo será analizado de manera independiente. La masa corporal y el ICC no difieren entre machos y hembras

inactivas (Figura 4 y 5), lo que sugiere que el estado energético de estas cohortes es similar. Existe una línea de evidencia que demuestra que las diferencias fisiológicas, anatómicas y conductuales que caracterizan a machos y a hembras pueden verse reflejadas en el sistema inmunitario^{29,30,136}. Aunque hasta el momento no existe una caracterización directa de las hormonas sexuales en *L. yerbabuena*, en murciélagos se ha demostrado que hormonas como la testosterona y el estrógeno cumplen funciones similares a lo observado en otras especies de vertebrados^{311,312}. Sin embargo, hay que resaltar que existe un vacío de conocimiento respecto al sistema endocrino de este grupo de mamíferos, ya que el origen, los receptores y las respectivas consecuencias fisiológicas de las hormonas no han sido determinados con certeza en varios de sus miembros³¹¹.

En humanos^{89,392} y roedores^{71,393} las hembras presentan niveles reducidos de varios componentes claves en la actividad microbicida del complemento, lo que sugiere que uno de los principales componentes plasmáticos que se encuentran implicados en la eliminación de *E. coli*¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ se encuentran reducidos en el sexo femenino. Estas diferencias sexuales respecto a la actividad del complemento pueden ser consecuencia de las particularidades hormonales de cada sexo, en especial las diferencias asociadas con la testosterona³⁹³. Congruente con la evidencia reportada en otras especies de murciélagos^{311,312}, los machos de *L. yerbabuena* deberían presentar una mayor concentración de hormonas androgénicas como la testosterona respecto a las hembras. Los altos niveles de testosterona en los machos podrían verse reflejados en una ABP superior a la de las hembras (Figura 6), ya que la testosterona tiene un efecto positivo sobre el componente humoral innato^{131,132}. Acorde con estos resultados, en el murciélago vampiro *D. rotundus* existe evidencia que sugiere que la testosterona puede tener un efecto positivo sobre la ABP²⁷, y más puntualmente, en el murciélago *M. daubentonii* se observa que los machos exhiben una ABP más potente que las hembras³⁰⁶. Quizá, este efecto potenciador de la testosterona sobre el complemento pueda estar implicado en las bajas tasas de infestación que presentan los machos de *M. lyra*³²³ y *M. daubentonii*^{318,319}. Sin embargo, existen casos en donde se observa que la actividad reproductiva de los machos (incremento de testosterona) incrementa la susceptibilidad a ectoparásitos, como es el caso de los murciélagos *M. daubentonii*³¹⁸ y *N. albiventris*³²⁴.

La interacción entre la testosterona y el sistema inmunitario también podría afectar la producción de anticuerpos, ya que la testosterona inhibe la producción espontánea de IgG e IgM en los leucocitos de la sangre¹³³. Por lo cual, es probable que la baja concentración de testosterona que pudiesen presentar las

hembras de *L. yerbabuena*, pueda verse reflejado en una mayor concentración de IgG que los machos (Figura 7). El estrógeno es otra hormona que pudiese contribuir a que los niveles de IgG en machos y hembras difieran. Esta hormona es fundamental para el desarrollo de caracteres sexuales en las hembras⁹², la cual incrementa el número de células plasmáticas y la producción de anticuerpos³⁹⁴. Sin embargo, es probable que la concentración relativa de andrógenos y estrógenos no difieran entre machos y hembras en estado reproductivo inactivo³⁹⁵. Por tanto, es indispensable realizar una caracterización del perfil hormonal de *L. yerbabuena* para soportar estas suposiciones.

En línea con la idea de una variación sexual inmunológica, diferentes investigaciones han demostrado que las hembras tienden a presentar una inmunidad humoral adquirida más potente^{29,136}, la cual puede verse representada en los niveles totales de IgG^{396,397}. Sin embargo, vale la pena resaltar que en algunas investigaciones no se observa una diferencia sexual en la concentración total de IgG^{85,398}. Respecto a los murciélagos, las concentraciones totales de IgG en *M. daubentonii*³⁰⁶ y *S. bilineata*³¹⁵ sugieren que este parámetro inmunitario no difiere entre machos y hembras en inactividad reproductiva. Por lo cual, es probable que machos y hembras de *L. yerbabuena* no exhiban diferencias significativas en los niveles de IgG. Sin embargo, la gran mayoría de evidencia sugiere que el perfil hormonal del sexo femenino debería incrementar los niveles de IgG, en especial si observamos que gran parte de las hembras que fueron capturadas en el centro-oeste de México han realizado la migración, ya que esta estrategia de desplazamiento podría incrementar el riesgo de infección y por ende los niveles de IgG^{211,212} (Figura 7).

Estado reproductivo

La actividad reproductiva se asocia con un reordenamiento fisiológico y conductual¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ que puede afectar la función inmunitaria^{4,21,60,105-107}. Al igual que otros mamíferos, la actividad reproductiva de los murciélagos se encuentra regulada por hormonas^{311,312}. Estas moléculas afectan el funcionamiento del sistema inmunitario, ya que tienen la capacidad de interactuar directamente con los leucocitos^{133,138,399,400} y de inducir cambios comportamentales que pueden incrementar el riesgo de infección³⁰. Uno de los cambios comportamentales más obvios que se asocia con la reproducción sexual, es la cópula; este comportamiento incurre en un incremento en el riesgo de infección por enfermedades de transmisión sexual¹⁴³⁻¹⁴⁵, las cuales pueden afectar preferencialmente a machos o a hembras⁴⁰¹. Por tanto, el riesgo de

infección y los perfiles hormonales característicos de cada sexo deberían verse reflejados en un funcionamiento inmunitario particular de cada estadio reproductivo.

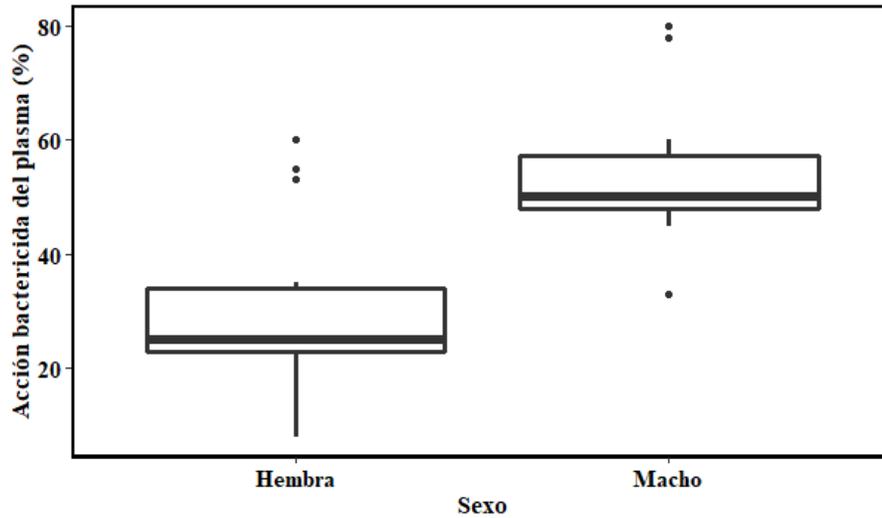


Figura 6. Acción bactericida hipotética del plasma (ABP) en machos y hembras en estado reproductivo inactivo de la población migratoria de L. yerbabuena en México.

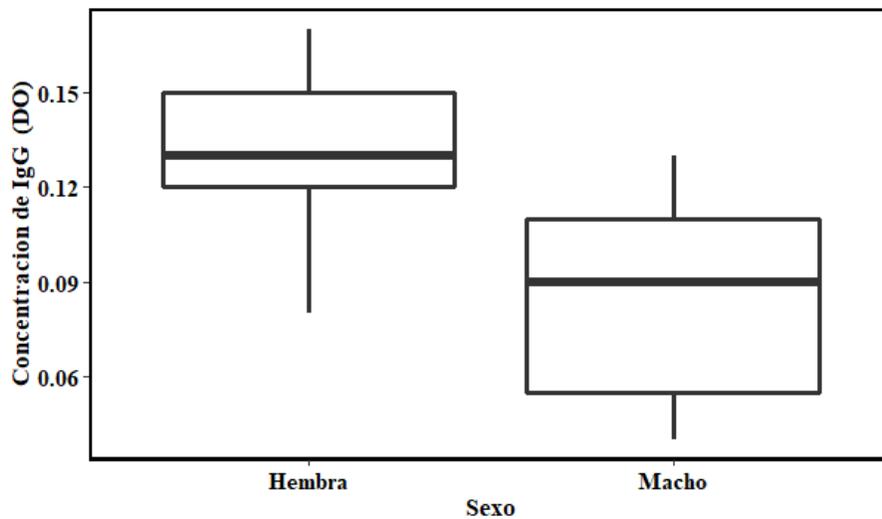


Figura 7. Concentración hipotética de IgG en machos y hembras en estado reproductivo inactivo de la población migratoria de L. yerbabuena en México.

~ *Machos*

Congruente con otras investigaciones^{289,290,299}, los machos reproductivamente activos e inactivos de la población migratoria de *L. yerbabuena* fueron capturados durante los meses de septiembre-enero y marzo-mayo, respectivamente. Estas temporadas de actividad e inactividad reproductiva en los machos, se asocian con diferencias ambientales relacionadas con la disponibilidad de alimento en la zona²⁹⁰. Dicha disponibilidad de alimento se ve reflejada en la masa corporal y el ICC de los individuos, ya que los individuos de la temporada reproductiva exhiben un mayor peso e ICC que los individuos no reproductivos (Figura 4 y 5). Estos resultados son congruentes con lo observado en Ceballos et al²⁸⁹. La fase reproductiva de los machos fue identificada en base al tamaño de los testículos, que en la mayoría de los casos se asocia con la aparición de un prominente parche escapular. Estas características externas se encuentran íntimamente ligadas con la producción de espermatozoides y la temporada de copula²⁹⁹, la cual, debería relacionarse con un incremento en la concentración de testosterona^{311,402}. Las diferencias ambientales, fisiológicas y comportamentales que caracterizan a los estadios reproductivos de los machos de *L. yerbabuena*, deberían tener repercusiones sobre el componente humoral innato y adquirido.

Acción bactericida del plasma (ABP)

Como una medida de la inmunidad humoral innata, la ABP es un ensayo inmunológico que puede verse afectado por el reordenamiento metabólico y comportamental que se asocia con la reproducción en el sexo masculino. Uno de los cambios fisiológicos más conspicuos que se asocian con la actividad reproductiva de los machos, es el incremento de hormonas androgénicas como la testosterona⁴⁰². Aunque esta hormona ha sido catalogada como una molécula reguladora que potencia la actividad reproductiva, a costa de la función inmunitaria^{129,403}, esta relación antagónica entre inmunidad y testosterona no es ubicua, ya que los resultados dependen de la especie, el ambiente y el parámetro inmunitario medido. Por ejemplo, una elevación artificial de la testosterona incrementa la actividad del complemento en ratones³⁹³ y la ABP en el lagarto de artemisa¹³². Esta relación positiva entre inmunidad humoral innata y testosterona también ha sido documentada en la gacela de Grant, en donde se evalúan los valores basales de testosterona y ABP en condiciones naturales¹³¹. Sin embargo, en las iguanas marinas de las Galápagos los niveles basales de testosterona y corticosterona se relacionan negativamente con la ABP⁴⁰⁴, quizá por el efecto del estrés (corticosterona)¹⁸⁷.

Respecto a la actividad reproductiva de los machos y la función inmunitaria, la evidencia reportada en murciélagos es escasa y controversial. En línea con la idea de que la actividad reproductiva de los machos potencia el componente humoral innato, la actividad reproductiva y la ABP de los machos de *D. rotundus* se correlacionan positivamente²⁷. Por el contrario, la actividad reproductiva de los machos no tiene ningún efecto sobre la capacidad microbicida en el murciélago *M. daubentonii*³⁰⁶. Acorde con esta variabilidad interespecífica, se ha observado que la infestación de ectoparásitos en murciélagos puede verse influenciada^{298,318,324} o no³⁰⁵ por el estado reproductivo de los machos. La susceptibilidad de los murciélagos hacia los ectoparásitos puede guardar algún tipo de relación con la ABP, ya que el complemento es un componente inmunitario que se encuentra implicado en la eliminación de ectoparásitos³²¹, y su funcionamiento puede verse afectado por la presencia de estos organismos⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁸. Como cabría esperar, en un grupo de mamíferos tan diverso como los murciélagos, esta evidencia preliminar sugiere que la relación entre la actividad reproductiva de los machos y el funcionamiento de la inmunidad humoral innata, depende de la especie, y probablemente del contexto ecológico en el que vive.

Además del efecto de las hormonas androgénicas, la disponibilidad de alimento en la zona durante esta temporada^{289,290} es otro factor que permite soportar la idea de que la actividad reproductiva de los machos debería potenciar la inmunidad humoral innata. La mejora en las condiciones energéticas del ambiente puede verse reflejada en el incremento del peso y el ICC que exhiben los machos de *L. yerbabuena* durante la temporada reproductiva (Figura 4 y 5). La influencia que tienen las características energéticas de un determinado ambiente sobre la inmunidad, ha sido observada en animales de vida silvestre. Por ejemplo, la disponibilidad de recursos en el ambiente se relaciona positivamente con el funcionamiento de la inmunidad innata en el murciélago *D. rotundus*²⁷ y en el corzo europeo *Capreolus capreolus*²⁶. Esta relación positiva entre la condición energética del individuo y la inmunidad innata soporta la idea de que el componente innato es costoso en términos de energía^{23,24,27}. Aunque este costo energético de la inmunidad innata puede llegar a competir por recursos con la actividad reproductiva, la abundancia de alimento durante esta temporada debería satisfacer la demanda energética de la reproducción y la inmunidad.

El hecho de que en condiciones energéticas favorables se priorice el funcionamiento de una robusta línea de defensa inespecífica, permite plantear que los beneficios de impedir el desarrollo de una infección, superan a los costos asociados a su manutención (recursos energéticos e inmunopatología)^{23,24}. Este hecho

resalta la importancia del riesgo de infección en poblaciones de vida silvestre, el cual debería ser otro factor que pudiese incrementar los valores de la inmunidad humoral innata de los machos reproductivos de *L. yerbabuena*, específicamente en los niveles de la ABP (Figura 8), ya que en roedores se ha observado una correlación positiva entre el riesgo de infección y la ABP⁴⁰⁹. Durante esta etapa de vida, los machos deberían incrementar las posibilidades de contraer una infección, debido a la copula¹⁴³, el incremento de la densidad poblacional en la cueva²²⁹ y la formación de un parche dorsal en la zona escapular. Este último rasgo de *L. yerbabuena* y de su especie hermana de Venezuela (*L. curasoae*), es exclusivo de los machos en actividad reproductiva, en donde diferentes investigaciones han demostrado que esta zona tiene grandes cambios a nivel anatómico, metabólico y microbiano, que quizá se encuentren relacionados con la elección de las hembras^{298,300-302}. Dentro de este parche escapular se encuentran algunos grupos bacterianos que podrían incurrir en un proceso infeccioso³⁰⁰. Por tanto, dicho crecimiento microbiano podría asociarse con un potenciamiento de las defensas humorales innatas, como un mecanismo de prevención que permita controlar rápidamente un proceso de infección. Congruente con la idea de que el parche dorsal representa un carácter sexual secundario asociado con la calidad de los machos^{298,303,304}, es probable que la formación del parche dorsal indique la calidad inmunitaria del individuo.

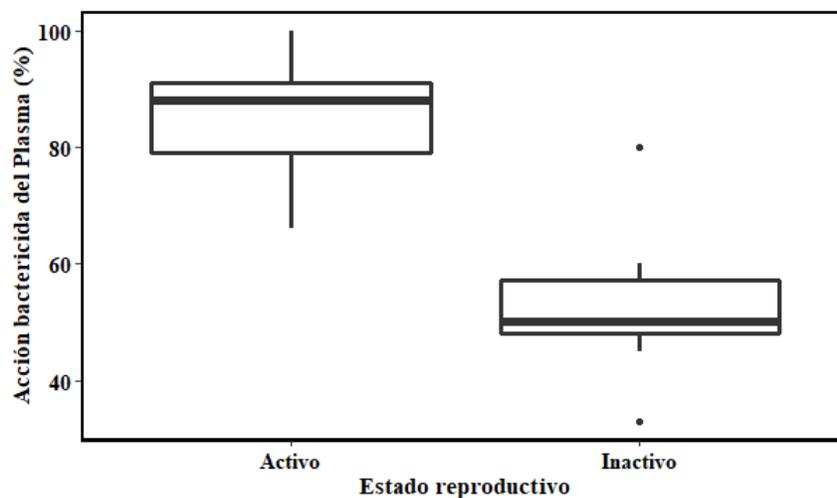


Figura 8. Acción bactericida hipotética del plasma (ABP) en machos reproductivamente activos e inactivos en la población migratoria de *L. yerbabuena* en México.

Inmunoglobulina G (IgG)

La concentración de IgG puede ser influenciada negativamente por el estado reproductivo de los machos, debido a compromisos energéticos y al efecto de la testosterona¹³³. La existencia de un compromiso energético entre la rama humoral adquirida y la actividad reproductiva de los machos es factible, si tenemos en cuenta que los niveles de IgG pueden verse afectados por el estado energético de un individuo^{210,410,411}(véase también⁴¹²). En el caso particular de la población de *L. yerbabuena*, es poco probable que exista un compromiso energético entre reproducción e inmunidad, ya que la temporada reproductiva de los machos se encuentra enmarcada durante el periodo de mayor disponibilidad de alimento en la zona²⁹⁰. En línea con esta idea, estudios previos en esta población²⁸⁹ y los datos de masa corporal e ICC indican que los individuos escrotados presentan una mejor condición corporal que los individuos inactivos (Figura 4 y 5). La disponibilidad de alimento debería amortiguar el costo energético de la reproducción, que, en caso de existir, debería ser mínimo e irrelevante para afectar los niveles de IgG, ya que el componente humoral adquirido es económico en términos de energía y nutrientes²³.

El reordenamiento metabólico de la actividad reproductiva, es otro posible factor que pudiese disminuir la producción de IgG en los machos. Específicamente, el incremento de hormonas androgénicas claves para el desarrollo de la actividad reproductiva como la testosterona, podría disminuir la producción de IgG en los machos¹³³. Congruente con esta idea, machos en estado reproductivo del murciélago *D. rotundus* presentan una menor concentración de IgG que individuos inactivos²⁷. Sin embargo, los niveles de IgG en machos de *M. daubentonii* no se encuentran influenciados por la actividad reproductiva³⁰⁶. Esta escasa y contradictoria evidencia en murciélagos, sugiere que la relación entre la inmunidad humoral adquirida y el estado reproductivo de los machos en los quirópteros no es homogénea. Es probable que el contexto ecológico particular de cada especie tenga un impacto sobre los niveles de este anticuerpo en sangre^{211,212,388}.

Aunque el costo energético y los perfiles hormonales de los machos durante la temporada reproductiva podrían disminuir los niveles de IgG, la llegada de las hembras migratorias a la cueva durante la temporada reproductiva²⁹⁰, podría incrementar el riesgo de infección de los machos. El riesgo de infección podría verse reflejado en un incremento de los niveles de IgG²¹¹. Sin embargo, vale la pena resaltar que es posible que exista un compromiso inmunitario entre la inmunidad innata y la adquirida^{23,24}, como es el caso del

murciélago *D. rotundus*²⁷ y del corzo europeo *C. capreolus*²⁶. Aunque la existencia de un compromiso inmune depende del estado energético del individuo¹⁷, estos compromisos inmunitarios pueden existir, aun en ausencia de compromisos energéticos^{26,27}. Por lo cual, es probable que los machos de *L. yerbabuena* durante la temporada reproductiva exhiban una ABP más potente que sus congéneres inactivos, mientras que los niveles de IgG podrían verse reducidos o incluso no ser afectados por la temporada reproductiva. Este escenario permite plantear que los niveles de IgG de los machos durante la temporada reproductiva deberían ser iguales o inferiores, a los de sus congéneres inactivos (Figura 9).

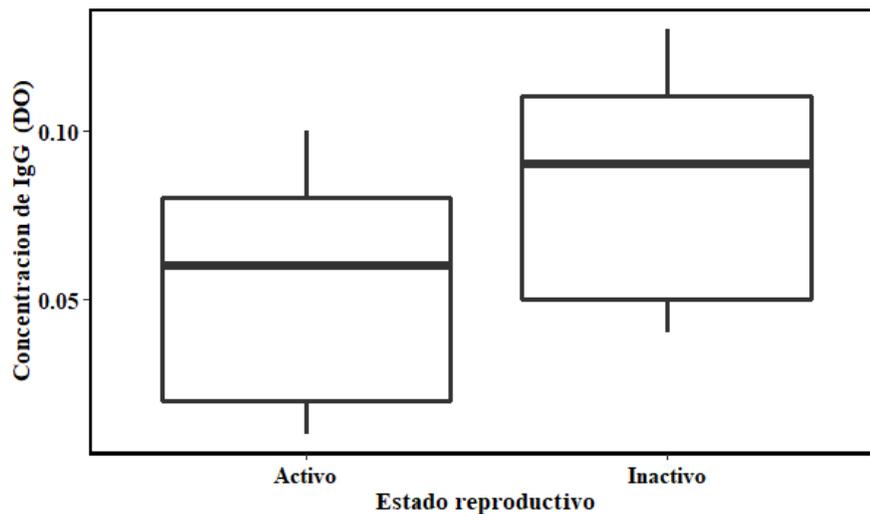


Figura 9. Concentración hipotética de IgG en machos activos e inactivos de la población migratoria de *L. yerbabuena* en México.

~ Hembras

Los cambios fisiológicos que experimentan las hembras durante su ciclo reproductivo, difieren considerablemente de los machos. Dentro de estas diferencias reproductivas, las hembras de los mamíferos presentan dos periodos reproductivos que incurren en un reordenamiento anatómico, metabólico y comportamental: la gestación y la lactancia^{102,104,413}. Aunque los niveles de las hormonas sexuales no han sido caracterizados en *L. yerbabuena*, es probable que al igual que otras especies de murciélagos^{311,312}, las hembras presenten altos niveles de estrógenos, progesterona y prolactina, durante la gestación y la lactancia. Además de estas diferencias fisiológicas, las hembras en gestación de *L. yerbabuena* se desplazan aproximadamente 1800 km hacia latitudes mayores para completar su ciclo

reproductivo^{287,288,290}. Por lo cual, la actividad reproductiva de las hembras de *L. yerbabuena* difiere radicalmente de los machos y de sus congéneres inactivas. Dichas diferencias ambientales, fisiológicas y comportamentales que se asocian con la gestación y la lactancia en *L. yerbabuena*, deberían verse reflejados en el sistema inmunitario, debido a la gran plasticidad que existe este componente fisiológico⁴¹⁴.

~ *Gestación y migración*

Acción bactericida del plasma (ABP)

Durante la gestación, las hembras sufren cambios fisiológicos que afectan la función inmunitaria^{102,415,416}. En humanos se ha establecido que varios marcadores de activación del complemento se incrementan durante el embarazo^{308,417-419}. Sin embargo, hembras preñadas del mono verde africano presentan una disminución del complemento durante las etapas finales del embarazo⁴²⁰. Esta discrepancia inter-específica no es de sorprender, ya que cada especie exhibe un acervo inmunológico particular que se desarrolla en un contexto reproductivo específico⁴²¹. Los murciélagos se caracterizan por presentar una amplia gama de estrategias reproductivas³¹² e inmunológicas^{241,422}. Independientemente de la discrepancia que se ha observado entre estudios, la evidencia actual sugiere que la activación y regulación del complemento es clave para el desarrollo normal del feto en mamíferos^{308,423-425}. Por lo cual, cabría esperar que el funcionamiento del complemento se encuentre afectado por la gestación, y por ende la ABP.

Teniendo en cuenta que la mayoría de estudios en mamíferos sugieren que la actividad del complemento se incrementa durante la gestación, cabría esperar que las hembras de *L. yerbabuena* incrementen la ABP durante la gestación. Sin embargo, la ABP en hembras de *M. daubentonii* no difiere entre estadios reproductivos³⁰⁶. Estos resultados pueden indicar que el nivel de resolución de la ABP no es lo suficientemente fino para evidenciar el efecto de la gestación sobre el complemento. Otra posible explicación, es que, a diferencia de algunos primates y roedores, el funcionamiento humoral innato de los murciélagos no se encuentra afectado por la gestación. Sin embargo, lo más probable es que esta relación entre inmunidad y gestación dependa de la especie de murciélago, como es el caso del mono verde africano⁴²⁰ y el humano^{308,417-419}, en donde se observa una relación especie específica entre la actividad del complemento y la gestación. Por tanto, es poco probable que los resultados obtenidos en *M. daubentonii*³⁰⁶ puedan extrapolarse a otras especies de murciélagos.

Congruente con la idea de que el complemento, y por ende la ABP pueda verse potenciada por los cambios fisiológicos de la gestación (Figura 10), los desplazamientos periódicos que realizan los individuos migrantes pueden aumentar¹⁶⁶⁻¹⁶⁹ o reducir¹⁷⁰⁻¹⁷³ la tasa de contacto con agentes infecciosos. En el caso de *L. yerbabuena*, el uso de cuevas durante la migración debería incrementar el riesgo de infección, ya que las cuevas albergan una gran diversidad de virus y microorganismos potencialmente patógenos³⁵⁶⁻³⁵⁸. Este incremento en el riesgo de infección debería incurrir en una sobre activación del complemento durante la gestación^{308,423,426}. Aunque esta activación puede ser considerada como una estrategia inmunitaria de protección para la madre y el feto⁴²⁴, diferentes investigaciones han determinado que una activación excesiva del complemento incurre en complicaciones para el desarrollo del feto y del embarazo^{308,423,426}. Por lo cual, es probable que el riesgo de infección y los cambios fisiológicos que ocurren durante la gestación, puedan verse reflejados en un incremento de la ABP en las hembras gestantes de *L. yerbabuena* (Figura 10). Este hipotético escenario, permitiría sugerir que las hembras gestantes de *L. yerbabuena* deberían exhibir mecanismos de regulación del complemento que permitan evitar los efectos adversos de una alta actividad sistémica del complemento^{427,428}.

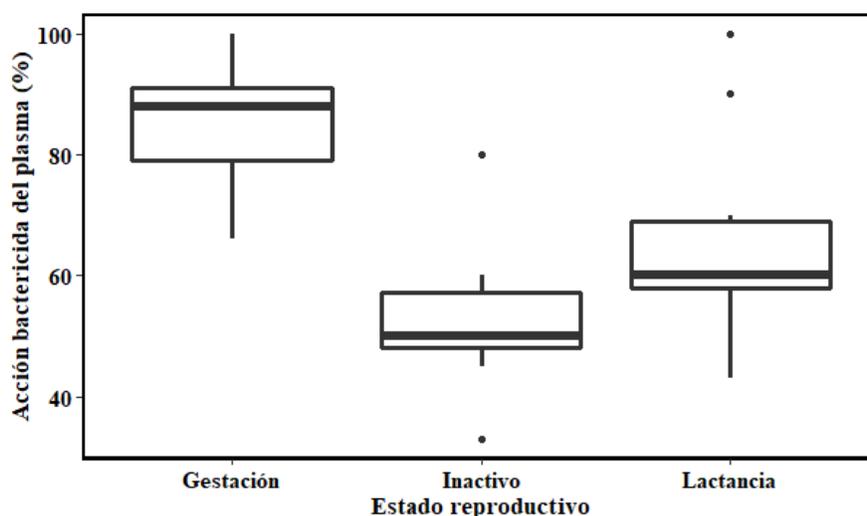


Figura 10. Acción bactericida hipotética del plasma (ABP) en diferentes cohortes reproductivas de hembras en la población migratoria de *L. yerbabuena* en México.

Vale la pena resaltar que existen otros factores asociados con la migración que pudiesen verse reflejados en una disminución de la ABP. Después de copular en el bosque seco tropical, una gran fracción de las hembras gestantes de la población migratoria de *L. yerbabuena* viajan aproximadamente 1800 km hacia

el desierto de Sonora^{177,286,291,295}. Este desplazamiento migratorio podría afectar significativamente el presupuesto energético de las hembras, ya que tanto la migración¹⁴⁹ como la gestación⁴¹³, son procesos costosos en términos de energía y nutrientes, que podrían comprometer el funcionamiento de la inmunidad humoral innata. Sin embargo, es poco probable que las hembras de *L. yerbabuena* experimenten un compromiso inmunitario, debido a que la existencia de un compromiso energético depende de la disponibilidad de recursos en el ambiente¹⁷. Por tanto, la floración y fructificación de cactus y agaves deberían amortiguar el costo energético de la migración y la gestación. Otro aspecto que permite plantear que es poco probable que exista un compromiso energético entre inmunidad y migración, es el hecho de que esta especie se encuentra adaptada para realizar grandes desplazamientos por día^{376,377}, por lo que la realización de este viaje migratorio en un par de meses, en principio no debería representar un desafío energético para *L. yerbabuena*.

Inmunoglobulina G (IgG)

En términos generales, los niveles plasmáticos de IgG durante la gestación pueden verse afectados por el tipo de placentación (a nivel histológico) que exhiben las hembras^{429,430}. Animales con un tipo de placentación hemocorial como el ser humano, realizan la transferencia de IgG principalmente durante el desarrollo del feto⁴³¹. Este tipo de transferencia de anticuerpos se ve reflejado en una disminución progresiva de la IgG plasmática durante la gestación⁴³²⁻⁴³⁵. Aunque este tipo de placentación permite la transferencia de IgG hacia el feto, otras especies de animales con placentación hemocorial, como los roedores, transfieren la IgG por medio de la leche materna⁴³⁶. La transferencia de anticuerpos a través de la leche materna, es una de las principales estrategias que se observan en especies con otros tipos de placentación^{429,437}. En estos casos se observa una disminución en los niveles de IgG en las etapas finales de la gestación, a pesar de que los valores pueden permanecer constantes⁴³⁸⁻⁴⁴⁰, o incluso incrementar^{439,441-443} en etapas más tempranas. Es probable que los niveles elevados de IgG que se observan en las hembras gestantes de *M. daubentonii*³⁰⁶, obedezcan al tipo de placentación que presenta la especie. Desafortunadamente no podemos extrapolar estos resultados a *L. yerbabuena*, ya que hasta el momento no se ha descrito el tipo de placentación que presenta esta especie, y los murciélagos pueden exhibir un tipo de placentación hemocorial y endotelicorial⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶. Por lo cual, la transferencia de IgG puede ocurrir durante el desarrollo fetal (hemocorial) o por medio del calostro (endotelicorial o hemocorial).

Además del tipo de placentación, los cambios hormonales que se asocian con la gestación pueden afectar los niveles de IgG plasmáticos. Al igual que otras especies de mamíferos, los murciélagos presentan un incremento en los niveles de estrógeno y progesterona durante el desarrollo del embarazo^{311,312}. Por tanto, es probable que las hembras gestantes de *L. yerbabuenae* presenten un perfil hormonal similar al de otras especies de murciélagos. La elevada concentración de progesterona y estrógeno en las hembras grávidas podría explicar los resultados obtenidos por Ruoss et al³⁰⁶, ya que la progesterona y los estrógenos tienen un efecto positivo sobre la producción de IgG^{307,447,448}. El incremento hormonal de estrógenos y progesterona sugiere que las hembras gestantes de *L. yerbabuenae*, podrían exhibir una elevada concentración de IgG plasmática (Figura 11).

La adopción de ciertos comportamientos durante la gestación, también podría tener una influencia sobre los niveles de IgG. Por ejemplo, las hembras preñadas de *M. daubentonii* forman densas colonias de maternidad que pueden incrementar el riesgo de infección, y por ende, de los niveles de IgG³⁰⁶. Es probable que la formación de colonias de maternidad en *L. yerbabuenae* puedan incrementar el riesgo de infección de las hembras gestantes. Sin embargo, no hay datos específicos sobre la abundancia de individuos de *L. yerbabuenae* en la cueva de la Mariana, mientras que las hembras en inactividad reproductiva fueron capturadas durante el pico de abundancia en la cueva de la Isla de los Murciélagos^{289,290}. Por tanto, no es posible inferir un paralelo entre el potencial riesgo de infección entre estas dos cuevas asociado con la densidad poblacional. Es posible que el desplazamiento de las hembras gestantes hacia latitudes mayores incremente el riesgo de infección como consecuencia del uso de refugios temporales durante la migración, los cuales podrían estar repletos de microorganismos infecciosos³⁵⁶⁻³⁵⁸. Este hipotético escenario, en el cual las hembras gestantes se encuentran expuestas a un mayor riesgo de infección que sus contrapartes inactivas, debería verse representado en un incremento de los niveles de IgG^{211,375} (Figura 11).

Además del riesgo de infección, la migración es una estrategia de desplazamiento que incurre en un costo energético que puede afectar la función inmunitaria¹⁴⁹. Por lo cual, existe la posibilidad de que las hembras gestantes presenten niveles reducidos de IgG en comparación con sus congéneres inactivos. Sin embargo, la migración en *L. yerbabuenae* es impulsada por la floración de agaves y cactus a lo largo de la costa pacífica de México^{177,291,295}. Esta disponibilidad de alimento podría amortiguar el costo energético de la migración, la gestación y la inmunidad humoral²³. Otro aspecto que permite plantear que

es poco probable que exista un compromiso energético entre inmunidad y migración es el hecho de que esta especie se encuentra adaptada para realizar grandes desplazamientos por día, por lo cual, la realización de este viaje migratorio en una ventana tiempo de aproximadamente 2 meses aproximadamente, en principio no debería representar un desafío energético para *L. yerbabuena*.

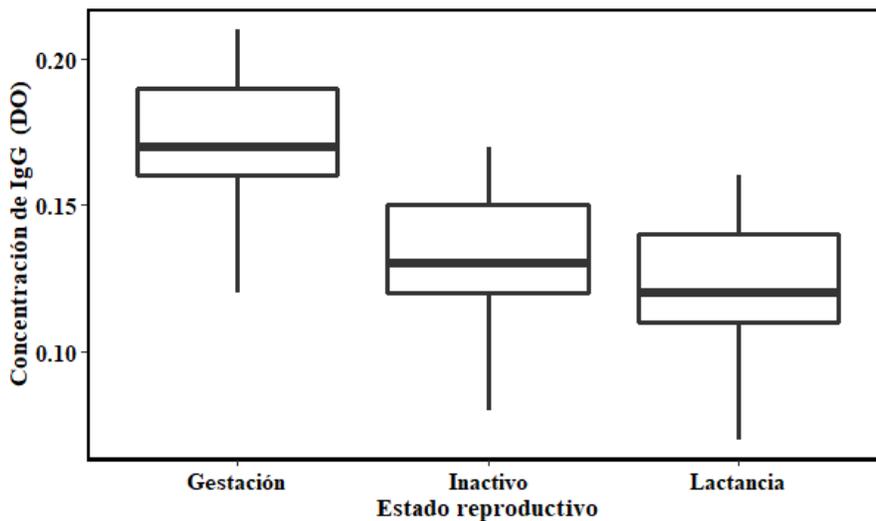


Figura 11. Concentración hipotética de IgG en diferentes cohortes reproductivas de hembras en la población migratoria de *L. yerbabuena* en México.

~ *Lactancia*

Al igual que la gestación, la lactancia es un estadio reproductivo que incurre en una alta demanda energética^{449,450}. Este costo energético puede llegar a comprometer el funcionamiento de la inmunidad en animales de vida silvestre⁴⁵¹. La existencia de este compromiso va a depender del estado energético del individuo^{17,451}, el cual debería ser positivo si tomamos en cuenta la gran disponibilidad de recursos provista por la vegetación xerofítica durante la lactancia para *L. yerbabuena*. En línea con esta idea, la masa corporal y el ICC de las hembras lactantes sugiere que esta cohorte de individuos exhibe una mejor condición corporal que sus contrapartes inactivas (Figura 4 y 5). Otro factor que pudiese favorecer la existencia de un compromiso energético es la estrategia utilizada para producir la leche materna⁴⁵¹. *L. yerbabuena* requiere de un suministro continuo de alimento para la producción de leche⁴⁵², que, en caso de no satisfacerse puede llevar a un compromiso energético con la inmunidad. Sin embargo, los efectos de este compromiso energético entre lactancia e inmunidad es probable que se vean reflejados en las crías,

y no en la madre⁴⁵³. Por lo cual, es poco probable que los parámetros inmunitarios propuestos en esta investigación se vean afectados por un compromiso energético.

Además del costo energético, la lactancia es un estadio de vida que se caracteriza por un gran reordenamiento fisiológico y comportamental que puede afectar la función inmunitaria^{120,306,451,454}. Congruente con esta hipótesis, en murciélagos se ha observado que hembras de *M. lyra*³²³, *M. myotis*⁴⁵⁵ y *P. scapulatus*³¹⁴ exhiben un incremento en la replicación de agentes infecciosos durante la lactancia. La susceptibilidad de las hembras lactantes puede ser producto de la aglomeración de individuos y (o) de una inmunidad suprimida. Sin embargo, otras especies de murciélagos exhiben un patrón totalmente opuesto, como es el caso de *N. albiventris*³²⁴. Estos resultados contrastantes sugieren que la influencia de la lactancia sobre una medida indirecta del estado inmunitario (carga de agentes infecciosos) depende de la especie (tanto hospedero como parásito) y el contexto ecológico en el que ocurre. Aunque la formación de colonias de maternidad en *L. yerbabuena* podría incrementar el riesgo de infección durante la lactancia, vale la pena resaltar que las hembras inactivas también podrían estar expuestas a un gran riesgo de infección, ya que estas hembras fueron capturadas durante el pico de abundancia en la Isla de los Murciélagos^{289,290}. Acorde con esta idea, en Zamora et al³⁰⁵ no encontraron un efecto pronunciado del estado reproductivo sobre la carga de ectoparásitos en *L. yerbabuena*. Por tanto, no existe evidencia suficiente que permita sugerir que las hembras lactantes e inactivas se encuentran expuestas a un riesgo de infección diferencial.

El reordenamiento hormonal que se asocia con la lactancia es otro factor que podría afectar la función inmunitaria de las hembras en *L. yerbabuena*. Por ejemplo, la prolactina es una de las principales hormonas que se encuentran implicadas en el desarrollo de la lactancia⁴⁵⁶⁻⁴⁶⁰. Al igual que otros mamíferos, los niveles de prolactina se incrementan durante el periodo de la lactancia en varias especies de murciélagos, lo que sugiere que la prolactina cumple un rol similar en los quiropteros^{311,312}. La acción pleiotrópica de esta hormona podría afectar la ABP, ya que distintas células implicadas con la producción de las moléculas del complemento, como leucocitos⁴⁶¹ y hepatocitos⁴⁶², modifican su funcionamiento en respuesta a la prolactina. A pesar de que la prolactina podría impactar significativamente uno de los principales mecanismos efectores de la ABP, esta hormona solo afecta al funcionamiento del complemento en condiciones anormales o patológicas⁴⁶³. Acorde con esta idea, el periodo de lactancia no tiene ningún efecto sobre la actividad del complemento en cabras saludables⁴⁶⁴, y la ABP del murciélago

M. daubentonii no difiere entre hembras lactantes y otros estadios reproductivos³⁰⁶. Por lo cual, los cambios hormonales asociados con la lactancia no deberían tener un efecto significativo sobre la ABP de *L. yerbabuena* (Figura 10).

Respecto a la concentración de IgG en las hembras lactantes de *L. yerbabuena*, es poco probable que se observen diferencias respecto a los estadios no reproductivos. Aunque una elevada concentración de prolactina (niveles suprafisiológicos) puede incrementar la producción de IgG *in vitro* de PBMC (células sanguíneas periféricas mononucleares, por sus siglas en inglés) en individuos sanos⁴⁵⁴, un incremento de la concentración de prolactina dentro de los niveles fisiológicos normales no tiene ningún efecto sobre la producción de IgG⁴⁶⁵. La única evidencia reportada en murciélagos sugiere que los valores de IgG no difieren entre cohortes no reproductivas y lactantes de *M. daubentonii*³⁰⁶. Por otro lado, en animales de vida silvestre como *Phoca vitulina*⁴⁶⁶ y algunas especies domesticas como vacas^{440,442}, ovejas⁴⁴³ y cerdas^{438,439}, se observa que los valores de IgG difieren entre cohortes lactantes y no reproductivas. Sin embargo, dicha variabilidad es transitoria y solo se observa durante las primeras semanas de la lactancia. Por tanto, las hembras lactantes que fueron muestreadas en esta investigación no deberían de exhibir una diferencia en los niveles de IgG respecto a cohortes inactivas (Figura 11), ya que estas hembras fueron capturadas durante las etapas finales de la lactancia.

A pesar de que los cambios metabólicos asociados con la lactancia no deberían tener un efecto sobre la ABP y los niveles de IgG, es probable que las condiciones energéticas del ambiente y la migración puedan tener algún efecto. Las hembras premigratorias lactantes exhiben una mejor condición corporal que las hembras posmigratorias (reproductivamente inactivas) (Figura 4 y 5). Estas diferencias podrían verse representadas en una mayor ABP y una menor concentración de IgG en las hembras lactantes respecto a cohortes inactivas^{26,27}. En línea con esta idea, tras completar la temporada de maternidad en la región noroeste de México, la migración de las hembras hacia el centro-oeste del país podría incrementar el riesgo de infección debido al uso de cuevas como refugios temporales^{149,356–358}. Este hipotético incremento en el riesgo de infección, en asociación con la reducida condición corporal que presentan las hembras inactivas posmigratorias, podría verse reflejado en un incremento de los niveles de IgG en esta cohorte de individuos^{26,27,211–213}. Aunque es plausible que se observe este escenario alternativo, la evidencia reportada hasta el momento sugiere que lo más probable de observar es que no existan diferencias significativas entre hembras lactantes e inactivas.

CONCLUSIONES

- Aunque existen diversas investigaciones en humanos y animales domésticos que demuestran la influencia que tienen factores demográficos como la edad, el sexo y el estado reproductivo sobre la inmunidad, la escasa evidencia reportada en poblaciones de vida silvestre sugiere que la relación entre inmunidad y demografía depende del contexto ecológico y el acervo inmune particular de cada especie.
- La diversidad taxonómica, ecológica y reproductiva de los quirópteros se ve reflejada en un amplio repertorio de comportamientos y estados fisiológicos dentro del grupo. El impacto que pudiese tener esta variabilidad biológica de los murciélagos sobre la función inmunitaria es un tema poco explorado, en donde la evidencia actual sugiere que no es posible formular conclusiones generales del grupo en base a un número reducido de especies modelo.
- Los murciélagos albergan diversas formas de vida como virus, microorganismos y ectoparásitos, los cuales son de suma importancia para la salud de otras especies de mamíferos como el ser humano y animales domésticos. A pesar del potencial patogénico que tienen estas formas de vida sobre otros mamíferos (en especial los virus), los murciélagos logran coexistir con muchos de estos agentes infecciosos sin exhibir síntomas de un proceso patológico.
- La evidencia actual permite especular que es probable que los individuos inmaduros de *L. yerbabuena* exhiban una inmunidad humoral innata (acción bactericida del plasma) y adquirida (concentración de IgG total) inferior a la de los adultos, debido al estado fisiológico y comportamental que exhibe esta cohorte de individuos.
- Las diferentes cohortes demográficas de la población migratoria de *L. yerbabuena* exhiben cambios morfológicos durante la temporada reproductiva que sugieren una mejora en la condición corporal de los individuos. Por tanto, la evidencia bibliográfica reportada en esta investigación sugiere que los adultos (tanto machos como hembras) exhiben una mejor condición corporal durante la temporada reproductiva.

- La acción bactericida del plasma (ABP) y los niveles totales de IgG son dos parámetros inmunitarios útiles e informativos sobre el estado de la inmunidad humoral innata y adquirida, los cuales deberían verse influenciados por las diferencias comportamentales, metabólicas y ecológicas que exhiben las distintas cohortes demográficas de *L. yerbabuena*.
- Los análisis de isotopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) representan una herramienta útil y viable para identificar a los individuos migratorios y residentes en la población migratoria de *L. yerbabuena* que se distribuye a lo largo de la costa pacífica de México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. McNab, B. K. *The Physiological Ecology of Vertebrates. A View from Energetics*. (Cornell University Press, 2002).
2. Nelson, R. J. & Demas, G. E. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol.* **71**, 511–548 (1996).
3. Demas, G., Greives, T., Chester, E. & French, S. The Energetics of Immunity: Mechanism Mediating Trade-offs in Ecoimmunology. in *Ecoimmunology* (eds. Demas, G. E. & Nelson, R. J.) 259–296 (Oxford University Press, Inc, 2012).
4. Sheldon, B. & Verhulst, S. Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol.* **11**, 317–321 (1996). doi:10.1016/0169-5347(96)10039-2.
5. Neish, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* **136**, 65–80 (2009). doi:10.1053/j.gastro.2008.10.080.
6. Ley, R. E. *et al.* Evolution of mammals and their gut microbes. *Science.* **320**, 1647–1651 (2008). doi:10.1126/science.1155725.
7. Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. & Roitt, I. M. *Roitt's Essential Immunology*. (Wiley-Blackwell, 2017).
8. Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. & Weaver, C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* **489**, 231–241 (2012). doi:10.1038/nature11551.
9. Hooper, L. V & Gordon, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* **292**, 1115–1119 (2001). doi:doi: 10.1126/science.1058709.
10. Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T. & Nielsen, J. L. The Microbiome of animals : implications for conservation biology. *Int J Genomics.* **2016**, 7 (2016). doi:10.1155/2016/5304028.

11. Prosser, J. I. *et al.* The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Microbiol.* **5**, 384–392 (2007). doi:10.1038/nrmicro1643.
12. Altizer, S., Dobson, A., Hosseini, P., Hudson, P. & Pascual, M. Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett.* **9**, 467–484 (2006). doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x.
13. Pulendran, B., Palucka, K. & Banchereau, J. Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses. *Science.* **293**, 253–256 (2001). doi:10.1126/science.1062060.
14. Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A. & Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol.* **17**, 219–232 (2017). doi:10.1038/nri.2017.7.
15. Wang, R. *et al.* Gut microbiome, liver immunology, and liver diseases. *Cell Mol Immunol.* **18**, 4–17 (2021). doi:10.1038/s41423-020-00592-6.
16. Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y. & Siva-Jothy, M. T. Introduction. Ecological immunology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* **364**, 3–14 (2009). doi:10.1098/rstb.2008.0249.
17. French, S. S., Moore, M. C. & Demas, G. E. Ecological immunology: The organism in context. *Integr Comp Biol.* **49**, 246–253 (2009). doi:10.1093/icb/icp032.
18. Viney, M. E. & Riley, E. M. From Immunology to Eco-Immunology: More than a New Name. in *Eco-immunology: Evolutive Aspects and Future Perspectives* (eds. Malagoli, D. & Ottaviani, E.) 1–20 (Springer, 2014).
19. Viney, M. & Riley, E. M. The immunology of wild rodents: Current status and future prospects. *Front Immunol.* **8**, 1–9 (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.01481.
20. Matson, K. D., Cohen, A. A., Klasing, K. C., Ricklefs, R. E. & Scheuerlein, A. No simple answers for ecological immunology : relationships among immune indices at the individual level break down at the species level in waterfowl. *Proc R Soc Lond B.* **273**, 815–822 (2006). doi:10.1098/rspb.2005.3376.
21. Norris, K. & Evans, M. R. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav Ecol.* **11**, 19–26 (2000). doi:10.1093/beheco/11.1.19.
22. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Inmunobiología de Janeway.* (McGRAW HILL, 2008).

23. Lee, K. A. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integr Comp Biol.* **46**, 1000–1015 (2006). doi:10.1093/icb/icl049.
24. Mcdade, T. W., Georgiev, A. V & Kuzawa, C. W. Trade-offs between acquired and innate immune defenses in humans. *Evol Med Public Health.* 1–16 (2016) doi:10.1093/emph/eov033. doi:10.1093/emph/eov033.
25. Kelly, T. R., MacGillivray, H. L., Hobson, K. A., MacDougall-Shackleton, S. A. & MacDougall-Shackleton, E. A. Immune profiles vary seasonally, but are not significantly related to migration distance or natal dispersal, in a migratory songbird. *J Exp Zool.* **327**, 284–292 (2017). doi:10.1002/jez.2088.
26. Gilot-fromont, E. *et al.* Immune phenotype and body condition in roe deer: Individuals with high body condition have different, not stronger immunity. *PLoS One.* **7**, e45576 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0045576.
27. Becker, D. J. *et al.* Livestock abundance predicts vampire bat demography, immune profiles and bacterial infection risk. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* **373**, (2018). doi:10.1098/rstb.2017.0089.
28. Simon, A. K., Hollander, G. A. & McMichael, A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc R Soc Lond B.* **282**, (2015). doi:10.1098/rspb.2014.3085.
29. Klein, S. L. & Flanagan, K. L. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* **16**, 626–638 (2016). doi:10.1038/nri.2016.90.
30. Klein, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* **24**, 627_638 (2000). doi:10.1016/s0149-7634(00)00027-0.
31. Ricklefs, R. E. The evolution of senescence from a comparative perspective. *Funct Ecol.* **22**, 379–392 (2008). doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01420.x.
32. Ardia, D. R. & Schat, K. A. Ecoimmunology. in *Avian Immunology* (eds. Davison, F., Kaspers, B. & Schat, K. A.) 421–441 (Elsevier, 2008).
33. Shearer, G. M. Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev.* **94**, 1–5 (1997). doi:10.1016/S0047-6374(96)01849-0.

34. Peters, A., Delhey, K., Nakagawa, S., Aulsebrook, A. & Verhulst, S. Immunosenescence in wild animals: meta-analysis and outlook. *Ecol Lett.* **22**, 1709–1722 (2019). doi:10.1111/ele.13343.
35. Holsapple, M. P., West, L. J. & Landreth, K. S. Species Comparison of Anatomical and Functional Immune System Development. *Birth Defects Res.* **68**, 321–334 (2003). doi:10.1002/bdrb.10035.
36. Kay, M. M. B. & Mendoza, J. Age-related changes in the immune system of mice of eight medium and long-lived strains and hybrids. I. Organ, cellular, and activity changes. *Mech Ageing Dev.* **11**, 295–346 (1979). doi:https://doi.org/10.1016/0047-6374(79)90009-5.
37. Shavlakadze, T. *et al.* Age-related gene expression signature in rats demonstrate early, late, and linear transcriptional changes from multiple tissues. *Cell Rep.* **28**, 3263-3273.e3 (2019). doi:10.1016/j.celrep.2019.08.043.
38. Georgountzou, A. & Nikolaos, P. G. Postnatal innate immune development : From birth to adulthood. *Front Immunol.* **8**, 1–16 (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.00957.
39. Weng, N. Aging of the immune system: How much can the adaptive immune system adapt? *Immunity.* **24**, 495–499 (2006). doi:10.1016/j.immuni.2006.05.001.
40. Hannet, I., Erkeller-yuksel, F., Lydyard, P., Deneys, V. & Debruyère, M. Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today.* **13**, (1992). doi:10.1016/0167-5699(92)90157-3.
41. Harbeson, D., Ben-Othman, R., Amenyogbe, N. & Kollmann, T. R. Outgrowing the immaturity myth: The cost of defending from neonatal infectious disease. *Front Immunol.* **9**, 1–9 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.01077.
42. Lietzén, N. *et al.* Characterization and non- parametric modeling of the developing serum proteome during infancy and early childhood. *Sci Rep.* **8**, 1–13 (2018). doi:10.1038/s41598-018-24019-5.
43. McGreal, E. P., Hearne, K. & Spiller, O. B. Off to a slow start : Under-development of the complement system in term newborns is more substantial following premature birth. *Immunobiology.* **217**, 176–186 (2012). doi:10.1016/j.imbio.2011.07.027.

44. Paula, P. F. De *et al.* Ontogeny of complement regulatory proteins – concentrations of factor H, factor I, C4b-binding protein, properdin and vitronectin in healthy children of different ages and in adults. *Scand J Immunol.* **58**, 572–577 (2003). doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01326.x.
45. Beek, A. E. van *et al.* Reference intervals of Factor H and Factor H-related proteins in healthy. *Front Immunol.* **9**, 1–6 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.01727.
46. Jolliff, C. R. *et al.* Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. *Clin Chem.* **28**, 126–128 (1982).
47. Roach, B., Kim, Y., Jerome, E. & Michael, A. F. Influence of age and sex on serum complement components in children. *Am J Dis Child.* **135**, 918–920 (1981). doi:10.1001/archpedi.1981.02130340030011.
48. Norman, M. E., Gall, E. P., Taylor, A., Laster, L. & Nilsson, U. R. Serum complement profiles in infants and children. *J Pediatr.* **87**, 912–916 (1975). doi:https://doi.org/10.1016/S0022-3476(75)80904-8.
49. Wolach, B., Dolfin, T., Regev, R., Gilboa, S. & Schlesinger, M. The development of the complement system after 28 weeks' gestation. *Acta Paediatr.* **86**, 523–527 (1997). doi:https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1997.tb08924.x.
50. Drossou, V. *et al.* Concentrations of main serum opsonins in early infancy. *Arch Dis Child.* **72**, F172–F175 (1995). doi:10.1136/fn.72.3.f172.
51. Davis, C. A., Vallota, E. H. & Forristal, J. Serum Complement Levels in Infancy: Age Related Changes. *Pediatr Res.* **13**, 1043–1046 (1979). doi:10.1203/00006450-197909000-00019.
52. Fireman, P., Zuchowski, D. A. & Taylor, P. M. Development of Human Complement System. *J Immunol.* **103**, 25–31 (1969).
53. Bayram, R. O., Özdemir, H., Emsen, A., Türk Dağı, H. & Artaç, H. Reference ranges for serum immunoglobulin (IgG, IgA, and IgM) and IgG subclass levels in healthy children. *Turki J Med Sci.* **49**, 497–505 (2019). doi:10.3906/sag-1807-282.
54. Nassar, M. Y., Salah, M. M., Shamahy, H. A. Al, Magrami, R. T. F. AL & Moyed, K. A. Al.

Immunoglobulin Levels (IgG, IgM And IgA): Normal Values for Healthy Infants and Children in Sana'a City-Yemen. *Glob J of Ped & Neonatol Car.* **1**, 1–5 (2019).
doi:10.33552/gjpn.2019.01.000525.

55. Butler, J. E. Bovine immunoglobulins: An augmented review. *Vet Immunol Immunopathol.* **4**, 43–152 (1983). doi:10.1016/0165-2427(83)90056-9.
56. Nussey, D. H., Watt, K., Pilkington, J. G., Zamoyska, R. & Mcneilly, T. N. Age-related variation in immunity in a wild mammal population. *Aging Cell.* **11**, 178–180 (2012). doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00771.x.
57. Tonk, E. C. M., Piersma, A. H. & Loveren, H. Van. Reproductive and Developmental Immunology. in *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (ed. McQueen, C. A.) vol. 5 249–269 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00614-X.
58. Niers, L., Stasse-wolthuis, M., Rombouts, F. M. & Rijkers, G. T. Nutritional Support for the Infant's Immune System. *Nutr Rev.* **65**, 347–360 (2007). doi:10.1301/nr.2007.aug.347.
59. Martin, L. B., Weil, Z. M. & Nelson, R. J. Seasonal changes in vertebrate immune activity : mediation by physiological trade-offs. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* **363**, 321–339 (2008). doi:10.1098/rstb.2007.2142.
60. Lochmiller, R. L. & Deerenberg, C. Trade-offs in evolutionary immunology : just what is the cost of immunity ? *Oikos.* **88**, 87–98 (2000).
61. van der Most, P. J., de Jong, B., Parmentier, H. K. & Verhulst, S. Trade-off between growth and immune function : a meta-analysis of selection experiments. *Funct Ecol.* **25**, 74–80 (2011). doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01800.x.
62. Zuk, M. & Stoehr, A. M. Immune Defense and Host Life History. *Am Nat.* **160**, S9–S22 (2002). doi:10.1086/342131.
63. Klasing, K. C. Nutrition and the immune system. *Br Poult Sci.* **48**, 525–537 (2007). doi:10.1080/00071660701671336.
64. Demas, G. E. *et al.* Metabolic costs of mounting an antigen-stimulated immune response in adult

and aged C57BL/6J mice. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* **273**, 1631–1637 (1997).
doi:<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.5.R1631>.

65. Krasnov, B. R., Khokhlova, I. S., Arakelyan, M. S. & Degen, A. A. Is a starving host tastier? Reproduction in fleas parasitizing food-limited rodents. *Funct Ecol.* **19**, 625–631 (2005).
doi:10.1111/j.1365-2435.2005.01015.x.
66. Książek, A. & Konarzewski, M. Effect of dietary restriction on immune response of laboratory mice divergently selected for basal metabolic rate. *Physiol Biochem Zool.* **85**, 51–61 (2012).
doi:10.1086/663696.
67. Guillin, O. M., Vindry, C., Ohlmann, T. & Chavatte, L. Selenium, selenoproteins and viral infection. *Nutrients.* **11**, 1–33 (2019). doi:10.3390/nu11092101.
68. Lee, G. Y. & Han, S. N. The role of vitamin E in immunity. *Nutrients.* **10**, 1–18 (2018).
doi:10.3390/nu10111614.
69. Wu, G. Arginine and immune function. in *Diet, Immunity and Inflammation* (eds. Calder, P. C. & Yaqoob, P.) 523–543 (2013).
70. Klein, S. L., Jedlicka, A. & Pekosz, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect Dis.* **10**, 338–349 (2010). doi:10.1016/S1473-3099(10)70049-9.
71. Kotimaa, J. *et al.* Sex matters: Systemic complement activity of female C57BL/6J and BALB/cJ mice is limited by serum terminal pathway components. *Mol Immunol.* **76**, 13–21 (2016).
doi:10.1016/j.molimm.2016.06.004.
72. Moxley, G. *et al.* Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Arthritis Rheum.* **46**, 250–258 (2002).
doi:[https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200201\)46:1%3C250::AID-ART10064%3E3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200201)46:1%3C250::AID-ART10064%3E3.0.CO;2-T).
73. Grossman, C. J. Interactions Between the Gonadal Steroids and the Immune System. *Science.* **18**, 257–261 (1985). doi:10.1126/science.3871252.
74. Da Silva, J. A. P. Sex Hormones and Glucocorticoids: Interactions with the Immune System. *Ann NY Acad Sci.* **876**, 102–118 (1999). doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07628.x.
75. Alexander, J. & Stimson, W. H. Sex Hormones and the Course of Parasitic Infection. *Parasitol*

- Today*. **4**, 189–193 (1988). doi:10.1016/0169-4758(88)90077-4.
76. Barger, I. A. Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *Int J Parasitol*. **23**, 463–469 (1993). doi:https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90034-V.
77. Leitner, G., Heller, E. D. A. N. & Friedman, A. Sex-related differences in immune response and survival rate of Broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol*. **21**, 249–260 (1989). doi:https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90035-4.
78. Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G. & Grubeck-Loebenstein, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell*. **14**, 309–321 (2015). doi:10.1111/accel.12326.
79. Butterworth, M., McClellan, B. & Allansmith, M. Influence of Sex on Immunoglobulin Levels. *Nature*. **214**, 1224–1225 (1967). doi:10.1038/2141224a0.
80. Tartakovsky, B., De Baetselier, P., Feldman, M. & Segal, S. Sex-Associated differences in the Immune Response against Fetal Major Histocompatibility Antigens. *Transplantation*. **36**, 191–197 (1983). doi:10.1097/00007890-198308000-00017.
81. Weinstein, Y., Ran, S. & Segal, S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol*. **132**, 656–61 (1984).
82. Hannah, M. F., Bajic, V. B. & Klein, S. L. Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain Behav Immun*. **22**, 503–516 (2008). doi:10.1016/j.bbi.2007.10.005.
83. Harkness, T. *et al.* Immunoglobulin G and immunoglobulin G subclass concentrations differ according to sex and race. *Ann Allergy Asthma Immunol*. **125**, 190–195 (2020). doi:10.1016/j.anai.2020.03.018.
84. Molleda, C. *et al.* Concentraciones plasmáticas de IgG, IgGT, IgM e IgA en el caballo de Pura Raza Española. *Vet Mex*. **28**, 209–213 (1997).
85. Pomorska-Mól, M., Krzysiak, M. K., Larska, M. & Włodarek, J. The First Report of

Immunoglobulin G, M, and A Concentrations in Serum of European Bison and Their Changes with Age. *J Immunol Res.* **2020**, (2020). doi:10.1155/2020/2614317.

86. Cheynel, L. *et al.* Immunosenescence patterns differ between populations but not between sexes in a long-lived mammal. *Sci Rep.* **7**, 1–11 (2017). doi:10.1038/s41598-017-13686-5.
87. Asai, K. *et al.* Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock.* **16**, 340–343 (2001). doi:10.1097/00024382-200116050-00003. PMID: 11699070.
88. Aomatsu, M., Kato, T., Kasahara, E. & Kitagawa, S. Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ . *Biochem Biophys Res Commun.* **441**, 220–225 (2013). doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.042.
89. Da Costa, M. G. *et al.* Age and sex-associated changes of complement activity and complement levels in a healthy caucasian population. *Front Immunol.* **9**, 1–14 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.02664.
90. Bianchi, I., Lleo, A., Gershwin, M. E. & Invernizzi, P. The X chromosome and immune associated genes. *J Autoimmun.* **38**, 187–192 (2012). doi:10.1016/j.jaut.2011.11.012.
91. Schuurs, A. H. W. M. & Verheul, H. A. M. Effects of Gender and Sex Steroids on the Immune Response. *J Steroid Biochem.* **35**, 157–172 (1990). doi:10.1016/0022-4731(90)90270-3.
92. Foo, Y. Z., Nakagawa, S., Rhodes, G. & Simmons, L. W. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biol Rev.* **92**, 551–571 (2016). doi:10.1111/brv.12243.
93. Metcalf, C. J. E. & Graham, A. L. Schedule and magnitude of reproductive investment under immune trade-offs explains sex differences in immunity. *Nat Commun.* **9**, (2018). doi:10.1038/s41467-018-06793-y.
94. Withers, P. C., Cooper, C. E., Maloney, S. K., Bozinovic, F. & Cruz-Neto, A. P. *Ecological and Environmental Physiology of Mammals*. (Oxford University Press, 2016).
95. Williams, T. D., Christians, J. K., Aiken, J. J. & Evanson, M. Enhanced immune function does not depress reproductive output. *Proc R Soc Lond B.* **266**, 753–757 (1999).

doi:10.1098/rspb.1999.0701.

96. Bleu, J., Massot, M., Haussy, C. & Meylan, S. Experimental litter size reduction reveals costs of gestation and delayed effects on offspring in a viviparous lizard. *Proc R Soc Lond B*. **279**, 489–498 (2012). doi:10.1098/rspb.2011.0966.
97. Ilmonen, P., Hasselquist, D., Langefors, Å. & Wiehn, J. Stress, immunocompetence and leukocyte profiles of pied flycatchers in relation to brood size manipulation. *Oecologia*. **136**, 148–154 (2003). doi:10.1007/s00442-003-1243-2.
98. Li, D. *et al.* Changes in phytohaemagglutinin skin-swelling responses during the breeding season in a multi-brooded species, the Eurasian Tree Sparrow: do males with higher testosterone levels show stronger immune responses? *J Ornithol*. **156**, 133–141 (2015). doi:10.1007/s10336-014-1104-2.
99. Xu, Y., Yang, D. & Wang, D. No Evidence for a Trade-Off between Reproductive Investment and Immunity in a Rodent. *PLoS One*. **7**, 1–11 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0037182.
100. Lindén, M. & Moller, A. P. Cost of Reproduction and Covariation of Life History Traits in Birds. *Trends Ecol Evol*. **4**, 367–371 (1989). doi:10.1016/0169-5347(89)90101-8.
101. Koivula, M., Koskela, E., Mappes, T. & Oksanen, T. A. Cost of Reproduction in the Wild : Manipulation of Reproductive Effort in the Bank Vole. *Ecology*. **84**, 398–405 (2003).
102. Speakman, J. R. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. **363**, 375–398 (2008). doi:10.1098/rstb.2007.2145.
103. Harshman, L. G. & Zera, A. J. The cost of reproduction : the devil in the details. *Trends Ecol Evol*. **22**, 80–86 (2006). doi:10.1016/j.tree.2006.10.008.
104. Gittleman, J. L. & Thompson, S. D. Energy Allocation in Mammalian Reproduction. *Amer Zool*. **28**, 863–875 (1988).
105. Ardia, D. R. Tree Swallows Trade Off Immune Function and Reproductive Effort Differently Across Their Range. *Ecology*. **86**, 2040–2046 (2005). doi:10.1890/04-1619.
106. Ardia, D. R. Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune

- function in tree swallows. *J Anim Ecol.* **74**, 517–524 (2005). doi:10.1111/j.1365-2656.2005.00950.x.
107. Zuk, M. Disease, Endocrine-Immune Interactions, and Sexual Selection. *Ecology.* **77**, 1037–1042 (1996). doi:10.2307/2265574.
108. Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P. & Wolfner, M. F. Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. *Annu Rev Entomol.* **61**, 239–256 (2016). doi:10.1146/annurev-ento-010715-023924.
109. Adamo, S. A., Jensen, M. & Younger, M. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*)*: Trade-offs between immunity and reproduction. *Anim Behav.* **62**, 417–425 (2001). doi:10.1006/anbe.2001.1786.
110. Brokordt, K. *et al.* Reproduction immunity trade-off in a mollusk: Hemocyte energy metabolism underlies cellular and molecular immune responses. *Front Physiol.* **10**, 1–16 (2019). doi:10.3389/fphys.2019.00077.
111. Cichoń, M., Dubiec, A. & Chadzińska, M. The effect of elevated reproductive effort on humoral immune function in collared flycatcher females. *Acta Oecol.* **22**, 71–76 (2001). doi:10.1016/S1146-609X(00)01094-8.
112. Bonneaud, C. *et al.* Assessing the cost of mounting an immune response. *Am Nat.* **161**, 367–379 (2003). doi:10.1086/346134.
113. Ilmonen, P., Taarna, T. & Hasselquist, D. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proc R Soc Lond B.* **267**, 665–670 (2000). doi:10.1098/rspb.2000.1053.
114. Deerenberg, C., Arpanius, V., Daan, S. & Bos, N. Reproductive effort decreases antibody responsiveness. *Proc R Soc Lond B.* **264**, 1021–1029 (1997). doi:10.1098/rspb.1997.0141.
115. Saino, N., Incaglia, M., Martinelli, R. & Møller, A. P. Immune response of male barn swallows in relation to parental effort, corticosterone plasma levels, and sexual ornamentation. *Behav Ecol.* **13**, 169–174 (2002). doi:10.1093/beheco/13.2.169.
116. Knowles, S. C. L., Nakagawa, S. & Sheldon, B. C. Elevated reproductive effort increases blood

- parasitaemia and decreases immune function in birds: A meta-regression approach. *Funct Ecol.* **23**, 405–415 (2009). doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01507.x.
117. Sanz, J. J., Moreno, J., Merino, S. & Tomás, G. A trade-off between two resource-demanding functions : post-nuptial moult and immunity during reproduction in male pied flycatchers. *J Anim Ecol.* **73**, 441–447 (2004). doi:https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00815.x.
118. Verhulst, S., Riedstra, B. & Wiersma, P. Brood size and immunity costs in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *J Avian Biol.* **36**, 22–30 (2005). doi:10.1111/j.0908-8857.2005.03342.x.
119. Edler, R., Goymann, W., Schwabl, I. & Friedl, T. W. P. Experimentally elevated testosterone levels enhance courtship behaviour and territoriality but depress acquired immune response in Red Bishops *Euplectes orix*. *Ibis.* **153**, 46–58 (2011). doi:10.1111/j.1474-919X.2010.01075.x.
120. Josefson, C. C., Zohdy, S. & Hood, W. R. Methodological Considerations for Assessing Immune Defense in Reproductive Females. *Integr Comp Biol.* **60**, 732–741 (2020). doi:10.1093/icb/icaa098.
121. Medina, B. K. L., Smithson, G. & Kincade, P. W. Suppression of B Lymphopoiesis during Nomial Pregnancy. *J Exp Med.* **178**, 1507–1515 (1993). doi:10.1084/jem.178.5.1507.
122. Drazen, D. L., Trasy, A. & Nelson, R. J. Photoperiod differentially affects energetics of immunity in pregnant and lactating Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Can J Zool.* **81**, 1406–1413 (2003). doi:10.1139/Z03-120.
123. Saino, N., Canova, L., Fasola, M. & Martinelli, R. Reproduction and Population Density Affect Humoral Immunity in Bank Voles under Field Experimental Conditions. *Oecologia.* **124**, 358–366 (2000). doi:10.1007/s004420000395.
124. Martin, S. M., Malkinson, T. J., Veale, W. L. & Pittman, Q. J. Fever in pregnant, parturient, and lactating rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* **268**, R919–R923 (1995). doi:10.1152/ajpregu.1995.268.4.R919.
125. French, S. S., Johnston, G. I. H. & Moore, M. C. Immune activity suppresses reproduction in food-limited female tree lizards *Urosaurus ornatus*. *Funct Ecol.* **21**, 1115–1122 (2007). doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01311.x.

126. Cox, R. M. *et al.* Experimental evidence for physiological costs underlying the trade-off between reproduction and survival. *Funct Ecol.* **24**, 1262–1269 (2010). doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01756.x.
127. Bourgeon, S., Martínez, J., Criscuolo, F., Maho, Y. Le & Raclot, T. Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders. *Gen Comp Endocrinol.* **147**, 336–342 (2006). doi:10.1016/j.yggen.2006.02.006.
128. Alonso-Alvarez, C. & Tella, J. L. Effects of experimental food restriction and body-mass changes on the avian T-cell-mediated immune response. *Can J Zool.* **79**, 101–105 (2001). doi:10.1139/cjz-79-1-101.
129. Hau, M. Regulation of male traits by testosterone: Implications for the evolution of vertebrate life histories. *BioEssays.* **29**, 133–144 (2007). doi:10.1002/bies.20524.
130. Negro, S. S., Caudron, A. K., Dubois, M., Delahaut, P. & Gemmill, N. J. Correlation between male social status, testosterone levels, and parasitism in a dimorphic polygynous mammal. *PLoS One.* **5**, 1–8 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0012507.
131. Ezenwa, V. O., Ekernas, L. S. & Creel, S. Unravelling complex associations between testosterone and parasite infection in the wild. *Funct Ecol.* **26**, 123–133 (2012). doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01919.x.
132. Ruiz, M., French, S. S., Demas, G. E. & Martins, E. P. Food supplementation and testosterone interact to influence reproductive behavior and immune function in *Sceloporus graciosus*. *Horm Behav.* **57**, 134–139 (2010). doi:10.1016/j.yhbeh.2009.09.019.
133. Kanda, N., Tsuchida, T. & Tamaki, K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol.* **106**, 410–415 (1996). doi:10.1046/j.1365-2249.1996.d01-842.x.
134. Voogt, J. Control of hormone release during lactation. *Clin Obs Gynaecol.* **5**, 433–455 (1978).
135. Neville, M. C., McFadden, T. B. & Forsyth, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **7**, 49–66 (2002). doi:10.1023/A:1015770423167.

136. Taneja, V. Sex hormones determine immune response. *Front Immunol.* **9**, 1–5 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.01931.
137. Schindler, A. E. Immunology and progestins in pregnancy. *Gynecol Endocrinol.* **13**, 47–50 (1999). doi:10.1080/gye.13.s4.47.50.
138. Khan, D. & Ansar Ahmed, S. The Immune system is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* **6**, 1–8 (2016). doi:10.3389/fimmu.2015.00635.
139. Cutolo, M. *et al.* Estrogens and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci.* **1089**, 538–547 (2006). doi:10.1196/annals.1386.043.
140. Butts, C. L. *et al.* Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol.* **19**, 287–296 (2007). doi:10.1093/intimm/dx1145.
141. Jones, L. A. *et al.* Differential Modulation of TLR3- and TLR4-Mediated Dendritic Cell Maturation and Function by Progesterone. *J Immunol.* **185**, 4525–4534 (2010). doi:10.4049/jimmunol.0901155.
142. Kooijman, R., Hooghe-Peters, E. L. & Hooghe, R. Prolactin, Growth Hormone, and Insulin-like Growth Factor-I in the Immune System. in *Advances in Immunology* (ed. Dixon, F. J.) 377–454 (Academic Press, 1996).
143. Nunn, C. L., Gittleman, J. L. & Antonovics, J. Promiscuity and the primate immune system. *Science.* **290**, 1168–1170 (2000). doi:10.1126/science.290.5494.1168.
144. McLeod, D. V. & Day, T. Sexually transmitted infection and the evolution of serial monogamy. *Proc R Soc Lond B.* **281**, (2014). doi:10.1098/rspb.2014.1726.
145. Wlasiuk, G. & Nachman, M. W. Promiscuity and the rate of molecular evolution at primate immunity genes. *Evolution.* **64**, 2204–2220 (2010). doi:10.1111/j.1558-5646.2010.00989.x.
146. Tieleman, B. I. Understanding immune function as a pace of life trait requires environmental context. *Behav Ecol Sociobiol.* **72**, (2018). doi:10.1007/s00265-018-2464-z.
147. Barclay, R. M. R. & Harder, L. D. Life Histories of Bats: Life in the Slow Lane. in *Ecology of*

Bats (eds. Kunz, T. H. & Fenton, M. B.) 209–246 (University of Chicago Press, 2003).

148. Dingle, H. & Drake, A. What is migration? *Bioscience*. **57**, 113–121 (2007).
doi:10.1641/B570206.
149. Avgar, T., Street, G. & Fryxell, J. M. On the adaptive benefits of mammal migration. *Can J Zool*. **92**, 481–490 (2014). doi:https://doi.org/10.1139/cjz-2013-0076.
150. Owen, J. C. & Moore, F. R. Relationship between energetic condition and indicators of immune function in thrushes during spring migration. *Can J Zool*. **86**, 638–647 (2008). doi:10.1139/Z08-038.
151. Sapir, N., Butler, P. J., Hedenström, A. & Wikelski, M. Energy gain and use during animal migration. in *Animal Migration* (eds. Milner-Gulland, E. J., Fryxell, J. M. & Sinclair, A. R. E.) 52–66 (Oxford University Press, 2011). doi:10.1093/acprof. doi:10.1093/acprof.
152. Jenni-Eiermann, S., Jenni, L., Smith, S. & Costantini, D. Oxidative Stress in Endurance Flight: An Unconsidered Factor in Bird Migration. *PLoS One*. **9**, e97650 (2014).
doi:10.1371/journal.pone.0097650.
153. Costantini, D., Lindecke, O., Petersons, G. & Voigt, C. C. Migratory flight imposes oxidative stress in bats. *Curr Zool*. **65**, 147–153 (2018). doi:10.1093/cz/zoy039.
154. Wang, D., Malo, D. & Hekimi, S. Elevated Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation Affects the Immune Response via Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Long-Lived Mcl1 +/- Mouse Mutants. *J Immunol*. **184**, 582–590 (2010). doi:10.4049/jimmunol.0902352.
155. Cram, D. L., Blount, J. D., York, J. E. & Young, A. J. Immune response in a wild bird is predicted by oxidative status, but does not cause oxidative stress. *PLoS One*. **10**, e0122421 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0122421.
156. Tobler, M., Ballen, C., Healey, M., Wilson, M. & Olsson, M. Oxidant Trade-Offs in Immunity: An Experimental Test in a Lizard. *PLoS One*. **10**, e0126155 (2015).
doi:10.1371/journal.pone.0126155.
157. Biller-Takahashi, J. D., Takahashi, L. S., Mingatto, F. E. & Urbinati, E. C. The immune system is

- limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Fish Shellfish Immunol.* **47**, 360–367 (2015). doi:10.1016/j.fsi.2015.09.022.
158. Nebel, S. *et al.* Constitutive immune function in European starlings, *Sturnus vulgaris*, is decreased immediately after an endurance flight in a wind tunnel. *J Exp Biol.* **215**, 272–278 (2012). doi:10.1242/jeb.057885.
159. Owen, J. C. & Moore, F. R. Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *Condor.* **108**, 389–398 (2006). doi:10.1093/condor/108.2.389.
160. Eikenaar, C. & Hegemann, A. Migratory common blackbirds have lower innate immune function during autumn migration than resident conspecifics. *Biol Lett.* **12**, 78–81 (2016). doi:10.1098/rsbl.2016.0078.
161. Eikenaar, C., Isaksson, C. & Hegemann, A. A hidden cost of migration ? Innate immune function versus antioxidant defense. *Ecol Evol.* 2721–2728 (2018) doi:10.1002/ece3.3756. doi:10.1002/ece3.3756.
162. Hegemann, A., Matson, K. D., Both, C. & Tieleman, B. I. Immune function in a free-living bird varies over the annual cycle, but seasonal patterns differ between years. *Oecologia.* **170**, 605–618 (2012). doi:10.1007/s00442-012-2339-3.
163. Owen, J. C. & Moore, F. R. Swainson’s thrushes in migratory disposition exhibit reduced immune function. *J Ethol.* **26**, 383–388 (2008). doi:10.1007/s10164-008-0092-1.
164. Hegemann, A., Matson, K. D., Versteegh, M. A., Villegas, A. & Tieleman, B. I. Immune response to an endotoxin challenge involves multiple immune parameters and is consistent among the annual-cycle stages of a free-living temperate zone bird. *J Exp Biol.* **216**, 2573–2580 (2013). doi:10.1242/jeb.083147.
165. Hasselquist, D., Lindström, A., Jenni-Eiermann, S., Koolhaas, A. & Piersma, T. Long flights do not influence immune responses of a long-distance migrant bird: a wind-tunnel experiment. *J Exp Biol.* **210**, 1123–1131 (2007). doi:10.1242/jeb.02712.
166. Krauss, S. *et al.* Coincident ruddy turnstone migration and horseshoe crab spawning creates an

ecological ‘ hot spot ’ for influenza viruses. *Proc R Soc B*. **277**, 3373–3379 (2010).
doi:10.1098/rspb.2010.1090.

167. Waldenström, J., Bensch, S., Kiboi, S., Hasselquist, D. & Ottosson, U. Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Mol Ecol*. **11**, 1545–1554 (2002). doi:10.1046/j.1365-294x.2002.01523.x.
168. Figuerola, J. & Green, A. J. Haematozoan parasites and migratory behaviour in waterfowl. *Evol Ecol*. **14**, 143–153 (2000). doi:10.1023/A:1011009419264.
169. Møller, A. P. & Erritzøe, J. Host immune defence and migration in birds. *Evol Ecol*. **12**, 945–953 (1998). doi:10.1023/A:1006516222343.
170. Altizer, S. M., Oberhauser, K. S. & Brower, L. P. Associations between host migration and the prevalence of a protozoan parasite in natural populations of adult monarch butterflies. *Ecol Entomol*. **25**, 125–129 (2000).
171. Altizer, S., Altizer, S., Bartel, R. & Han, B. A. Animal Migration and Infectious Disease Risk. *Science*. **331**, 296–302 (2011). doi:10.1126/science.1194694.
172. Rodrigues, L. & Palmeirim, J. M. Migratory behaviour of the Schreiber’s bat: when, where and why do cave bats migrate in a Mediterranean region? *J Zool*. **274**, 116–125 (2008).
doi:10.1111/j.1469-7998.2007.00361.x.
173. Folstad, I., Nilssen, A. C., Halvorsen, O. & Andersen, J. Parasite avoidance: the cause of post-calving migrations in Rangifer? *Can J Zool*. **69**, 2423–2429 (1991). doi:10.1139/z91-340.
174. Voigt, C. C. *et al.* The immune response of bats differs between pre-migration and migration seasons. *Sci Rep*. **10**, (2020). doi:10.1038/s41598-020-74473-3.
175. Fleming, T. H. & Eby, P. Ecology of Bat Migration. in *Bat Ecology* (eds. Kunz, T. H. & Fenton, B. M.) 156–197 (The University of Chicago Press, 2003).
176. Boughton, R. K., Joop, G. & Armitage, S. A. O. Outdoor immunology : methodological considerations for ecologists. *Funct Ecol*. **25**, 81–100 (2011). doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01817.x.

177. Fleming, T. H., Nuñez, R. A. & Sternberg, L. da S. L. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia*. **94**, 72–75 (1993). doi:10.1007/BF00317304.
178. French, S. S. & Neuman-lee, L. A. Improved ex vivo method for microbiocidal activity across vertebrate species. *Biol Open*. (2012) doi:10.1242/bio.2012919. doi:10.1242/bio.2012919.
179. Merchant, M. E., Roche, C., Elsey, R. M. & Prudhomme, J. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol*. **136**, 505–513 (2003). doi:10.1016/S1096-4959(03)00256-2.
180. Millet, S., Bennett, J., Lee, K. A., Hau, M. & Klasing, K. C. Quantifying and comparing constitutive immunity across avian species. *Dev Comp Immunol*. **31**, 188–201 (2007). doi:10.1016/j.dci.2006.05.013.
181. Cardile, A. P. *et al.* Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance in Vitro. *BMC Res Notes*. **7**, 1–9 (2014). doi:10.1186/1756-0500-7-457.
182. Navarre, W. W. & Schneewind, O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*. **63**, 174–229 (1999). doi:10.1128/MMBR.63.1.174-229.1999.
183. Keusch, G. T., Douglas, S. D. & Ugurbil, K. Intracellular bactericidal activity of leukocytes in whole blood for the diagnosis of chronic granulomatous disease of childhood. *J Infect Dis*. **131**, 584–587 (1975). doi:10.1093/infdis/131.5.584.
184. Lin, T. *et al.* Different Bactericidal and Inflammatory Activities of Human and Mouse Blood. *Shock*. **52**, E85–E91 (2019). doi:10.1097/SHK.0000000000001302.
185. Tieleman, B. I., Williams, J. B., Ricklefs, R. E. & Klasing, K. C. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proc R Soc Lond B*. **272**, 1715–1720 (2005). doi:10.1098/rspb.2005.3155.
186. Martin, L. B., Weil, Z. M. & Nelson, R. J. Immune Defense and Reproductive Pace of Life in *Peromyscus* Mice. *Ecology*. **88**, 2516–2528 (2007). doi:10.1890/07-0060.1.

187. French, S. S., Denardo, D. F., Greives, T. J., Strand, C. R. & Demas, G. E. Human disturbance alters endocrine and immune responses in the Galapagos marine iguana (*Amblyrhynchus cristatus*). *Horm Behav.* **58**, 792–799 (2010). doi:10.1016/j.yhbeh.2010.08.001.
188. Matson, K. D. *et al.* Capture Stress and the Bactericidal Competence of Blood and Plasma. *Physiol Biochem Zool.* **79**, 556–564 (2006).
189. Heinrich, S. K. *et al.* Feliform carnivores have a distinguished constitutive innate immune response. *Biol Open.* **5**, 550–555 (2016). doi:10.1242/bio.014902.
190. de Assis, R. V., Titon Monteiro, C. S., Barsotti Giorgi, Maria, A., Spira, B. & Gomes, F. R. Antimicrobial Capacity of Plasma from Anurans of the Atlantic Forest. *South Am J Herpetol.* **8**, 155–160 (2013). doi:10.2994/SAJH-D-13-00007.1.
191. Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R. & Roitt, I. M. Innate Immunity. in *Roitt's Essential Immunology* 3–34 (John Wiley and Sons, 2011).
192. Natoli, G. & Ostuni, R. Adaptation and memory in immune responses. *Nat Immunol.* **20**, 783–792 (2019). doi:10.1038/s41590-019-0399-9.
193. Hamon, M. A. & Quintin, J. Innate immune memory in mammals. *Semin Immunol.* **28**, 351–358 (2016). doi:10.1016/j.smim.2016.05.003.
194. Neoh, S. H., Jahoda, D. M., Rowe, D. S. & Voller, A. Immunoglobulin classes in mammalian species identified by cross-reactivity with antisera to human immunoglobulin. *Immunochemistry.* **10**, 805–813 (1973). doi:10.1016/0019-2791(73)90184-5.
195. Flajnik, M. F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet.* **11**, 47–59 (2010). doi:10.1038/nrg2703.
196. Miller, R. D. Those other mammals: The immunoglobulins and T cell receptors of marsupials and monotremes. *Semin Immunol.* **22**, 3–9 (2010). doi:10.1016/j.smim.2009.11.005.
197. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes : from structure to effector functions. *Front Immunol.* **5**, 1–17 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00520.
198. Thomson, C. A. IgG Structure and Function. in *Encyclopedia of Immunobiology* (ed. Ratcliffe, M.

- J. H.) vol. 2 15–22 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-374279-7.05002-5.
199. Ward, E. S., Zhou, J., Ghetie, V. & Ober, R. J. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int Immunol.* **15**, 187–195 (2003). doi:10.1093/intimm/dxg018.
200. Tvarijonaviciute, A., Martínez-Subiela, S., Caldin, M., Tecles, F. & Ceron, J. J. Evaluation of automated assays for immunoglobulin G, M, and A measurements in dog and cat serum. *Vet Clin Pathol.* **42**, 270–280 (2013). doi:10.1111/vcp.12069.
201. Norman, L. M., Hohenboken, W. D. & Kelley, K. W. Genetic Differences in Concentration of Immunoglobulins G1 and M in Serum and Colostrum of Cows and in Serum of Neonatal Calves. *J Anim Sci.* **53**, 1465–1472 (1981). doi:10.2527/jas1982.5361465x.
202. Gunti, S. & Notkins, A. L. Polyreactive Antibodies: Function and Quantification. *J Infect Dis.* **212**, S42–S46 (2015). doi:10.1093/infdis/jiu512.
203. Holodick, N. E., Rodríguez-Zhurbenko, N. & Hernández, A. M. Defining Natural Antibodies. *Front Immunol.* **8**, (2017). doi:10.3389/fimmu.2017.00872.
204. Ochsenbein, A. F. & Zinkernagel, R. M. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today.* **21**, 624–630 (2000). doi:10.1016/S0167-5699(00)01754-0.
205. Dati, F. *et al.* Consensus of a Group of Professional Societies and Diagnostic Companies on Guidelines for Interim Reference Ranges for 14 Proteins in Serum Based on the Standardization against the IFCC/BCR/CAP Reference Material (CRM 470). *Clin Chem Lab Med.* **34**, 517–520 (1996). doi:10.1515/cclm.1996.34.6.517.
206. Hill, P. B., Moriello, K. A. & DeBoer, D. J. Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* **44**, 105–113 (1995). doi:10.1016/0165-2427(94)05298-7.
207. Ježek, J., Malovrh, T. & Klinkon, M. Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) concentration in cows and their calves. *Acta Agric Slov.* **3**, 295–298 (2012).
208. Davis, C. P., Cohen, M. S., Anderson, M. D., Reinartz, J. A. & Warren, M. M. Total and specific

- immunoglobulin response to acute and chronic urinary tract infections in a rat model. *J Urol.* **138**, 1308–1317 (1987). doi:10.1016/S0022-5347(17)43590-7.
209. Akman, S., Güven, A. G., Ince, S. & Yeğin, O. IgG and IgG subclasses deficiency in children undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis and its provocative factors. *Pediatr Int.* **44**, 273–276 (2002). doi:10.1046/j.1442-200X.2002.01560.x.
210. Suliman, O. S. M., Salih, M. A. M., Karrar, Z. A., Mohammed, A. O. & Helsing, C. Infection and immunoglobulin levels in Sudanese children with severe protein-energy malnutrition. *Sudan J Paediatr.* **11**, 32–42 (2011).
211. Abolins, S. *et al.* The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus*. *Nat Commun.* **8**, 1–13 (2017). doi:10.1038/ncomms14811.
212. Abolins, S. R., Pocock, M. J. O., Hafalla, J. C. R., Riley, E. M. & Viney, M. E. Measures of immune function of wild mice, *Mus musculus*. *Mol Ecol.* **20**, 881–892 (2011). doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04910.x.
213. Devalapalli, A. P. *et al.* Increased levels of IgE and autoreactive, polyreactive IgG in wild rodents: Implications for the hygiene hypothesis. *Scand J Immunol.* **64**, 125–136 (2006). doi:10.1111/j.1365-3083.2006.01785.x.
214. Deniro, M. J. & Epstein, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim.* **42**, 495–506 (1978). doi:10.1016/0016-7037(78)90199-0.
215. Hobson, K. A. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia.* **120**, 314–326 (1999). doi:10.1007/s004420050865.
216. Alisauskas, R. T. & Hobson, K. A. Determination of lesser snow goose diets and winter distribution using stable isotope analysis. *J Wildl Manage.* **57**, 49–54 (1993). doi:10.2307/3808999.
217. Bender, M. M. Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation. *Phytochemistry.* **10**, 1239–1244 (1971). doi:10.1016/S0031-9422(00)84324-1.

218. Evans, K. L., Newton, J., Mallord, J. W. & Markman, S. Stable isotope analysis provides new information on winter habitat use of declining avian migrants that is relevant to their conservation. *PLoS One*. **7**, e34542 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0034542.
219. Carlisle, A. B. *et al.* Using stable isotope analysis to understand the migration and trophic ecology of northeastern Pacific white sharks (*Carcharodon carcharias*). *PLoS One*. **7**, e30492 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0030492.
220. Trueman, C. N., Mackenzie, K. M. & Palmer, M. R. Identifying migrations in marine fishes through stable-isotope analysis. *J Fish Biol.* **81**, 826–847 (2012). doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03361.x.
221. Vander Zanden, M. J., Clayton, M. K., Moody, E. K., Solomon, C. T. & Weidel, B. C. Stable isotope turnover and half-life in animal tissues: A literature synthesis. *PLoS One*. **10**, e0116182 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0116182.
222. McNab, B. K. Evolutionary Alternatives in the Physiological Ecology of Bats. in *Ecology of Bats* (ed. Kunz, T. H.) 151–200 (Plenum Press Corporation, 1982). doi:10.1007/978-1-4613-3421-7_4. doi:10.1007/978-1-4613-3421-7_4.
223. Simmons, N. B. & Conway, T. M. Evolution of Ecological Diversity in Bats. in *BAT ECOLOGY* (eds. Kunz, T. H. & Fenton, M. B.) (The university of Chicago Press, 2003).
224. O’Shea, T. J. *et al.* Bat flight and zoonotic viruses. *Emerg Infect Dis.* **20**, 741–745 (2014). doi:10.3201/eid2005.130539.
225. Shen, Y. *et al.* Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. *PNAS.* **107**, 8666–8671 (2010). doi:10.1073/pnas.0912613107.
226. Zhang, G. *et al.* Comparative Analysis of Bat Genomes Provides Insight into the Evolution of Flight and Immunity. *Science.* **339**, 456–460 (2013). doi:10.1126/science.1230835.
227. Allocati, N. *et al.* Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. *Cell Death Discov.* **2**, (2016). doi:10.1038/cddiscovery.2016.48.
228. Racey, P. A. The Uniqueness of Bats. in *Bats and Viruses* (eds. Wang, L. & Cowled, C.) 1–15

(John Wiley & Sons, 2015). doi:doi:10.1002/9781118818824.ch14.

doi:doi:10.1002/9781118818824.ch14.

229. Allen, L. C. *et al.* Roosting ecology and variation in adaptive and innate immune system function in the Brazilian free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*). *J Comp Physiol B*. **179**, 315–323 (2009). doi:10.1007/s00360-008-0315-3.
230. Schneeberger, K., Czirják, G. Á. & Voigt, C. C. Measures of the Constitutive Immune System Are Linked to Diet and Roosting Habits of Neotropical Bats. *PLoS One*. **8**, (2013). doi:10.1371/journal.pone.0054023.
231. Dietrich, M., Mühldorfer, K., Tortosa, P. & Markotter, W. Leptospira and Bats : Story of an Emerging Friendship. *PLoS Pathog*. **11**, e1005176 (2015). doi:10.1371/journal.ppat.1005176.
232. Mühldorfer, K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. *Zoonoses Public Health*. **60**, 93–103 (2013). doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x.
233. Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V & Schountz, T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*. **19**, 531–545 (2006). doi:10.1128/CMR.00017-06.
234. Paweska, J. T. *et al.* Experimental Inoculation of Egyptian Fruit Bats (*Rousettus aegyptiacus*) with Ebola Virus. *Viruses*. **8**, 1–11 (2016). doi:10.3390/v8020029.
235. Kuzmin, I. V *et al.* Innate Immune Responses of Bat and Human Cells to Filoviruses: Commonalities and Distinctions. *J Virol*. **91**, 1–22 (2017). doi:10.1128/JVI.02471-16.
236. Banerjee, A. *et al.* Generation and Characterization of *Eptesicus fuscus* (Big brown bat) kidney cell lines immortalized using the *Myotis polyomavirus* large T-antigen. *J Virol Methods*. **237**, 166–173 (2016). doi:10.1016/j.jviromet.2016.09.008.
237. Cowled, C., Baker, M. L., Zhou, P., Tachedjian, M. & Wang, L. Molecular characterisation of RIG-I-like helicases in the black flying fox , *Pteropus alecto*. *Dev Comp Immunol*. **36**, 657–664 (2012). doi:10.1016/j.dci.2011.11.008.
238. Cowled, C. *et al.* Molecular characterisation of Toll-like receptors in the black flying fox *Pteropus alecto*. *Dev Comp Immunol*. **35**, 7–18 (2011). doi:10.1016/j.dci.2010.07.006.

239. Martínez Gómez, J. M. *et al.* Phenotypic and functional characterization of the major lymphocyte populations in the fruit-eating bat *Pteropus alecto*. *Sci Rep.* **6**, 1–13 (2016). doi:10.1038/srep37796.
240. Cramer, G. *et al.* Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One.* **4**, e8266 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0008266.
241. Baker, M. L. & Zhou, P. Bat Immunology. in *Bats and Viruses* (eds. Wang, L. & Cowled, C.) 327–342 (John Wiley & Sons, 2015). doi:10.1002/9781118818824.ch14. doi:10.1002/9781118818824.ch14.
242. Pavlovich, S. S. *et al.* The Egyptian Rousette Genome Reveals Unexpected Features of Bat Antiviral Immunity. *Cell.* **173**, 1098–1110 (2018). doi:10.1016/j.cell.2018.03.070.
243. De La Cruz-Rivera, P. C. *et al.* The IFN Response in Bats Displays Distinctive IFN-Stimulated Gene Expression Kinetics with Atypical RNASEL Induction. *J Immunol.* **200**, 209–217 (2018). doi:10.4049/jimmunol.1701214.
244. Towner, J. S. *et al.* Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog.* **5**, e1000536 (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000536.
245. Leroy, E. M. *et al.* Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* **438**, 575–576 (2005). doi:https://doi.org/10.1038/438575a.
246. Williamson, M., Hooper, P. & Selleck, P. Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp.* (2000).
247. Swanepoel, R. *et al.* Experimental Inoculation of Plants and Animals with Ebola Virus. *Emerg Infect Dis.* **2**, 321–325 (1996). doi:10.3201/eid0204.960407.
248. Omatsu, T., Bak, E., Ishii, Y. & Kyuwa, S. Induction and sequencing of Rousette bat interferon α and β genes. *Vet Immunol Immunopathol.* **124**, 169–176 (2008). doi:10.1016/j.vetimm.2008.03.004.
249. Banerjee, A., Rapin, N., Bollinger, T. & Misra, V. Lack of inflammatory gene expression in bats: a unique role for a transcription repressor. *Sci Rep.* **7**, 1–15 (2017). doi:10.1038/s41598-017-

01513-w.

250. Ahn, M. *et al.* Dampened NLRP3-mediated inflammation in bats and implications for a special viral reservoir host. *Nat Microbiol.* **4**, 789–799 (2019). doi:10.1038/s41564-019-0371-3.
251. Ahn, M., Cui, J., Irving, A. T. & Wang, L. Unique Loss of the PYHIN Gene Family in Bats Amongst Mammals : Implications for Inflammasome Sensing. *Nat Publ Gr.* **6**, 1–7 (2016). doi:10.1038/srep21722.
252. Kacprzyk, J. *et al.* A Potent Anti-Inflammatory Response in Bat Macrophages May Be Linked to Extended Longevity and Viral Tolerance. *Acta Chiropt.* **19**, 219–228 (2017). doi:10.3161/15081109ACC2017.19.2.001.
253. Zhou, P. *et al.* IRF7 in the Australian black flying fox, *Pteropus alecto*: Evidence for a unique expression pattern and functional conservation. *PLoS One.* **9**, e103875 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0103875.
254. Zhou, P. *et al.* Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN- α in bats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 2696–2701 (2016). doi:10.1073/pnas.1518240113.
255. Xie, J. *et al.* Dampened STING-Dependent Interferon Activation in Bats. *Cell Host Microbe.* **23**, 297–301 (2018). doi:10.1016/j.chom.2018.01.006.
256. Thomas, S. P. & Suthers, R. A. The Physiology and Energetics of Bat Flight. *J Exp Biol.* **57**, 317–335 (1972).
257. Hock, R. J. The Metabolic Rates and Body Temperatures of Bats. *Biol Bull.* **101**, 289–299 (1951). doi:10.2307/1538547.
258. Frisard, M. & Ravussin, E. Energy Metabolism and Oxidative Stress. *Endocr* **29**, 27–32 (2006). doi:10.1385/ENDO:29:1:27.
259. Demas, G. E., Greives, T., Chester, E. & French, S. The Energetics of Immunity. in *ECOIMMUNOLOGY* 259–296 (Oxford University Press, 2012).
260. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* **454**, 428–435 (2008). doi:10.1038/nature07201.

261. Santana Lima, V. F. *et al.* Survey on helminths and protozoa of free-living Neotropical bats from Northeastern Brazil. *Acta Trop.* **185**, 267–272 (2018). doi:10.1016/j.actatropica.2018.06.002.
262. Johnson, L. J. A. N. *et al.* Psychrophilic and psychrotolerant fungi on bats and the presence of *Geomyces* spp. on bat wings prior to the arrival of white nose syndrome. *Appl Environ Microbiol.* **79**, 5465–5471 (2013). doi:10.1128/AEM.01429-13.
263. Mok, W. Y., Luizao, R. C. . & Barreto Da Silva, M. S. Isolation of fungi from bats of the Amazon Basin. *Appl Environ Microbiol.* **44**, 570–575 (1982). doi:10.1128/aem.44.3.570-575.1982.
264. Taylor, M. L. *et al.* Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *Am J Trop Med Hyg.* **61**, 914–919 (1999). doi:10.4269/ajtmh.1999.61.914.
265. McMurray, D. N., Stroud, J., Murphy, J. J., Carlomagno, M. A. & Greer, D. L. Role of Immunoglobulin Classes in Experimental Histoplasmosis in Bats. *Dev Comp Immunol.* **6**, 557–567 (1982). doi:10.1016/S0145-305X(82)80042-6.
266. Nowak, K. *et al.* Highly diverse and antimicrobial susceptible *Escherichia coli* display a naïve bacterial population in fruit bats from the Republic of Congo. *PLoS One.* **12**, e0178146 (2017). doi:10.1371/journal.pone.0178146.
267. Nowakiewicz, A. *et al.* Bats as a reservoir of resistant *Escherichia coli*: A methodical view. Can we fully estimate the scale of resistance in the reservoirs of free-living animals? *Res Vet Sci.* **128**, 49–58 (2020). doi:10.1016/j.rvsc.2019.10.017.
268. Becker, D. J. *et al.* Genetic diversity, infection prevalence, and possible transmission routes of *Bartonella* spp. in vampire bats. *PLoS Negl Trop Dis.* **12**, e0006786 (2018). doi:10.1371/journal.pntd.0006786.
269. Blehert, D. S. *et al.* Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? *Science.* **323**, 227 (2009). doi:10.1126/science.1163874.
270. Hecht-Höger, A. M. *et al.* Plasma proteomic profiles differ between European and North American myotid bats colonized by *Pseudogymnoascus destructans*. *Mol Ecol.* **29**, 1745–1755 (2020). doi:10.1111/mec.15437.

271. Moore, M. S. *et al.* Specific Alterations in Complement Protein Activity of Little Brown Myotis (*Myotis lucifugus*) Hibernating in White-Nose Syndrome Affected Sites. *PLoS One*. **6**, e27430 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0027430.
272. Moore, M. S. *et al.* Energy conserving thermoregulatory patterns and lower disease severity in a bat resistant to the impacts of white-nose syndrome. *J Comp Physiol B*. **188**, 163–176 (2018). doi:10.1007/s00360-017-1109-2.
273. Stockmaier, S., Dechmann, D. K. N., Page, R. A. & Mara, M. T. O. No fever and leucocytosis in response to a lipopolysaccharide challenge in an insectivorous bat. *Biol Lett*. **11**, 1–4 (2015).
274. Evans, S. S., Repasky, E. A. & Fisher, D. T. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol*. **15**, 335–349 (2015). doi:10.1038/nri3843.
275. Otálora-Ardila, A., M, L. G. H., Flores-Martínez, J. J. & Kenneth C. Welch, J. Metabolic Cost of the Activation of Immune Response in the Fish-Eating Myotis (*Myotis vivesi*): The Effects of Inflammation and the Acute Phase Response. *PLoS One*. **11**, 1–14 (2016). doi:10.1371.
276. Guerrero Chacón, A. L., Rivera Ruíz, D., Rojas Díaz, V., Triana- Llanos, C. & Niño Castro, A. Metabolic cost of acute phase response in the frugivorous bat , *Artibeus lituratus*. *Mammal Res*. **63**, 397–404 (2018). doi:doi.org/10.1007/s13364-018-0375-z.
277. Schneeberger, K., Czirják, G. Á. & Voigt, C. C. Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging , long-lived mammal. *J Exp Biol*. **216**, 4514–4519 (2013). doi:10.1242/jeb.090837.
278. Weise, P., Czirják, G. A., Lindecke, O., Bumrungsri, S. & Voigt, C. C. Simulated bacterial infection disrupts the circadian fluctuation of immune cells in wrinkle-lipped bats (*Chaerephon plicatus*). *PeerJ*. **5**, 1–18 (2017). doi:10.7717/peerj.3570.
279. Seeley, J. J. & Ghosh, S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol*. **101**, 107–119 (2017). doi:https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR.
280. Vergadi, E., Vaporidi, K. & Tsatsanis, C. Regulation of endotoxin tolerance and compensatory anti-inflammatory response syndrome by non-coding RNAs. *Front Immunol*. **9**, (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.02705.

281. West, M. A. & Heagy, W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med.* **30**, S64–S73 (2002). doi:10.1097/00003246-200201001-00009.
282. O’Shea, T. J., Bowen, R. A., Stanley, T. R., Shankar, V. & Rupprecht, C. E. Variability in Seroprevalence of Rabies Virus Neutralizing Antibodies and Associated Factors in a Colorado Population of Big Brown Bats (*Eptesicus fuscus*). *PLoS One.* **9**, e86261 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0086261.
283. Turmelle, A. S., Ellison, J. A., Mendonça, M. T. & Mccracken, G. F. Histological assessment of cellular immune response to the phytohemagglutinin skin test in Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*). *J Comp Physiol B.* **180**, 1155–1164 (2010). doi:10.1007/s00360-010-0486-6.
284. Turmelle, A. S., Jackson, F. R., Green, D., Mccracken, G. F. & Rupprecht, C. E. Host immunity to repeated rabies virus infection in big brown bats. *J Gen Virol.* **91**, 2360–2366 (2010). doi:10.1099/vir.0.020073-0.
285. Hawkins, J. A. *et al.* A metaanalysis of bat phylogenetics and positive selection based on genomes and transcriptomes from 18 species. *Proc Natl Acad Sci.* **116**, 11351–11360 (2019). doi:10.1073/pnas.1814995116.
286. Cole, F. R. & Wilson, D. E. *Leptonycteris yerbabuenae*. *Am Soc Mammal.* 1–7 (2006) doi:http://dx.doi.org/10.1644/797.1. doi:http://dx.doi.org/10.1644/797.1.
287. Morales-Garza, M. R., Arizmendi, M. del C., Campos, J. E., Martínez-García, M. & Valiente-Banuet, A. Evidences on the migratory movements of the nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* in Mexico using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J Arid Environ.* **68**, 248–259 (2007). doi:10.1016/j.jaridenv.2006.05.009.
288. Wilkinson, G. S. & Fleming, T. H. Migration and evolution of lesser longnosed bats *Lepfonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Mol Ecol.* **5**, 329–339 (1996).
289. Ceballos, G., Fleming, T. H., Chavez, C. & Nassar, J. Population Dynamics of *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Jalisco, Mexico. *J Mammal.* **78**, 1220–1230 (1997). doi:https://doi.org/10.2307/1383065.

290. Stoner, K. E., Karla, K. A., Roxana, R. C. & Quesada, M. Population dynamics, reproduction, and diet of the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in Jalisco, Mexico: Implications for conservation. *Biodivers Conserv.* **12**, 357–373 (2003). doi:10.1023/A:1021963819751.
291. Cockrum, E. L. Seasonal Distribution of Northwestern Populations of the Long-Nosed Bats, *Leptonycteris sanborni* Family Phyllostomidae. *An. del Inst. Biol. Ser. Zool.* **62**, 181–202 (1991).
292. Ibarra López, M. P. Comparación de la dieta de dos comunidades de murciélagos nectarívoros: implicaciones ecológicas. (Universidad de Guadalajara, 2012).
293. Butte, N. F. & King, J. C. Energy requirements during pregnancy and lactation. *Public Health Nutr.* **8**, 1010–1027 (2005). doi:10.1079/phn2005793.
294. Chiarello, D. I. *et al.* Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* **1866**, 165354 (2020). doi:10.1016/j.bbadis.2018.12.005.
295. Rojas-Martinez, A., Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M. del coro, Alcántara-Eguren, A. & Arita, H. T. Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist? *J Biogeogr.* **26**, 1065–1077 (1999).
296. Miron M, L., Herrera M, G. L., Ramírez P, N. & Hobson, K. A. Effect of diet quality on carbon and nitrogen turnover and isotopic discrimination in blood of a New World nectarivorous bat. *J Exp Biol.* **209**, 541–548 (2006). doi:10.1242/jeb.02016.
297. Voigt, C. C., Matt, F., Michener, R. & Kunz, T. H. Low turnover rates of carbon isotopes in tissues of two nectar-feeding bat species. *J Exp Biol.* **206**, 1419–1427 (2003). doi:10.1242/jeb.00274.
298. Muñoz-Romo, M. & Kunz, T. H. Dorsal Patch and Chemical Signaling in Males of the Long-Nosed Bat, *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae). *J Mammal.* **90**, 1139–1147 (2009). doi:10.1644/08-MAMM-A-324.1.
299. Rincón-Vargas, F. *et al.* Internal and external indicators of male reproduction in the lesser long-nosed bat *Leptonycteris yerbabuenae*. *J Mammal.* **94**, 488–496 (2013). doi:10.1644/11-MAMM-A-357.1.

300. Gaona, O. *et al.* Microbiota composition of the dorsal patch of reproductive male *Leptonycteris yerbabuenae*. *PLoS One*. **14**, 1–15 (2019). doi:10.1371/journal.pone.0226239.
301. Nassar, J. M. *et al.* Seasonal sebaceous patch in the nectar-feeding bats *Leptonycteris curasoae* and *L. yerbabuenae* (Phyllostomidae: Glossophaginae): phenological, histological, and preliminary chemical characterization. *Zoology*. **111**, 363–376 (2008). doi:10.1016/j.zool.2007.10.006.
302. Muñoz-Romo, M., Nielsen, L. T., Nassar, J. M. & Kunz, T. H. Chemical composition of the substances from dorsal patches of males of the Curaçaoan long-nosed bat, *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae: Glossophaginae). *Acta Chiropt.* **14**, 213–224 (2012). doi:10.3161/150811012X654411.
303. Muñoz-Romo, M., Burgos, J. F. & Kunz, T. H. The dorsal patch of males of the Curaçaoan long-nosed bat, *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae: Glossophaginae) as a visual signal. *Acta Chiropt.* **13**, 207–215 (2011). doi:10.3161/150811011X578769.
304. Nassar, J. M., Galicia, R., Ibarra, A. & Medellín, R. A. Tracking the origin of the smearing behavior in long-nosed bats (*Leptonycteris* spp.). *Mamm Biol.* **81**, 623–627 (2016). doi:10.1016/j.mambio.2016.08.003.
305. Zamora-Mejías, D., Morales-Malacara, J. B., Rodríguez-Herrera, B., Ojeda, M. & Medellín, R. A. Does latitudinal migration represent an advantage in the decrease of ectoparasitic loads in *Leptonycteris yerbabuenae* (Chiroptera)? *J Mammal.* **101**, 979–989 (2020). doi:10.1093/jmammal/gyaa075.
306. Ruoss, S., Becker, N. I., Otto, M. S., Czirják, G. & Encarnação, J. A. Effect of sex and reproductive status on the immunity of the temperate bat *Myotis daubentonii*. *Mamm Biol.* (2018) doi:10.1016/j.mambio.2018.05.010. doi:10.1016/j.mambio.2018.05.010.
307. Naoko Kanda, K. T. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol.* **103**, 282–288 (1999). doi:10.1016/s0091-6749(99)70503-8.
308. Derzsy, Z., Prohászka, Z., Rigó, J., Füst, G. & Molvarec, A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol.* **47**, 1500–1506 (2010).

doi:10.1016/j.molimm.2010.01.021.

309. Otálora-ardila, A., Herrera M, G. L., Flores-martínez, J. J. & Welch, K. C. The effect of short-term food restriction on the metabolic cost of the acute phase response in the fish-eating Myotis (*Myotis vivesi*). *Mamm Biol.* **82**, 41–47 (2017). doi:10.1016/j.mambio.2016.11.002.
310. Stockmaier, S., Bolnick, D. I., Page, R. A. & Carter, G. G. An immune challenge reduces social grooming in vampire bats. *Anim Behav.* **140**, 141–149 (2018). doi:10.1016/j.anbehav.2018.04.021.
311. Martin, L. & Bernard, R. T. F. Endocrine Regulation of Reproduction in Bats: The Role of Circulating Gonadal Hormones. in *Reproductive Biology of Bats* (eds. Crichton, E. G. & Krutzsch, P. H.) 27–64 (Academic Press, 2000). doi:10.1016/B978-012195670-7/50003-5. doi:10.1016/B978-012195670-7/50003-5.
312. Krishna, A. & Bhatnagar, K. P. Hormones and Reproductive Cycles in Bats. in *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (eds. Norris, D. O. & Lopez, K. H.) vol. 8 241–289 (Academic Press, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-374928-4.10012-4.
313. Constantine, D. G., Tierkel, E. S., Kleckner, M. D. & Hawkins, D. M. Rabies in New Mexico carvern bats. *Public Health Rep.* **83**, 303–316 (1968). doi:10.2307/4593275.
314. Plowright, R. K. *et al.* Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc R Soc Lond B.* **275**, 861–869 (2008). doi:10.1098/rspb.2007.1260.
315. Schneeberger, K., Courtiol, A., Czirja Gabor A & Voigt, C. C. Immune Profile Predicts Survival and Reflects Senescence in a Small , Long-Lived Mammal , the Greater Sac-Winged Bat (*Saccopteryx bilineata*). *PLoS One.* **9**, (2014). doi:10.1371/journal.pone.0108268.
316. Giorgi, M. S., Christe, P. & Vogel, P. The energetic grooming costs imposed by a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) upon its bat host (*Myotis myotis*). 2071–2075 (2001) doi:10.1098/rspb.2001.1686. doi:10.1098/rspb.2001.1686.
317. Christe, P., Arlettaz, R. & Vogel, P. Variation in intensity of a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) in relation to the reproductive cycle and immunocompetence of its bat host (*Myotis myotis*). *Ecol*

Lett. **3**, 207–212 (2000). doi:10.1046/j.1461-0248.2000.00142.x.

318. Encarnação, J. A., Baulechner, D. & Becker, N. I. Seasonal Variations of Wing Mite Infestations in Male Daubenton's Bats (*Myotis daubentonii*) in Comparison to Female and Juvenile Bats. *Acta Chiropt.* **14**, 153–159 (2012). doi:10.3161/150811012X654367.
319. Lučan, R. K. Relationships between the parasitic mite *Spinturnix andegavinus* (Acari : Spinturnicidae) and its bat host , *Myotis daubentonii* (Chiroptera : Vespertilionidae): seasonal , sex- and age-related variation in infestation and possible impact of the parasite on. *Folia Parasitol.* **53**, 147–152 (2006). doi:10.14411/fp.2006.019.
320. McLean, J. A. & Speakman, J. R. Non-nutritional maternal support in the brown long-eared bat. *Anim Behav.* **54**, 1193–1204 (1997). doi:10.1006/anbe.1997.0498.
321. Abbassy, M. *et al.* Identification of *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera: Culicidae) immunogens recognized by host humoral immunity and their impact on survival and fecundity. *Egypt J Immunol.* **14**, 43–54 (2007). doi:18689280.
322. Ulalume, H.-A. *et al.* Baseline and post-stress seasonal changes in immunocompetence and redox state maintenance in the fishing bat *Myotis vivesi*. *PLoS One.* **13**, e0190047 (2018). doi:10.1371/journal.pone.0190047.
323. Sundari, A. A., Bogdanowicz, W., Varman, D. R., Marimuthu, G. & Rajan, K. E. Ectoparasite *Raymondia lobulata* infestation in relation to the reproductive cycle of its host - The greater false vampire bat *Megaderma lyra*. *J Parasitol.* **98**, 60–62 (2012). doi:10.1645/GE-2833.1.
324. Schad, J., Dechmann, D. K. N., Voigt, C. C. & Sommer, S. Evidence for the 'Good Genes' Model: Association of MHC Class II DRB Alleles with Ectoparasitism and Reproductive State in the Neotropical Lesser Bulldog Bat, *Noctilio albiventris*. *PLoS One.* **7**, e37101 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0037101.
325. Menchaca Rodriguez, A. Differential gene expression and morphological variation in tequila bats (*Leptonycteris yerbabuenae*): adaptations to migration. (University of Bristol, 2019).
326. Gaona, O., Cerqueda-García, D., Moya, A., Neri-Barrios, X. & Falcón, L. I. Geographical separation and physiology drive differentiation of microbial communities of two discrete

- populations of the bat *Leptonycteris yerbabuenae*. *Microbiologyopen*. **9**, 1113–1127 (2020). doi:10.1002/mbo3.1022.
327. Reeder, D. M., Kosteczko, N. S., Kunz, T. H. & Widmaier, E. P. Changes in baseline and stress-induced glucocorticoid levels during the active period in free-ranging male and female little brown myotis, *Myotis lucifugus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Gen Comp Endocrinol*. **136**, 260–269 (2004). doi:10.1016/j.ygcen.2003.12.020.
328. Widmaier, E. P., Harmer, T. L., Sulak, A. M. & Kunz, T. H. Further Characterization of the Pituitary- Adrenocortical Responses to Stress in Chiroptera. *J Exp Zool*. **269**, 442–449 (1994). doi:10.1002/jez.1402690507.
329. Strobel, S. N. & Becker, J. A. No short-term effect of handling and capture stress on immune responses on bats assessed by bacterial killing assay. *Mamm Biol*. (2015) doi:10.1016/j.mambio.2015.02.005. doi:10.1016/j.mambio.2015.02.005.
330. Becker, D. J., Czirják, G. Á., Rynda-apple, A. & Plowright, R. K. Handling Stress and Sample Storage Are Associated with Weaker Complement-Mediated Bactericidal Ability in Birds but Not Bats *. *Physiol Biochem Zool*. **92**, 37–48 (2019). doi:10.1086/701069.
331. Sikes, R. S., Gannon, William L., Mammalogists, the A. C. and U. C. of the A. S. of & L, W. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal*. **92**, 235–253 (2011). doi:10.1644/10-MAMM-F-355.1.
332. Barrow, L. M., Bjorndal, K. A. & Reich, K. J. Effects of preservation method on stable carbon and nitrogen isotope values. *Physiol Biochem Zool*. **81**, 688–693 (2008). doi:10.1086/588172.
333. Brunet-Rossinni, A. K. & Wilkinson, G. S. Methods for age estimation and the study of senescence in bats. in *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats* (ed. Kunz, T. H.) 315–325 (Johns Hopkins University Press, 2009).
334. Jakob, E. M., Marshall, S. D. & Uetz, G. W. Estimating Fitness : A Comparison of Body Condition Indices. *Oikos*. **77**, 61–67 (1996). doi:https://doi.org/10.2307/3545585.
335. Martino, A., Arends, A. & Aranguren, J. Reproductive pattern of *Leptonycteris curasoae miller* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Northern Venezuela. *Mammalia*. **62**, 69–76 (1998).

doi:10.1515/mamm.1998.62.1.69.

336. Voigt, C. C. & Kelm, D. H. Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*; Chiroptera) assessed by stable isotopes. *J Mammal.* **87**, 1–6 (2006). doi:10.1644/05-MAMM-F-276R1.1.
337. Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* **2**, 123–140 (2004). doi:10.1038/nrmicro818.
338. Pinus M, M. H. Enterobacteria of bats (Chiroptera) (author's transl). *Zentralblatt fur Bakteriologie Abt Orig A Medizinische Mikrobiol Infekt und Parasitol* **247**, 315-322. (1980).
339. Adesiyun, A. A., Stewart-johnson, A. & Thompson, N. N. Isolation of Enteric Pathogens from Bats in Trinidad. *J Wildl Dis.* **45**, 952–961 (2009). doi:10.7589/0090-3558-45.4.952.
340. Liebl, A. L. & Li, L. B. M. Simple quantification of blood and plasma antimicrobial capacity using spectrophotometry. *Funct Ecol.* **23**, 1091–1096 (2009). doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01592.x.
341. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (2017).
342. Aittoniemi, J. *et al.* Age-dependent variation in the serum concentration of mannan-binding protein. *Acta Paediatr.* **85**, 906–909 (1996). doi:10.1111/j.1651-2227.1996.tb14182.x.
343. Thiel, S. *et al.* Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system. *Pediatr Allergy Immunol.* **6**, 20–23 (1995). doi:10.1111/j.1399-3038.1995.tb00252.x.
344. Beath, S. V. Hepatic function and physiology in the newborn. *Semin Neonatol.* **8**, 337–346 (2003). doi:10.1016/S1084-2756(03)00066-6.
345. Erdei, A., Molnár, E., Csomor, E., Bajtay, Z. & Prechl, J. Coordination of Adaptive Immune Responses by C3. in *The complement System* (ed. Szabenyi, J.) 75–228 (Springer, Boston, MA, 2004). doi:https://doi.org/10.1007/1-4020-8056-5_5. doi:https://doi.org/10.1007/1-4020-8056-5_5.
346. Zhou, Z., Xu, M. J. & Gao, B. Hepatocytes: A key cell type for innate immunity. *Cell Mol Immunol.* **13**, 301–315 (2016). doi:10.1038/cmi.2015.97.

347. Kardar, G. A. *et al.* Reference intervals for serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM and complements C3 and C4 in Iranian healthy children. *Iran J Pub Heal.* **41**, 59–63 (2012).
348. Ross, P. S. *et al.* Relative immunocompetence of the newborn harbour seal, *Phoca vitulina*. *Vet Immunol Immunopathol.* **42**, 331–348 (1994). doi:10.1016/0165-2427(94)90077-9.
349. Martínez-Coronel, M., Cervantes, F. A. & Hortelano-Moncada, Y. Crecimiento postnatal y desarrollo del vuelo en el murciélago *Leptonycteris yerbabuenae* en Chiapas, México. *Therya* **5**, 303–322 (2014). doi:10.12933/therya-14-173.
350. Powell, L. E., Barton, R. A. & Street, S. E. Maternal investment, life histories, and the evolution of brain structure in primates. *Proc R Soc Lond B.* **286**, (2019). doi:10.1098/rspb.2019.1608.
351. Yancey, F. D., Goetze, J. R. & Jones, C. *Saccolaryx bilineata*. *Mamm Species.* 1–5 (1998) doi:10.2307/3504459. doi:10.2307/3504459.
352. Strauss, M., Helversen, O. Von & Knörnschild, M. The ontogeny of courtship behaviours in bat pups (*Saccolaryx bilineata*). *Behaviour.* **147**, 661–676 (2010). doi:10.1163/000579510X12632972494743.
353. Pell, J. M., Stewart, C. E. H., Bates, P. C. & Aston, R. Immunological Approaches to Modify Growth. in *Low-Fat Meats* (eds. Hafs, H. D. & Zimbelman, R. G.) 303–319 (Academic Press, 1994). doi:10.1016/b978-0-08-091853-2.50022-6. doi:10.1016/b978-0-08-091853-2.50022-6.
354. Dewey, K. G. & Mayers, D. R. Early child growth: How do nutrition and infection interact? *Matern Child Nutr.* **7**, 129–142 (2011). doi:10.1111/j.1740-8709.2011.00357.x.
355. Furey, N. M. & Racey, P. A. Conservation Ecology of Cave Bats. in *Bats in the Anthropocene: Conservation of Bats in a Changing World* (eds. Voigt, C. C. & Kingston, T.) 463–500 (2016).
356. Li, L. *et al.* Bat Guano Virome: Predominance of Dietary Viruses from Insects and Plants plus Novel Mammalian Viruses. *J Virol.* **84**, 6955–6965 (2010). doi:10.1128/JVI.00501-10.
357. Banskar, S., Bhute, S. S., Suryavanshi, M. V., Punekar, S. & Shouche, Y. S. Microbiome analysis reveals the abundance of bacterial pathogens in *Rousettus leschenaultii* guano. *Sci Rep.* **6**, 1–13 (2016). doi:10.1038/srep36948.

358. Ogórek, R. *et al.* Fungi isolated and quantified from bat guano and air in Harmanecká and Driny Caves (Slovakia). *J Cave Karst Stud.* **78**, 41–49 (2016). doi:10.4311/2015MB0108.
359. Calva-Pérez, L. O. Factores Ambientales y Biologicos sobre la Diversidad Faunística Presente en la Cueva de la Mariana y Cueva el Tigre en el Estado de Sonora. (Universidad de Sonora, 2017).
360. Maddux, A. B. & Douglas, I. S. Is the developmentally immature immune response in paediatric sepsis a recapitulation of immune tolerance? *Immunology.* **145**, 1–10 (2015). doi:10.1111/imm.12454.
361. Zhao, J. *et al.* Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. *PNAS.* **105**, 7528–7533 (2008). doi:10.1073/pnas.0800152105.
362. Ciobanu, A. M. *et al.* Benefits and Risks of IgG Transplacental Transfer. *Diagnostics* **10**, (2020). doi:10.3390/diagnostics10080583.
363. Fouda, G. G., Martinez, D. R., Swamy, G. K. & Permar, S. R. The Impact of IgG Transplacental Transfer on Early Life Immunity. *ImmunoHorizons* **2**, 14–25 (2018). doi:10.4049/immunohorizons.1700057.
364. Malek, A., Sager, R., Kuhn, P., Nicolaidis, K. H. & Schneider, H. Evolution of Maternofetal Transport of Immunoglobulins During Human Pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* **36**, 248–255 (1996). doi:10.1111/j.1600-0897.1996.tb00172.x.
365. Agarwal, S. & Cunningham-Rundles, C. Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **99**, 281–283 (2007). doi:10.1016/S1081-1206(10)60665-5.
366. Erhard, M. H., Amon, P., Younan, M., Ali, Z. & Stangassinger, M. Absorption and Synthesis of Immunoglobulins G in Newborn Calves. *Reprod Domest Anim.* **34**, 173–175 (1999). doi:10.1111/j.1439-0531.1999.tb01237.x.
367. Provost, J.-P., Nahas, K. & Geffray, B. Normal values for blood immunoglobulins in the beagle dog. *Comp Clin Path.* **12**, 17–20 (2003). doi:10.1007/s00580-003-0476-0.
368. Piațosa, B. *et al.* B cell subsets in healthy children: Reference values for evaluation of B cell maturation process in peripheral blood. *Cytom B Clin Cytom.* **78B**, 372–381 (2010).

doi:10.1002/cyto.b.20536.

369. Shapiro-Shelef, M. & Calame, K. C. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol.* **5**, 230–242 (2005). doi:10.1038/nri1572.
370. Tarlinton, D. M., McLean, M. & Nossal, G. J. V. B1 and B2 cells differ in their potential to switch immunoglobulin isotype. *Eur J Immunol.* **25**, 3388–3393 (1995). doi:10.1002/eji.1830251228.
371. Rothstein, T. L., Griffin, D. O., Holodick, N. E., Quach, T. D. & Kaku, H. Human B-1 cells take the stage. *Ann NY Acad Sci.* **1285**, 97–114 (2013). doi:10.1111/nyas.12137.
372. Kaur, K., Chowdhury, S., Greenspan, N. S. & Schreiber, J. R. Decreased expression of tumor necrosis factor family receptors involved in humoral immune responses in preterm neonates. *Blood.* **110**, 2948–2954 (2007). doi:10.1182/blood-2007-01-069245.
373. Pihlgren, M. *et al.* Reduced Ability of Neonatal and Early-Life Bone Marrow Stromal Cells to Support Plasmablast Survival. *J Immunol.* **176**, 165–172 (2006). doi:10.4049/jimmunol.176.1.165.
374. Gonzalez-Quintela, A. *et al.* Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol.* **151**, 42–50 (2007). doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x.
375. Listì, F. *et al.* A study of serum immunoglobulin levels in elderly persons that provides new insights into B cell immunosenescence. *Ann NY Acad Sci.* **1089**, 487–495 (2006). doi:10.1196/annals.1386.013.
376. Medellín, R. A. *et al.* Follow me: Foraging distances of *Leptonycteris yerbabuenae* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Sonora determined by fluorescent powder. *J Mammal.* **99**, 306–311 (2018). doi:10.1093/jmammal/gyy016.
377. Horner, M. A., Fleming, T. H. & Sahley, C. T. Foraging behaviour and energetics of a nectar-feeding bat, *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae). *J Zool.* **244**, 575–586 (1998). doi:10.1111/j.1469-7998.1998.tb00062.x.

378. Durrer, S. & Schmid-Hempel, P. Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proc R Soc Lond B*. **258**, 299–302 (1994). doi:10.1098/rspb.1994.0176.
379. Jones, R. A. C. Plant and Insect Viruses in Managed and Natural Environments: Novel and Neglected Transmission Pathways. in *Advances in Virus Research* vol. 101 149–187 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/bs.aivir.2018.02.006.
380. Hu, M. & Lin, W. Effects of exercise training on red blood cell production: Implications for anemia. *Acta Haematol*. **127**, 156–164 (2012). doi:10.1159/000335620.
381. MacAvoy, S. E., Arneson, L. S. & Bassett, E. Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia*. **150**, 190–201 (2006). doi:10.1007/s00442-006-0522-0.
382. Carleton, S. A. & Del Rio, C. M. The effect of cold-induced increased metabolic rate on the rate of ¹³C and ¹⁵N incorporation in house sparrows (*Passer domesticus*). *Oecologia*. **144**, 226–232 (2005). doi:10.1007/s00442-005-0066-8.
383. Makanya, A. N. & Mortola, J. P. The structural design of the bat wing web and its possible role in gas exchange. *J Anat*. **211**, 687–697 (2007). doi:10.1111/j.1469-7580.2007.00817.x.
384. Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A. & James, A. C. On the use of stable isotopes in trophic ecology. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. **42**, 411–440 (2011). doi:10.1146/annurev-ecolsys-102209-144726.
385. Munguía-Rosas, M. A. & Sosa, V. J. Phenology of *Pilosocereus leucocephalus* (Cactaceae, tribe Cereeae): A columnar cactus with asynchronous pulsed flowering. *Plant Ecol*. **211**, 191–201 (2010). doi:10.1007/s11258-010-9784-z.
386. Risely, A., Waite, D. W., Ujvari, B., Hoyer, B. J. & Klaassen, M. Active migration is associated with specific and consistent changes to gut microbiota in *Calidris* shorebirds. *J Anim Ecol*. **87**, 428–437 (2018). doi:10.1111/1365-2656.12784.
387. Turjeman, S. *et al.* Migration, pathogens and the avian microbiome: A comparative study in sympatric migrants and residents. *Molecular Ecology* vol. 29 (2020). doi:10.1111/mec.15660.

388. van Veelen, H. P. J., Falcão Salles, J., Matson, K. D., van der Velde, M. & Tieleman, B. I. Microbial environment shapes immune function and cloacal microbiota dynamics in zebra finches *Taeniopygia guttata*. *Anim Microbiome*. **2**, (2020). doi:10.1186/s42523-020-00039-3.
389. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. **11**, 785–797 (2010). doi:10.1038/ni.1923.
390. Heesterbeek, D. A. C., Angelier, M. L., Harrison, R. A. & Rooijackers, S. H. M. Complement and Bacterial Infections: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Applications. *J Innate Immun*. **10**, 455–464 (2018). doi:10.1159/000491439.
391. Lubbers, R. *et al.* Complement component C1q as serum biomarker to detect active tuberculosis. *Front Immunol*. **9**, 1–12 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.02427.
392. Troldborg, A. *et al.* Lectin complement pathway proteins in healthy individuals. *Clin Exp Immunol*. **188**, 138–147 (2017). doi:10.1111/cei.12909.
393. Weintraub, R. M., Churchill, W. H., Crisler, C., Rapp, H. J. & Borsos, T. Mouse Complement: Influence of Sex Hormones on Its Activity. *Science*. **152**, 783–785 (1966).
394. Verthelyi, D. I. & Ahmed, S. A. Estrogen Increases the Number of Plasma Cells and Enhances Their Autoantibody Production in Nonautoimmune C57BL/6 Mice. *Cell Immunol*. **189**, 125–134 (1998). doi:10.1006/cimm.1998.1372.
395. Hammes, S. R. & Levin, E. R. Impact of estrogens in males and androgens in females. *J Clin Invest*. **129**, 1818–1826 (2019). doi:10.1172/JCI125755.
396. Obiandu, C., Okerengwo, A. A. & Dapper, D. V. Levels of serum immunoglobulins in apparently healthy children and adults in port harcourt, Nigeria. *Niger J Physiol Sci*. **28**, 23–27 (2013).
397. Cassidy, J. T., Nordby, G. L. & Dodge, H. J. Biologic variation of human serum immunoglobulin concentrations: Sex-age specific effects. *J Chronic Dis*. **27**, 507–516 (1974). doi:10.1016/0021-9681(74)90026-5.
398. Bhat, G. A., Mubarik, M. & Bhat, M. Y. Serum immunoglobulin profile in normal Kashmiri adults. *J Postgr Med*. **41**, 66–69 (1995).

399. Sellau, J. *et al.* Androgens predispose males to monocyte-mediated immunopathology by inducing the expression of leukocyte recruitment factor CXCL1. *Nat Commun.* **11**, (2020). doi:10.1038/s41467-020-17260-y.
400. Stygar, D., Masironi, B., Eriksson, H. & Sahlin, L. Studies on estrogen receptor (ER) α and β responses on gene regulation in peripheral blood leukocytes in vivo using selective ER agonists. *J Endocrinol.* **194**, 101–119 (2007). doi:10.1677/JOE-06-0060.
401. Kaushic, C., Roth, K. L., Anipindi, V. & Xiu, F. Increased prevalence of sexually transmitted viral infections in women: The role of female sex hormones in regulating susceptibility and immune responses. *J Reprod Immunol.* **88**, 204–209 (2011). doi:10.1016/j.jri.2010.12.004.
402. Walker, W. H. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis.* **1**, 116–120 (2011). doi:10.4161/spmg.1.2.16956.
403. Zuk, M. The Sicker Sex. *PLoS Pathog.* **5**, e1000267 (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000267.
404. Neuman-Lee, L. A. & French, S. S. Endocrine-reproductive-immune interactions in female and male Galápagos marine iguanas. *Horm Behav.* **88**, 60–69 (2017). doi:10.1016/j.yhbeh.2016.10.017.
405. Reynolds, S. L. *et al.* Scabies Mite Inactive Serine Proteases Are Potent Inhibitors of the Human Complement Lectin Pathway. *PLoS Negl Trop Dis.* **8**, e2872 (2014). doi:10.1371/journal.pntd.0002872.
406. Swe, P. M., Reynolds, S. L. & Fischer, K. Parasitic scabies mites and associated bacteria joining forces against host complement defence. *Parasite Immunol.* **36**, 585–593 (2014). doi:10.1111/pim.12133.
407. Swe, P. M., Christian, L. D., Lu, H. C., Sriprakash, K. S. & Fischer, K. Complement inhibition by *Sarcoptes scabiei* protects *Streptococcus pyogenes* - An in vitro study to unravel the molecular mechanisms behind the poorly understood predilection of *S. pyogenes* to infect mite-induced skin lesions. *PLoS Negl Trop Dis.* **11**, e0005437 (2017). doi:10.1371/journal.pntd.0005437.
408. Wikel, S. K. System by Ectoparasitic Arthropods host arthropods defenses to their advantage. *Bioscience.* **49**, 311–320 (1996). doi:https://doi.org/10.2307/1313614.

409. Rynkiewicz, E. C. *et al.* Associations between innate immune function and ectoparasites in wild rodent hosts. *Parasitol Res.* **112**, 1763–1770 (2013). doi:10.1007/s00436-013-3335-1.
410. Amaral, J. F. *et al.* Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Braz J Med Biol Res* **39**, 1581–1586 (2006). doi:10.1590/S0100-879X2006001200009.
411. Dionigi, R., Ariszonta, Dominioni, L., Gnes, F. & Ballabio, A. The Effects of Total Parenteral Nutrition on Immunodepression Due to Malnutrition. *Ann Surg.* **185**, 467–474 (1977). doi:10.1097/00000658-197704000-00017.
412. Rikimaru, T., Taniguchi, K., Yartey, J. E., Kennedy, D. O. & Nkrumah, F. K. Humoral and cell-mediated immunity in malnourished children in Ghana. *Eur J Clin Nutr.* **52**, 344–350 (1998). doi:10.1038/sj.ejcn.1600560.
413. Wade, G. N. & Schneider, J. E. Metabolic Fuels and Reproduction in Female Mammals. *Neurosci Biobehav Rev.* **16**, 235–272 (1992). doi:10.1016/S0149-7634(05)80183-6.
414. Lazzaro, B. P. & Little, T. J. Immunity in a variable world. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* **364**, 15–26 (2009). doi:10.1098/rstb.2008.0141.
415. Robinson, D. P. & Klein, S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav.* **62**, 263–271 (2012). doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.023.
416. Druckmann, R. & Druckmann, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **97**, 389–396 (2005). doi:10.1016/j.jsbmb.2005.08.010.
417. He, Y. dong *et al.* Normal range of complement components during pregnancy: A prospective study. *Am J Reprod Immunol.* **83**, 1–11 (2020). doi:10.1111/aji.13202.
418. Richani, K. *et al.* Normal pregnancy is characterized by systemic activation of the complement system. *J Matern Neonatal Med.* **17**, 239–245 (2005). doi:10.1080/14767050500072722.
419. Hopkinson, N. D. & Powell, R. J. Classical complement activation induced by pregnancy: Implications for management of connective tissue diseases. *J Clin Pathol.* **45**, 66–67 (1992).

doi:10.1136%2Fjcp.45.1.66.

420. Mayer, A. E. & Parks, G. D. An AGM model for changes in complement during pregnancy: Neutralization of influenza virus by serum is diminished in late third trimester. *PLoS One*. **9**, e112749 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0112749.
421. Billington, W. D. The immunological problem of pregnancy: 50 Years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *J Reprod Immunol*. **60**, 1–11 (2003). doi:10.1016/S0165-0378(03)00083-4.
422. Mandl, J. N., Schneider, C., Schneider, D. S. & Baker, M. L. Going to bat(s) for studies of disease tolerance. *Front Immunol*. **9**, 1–13 (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.02112.
423. Regal, J. F., Gilbert, J. S. & Burwick, R. M. The complement system and adverse pregnancy outcomes. *Mol Immunol*. **67**, 56–70 (2015). doi:10.1016/j.molimm.2015.02.030.
424. Denny, K. J., Woodruff, T. M., Taylor, S. M. & Callaway, L. K. Complement in Pregnancy: A Delicate Balance. *Am J Reprod Immunol*. **69**, 3–11 (2012). doi:10.1111/aji.12000.
425. Girardi, G., Prohászka, Z., Bulla, R., Tedesco, F. & Scherjon, S. Complement activation in animal and human pregnancies as a model for immunological recognition. *Mol Immunol*. **48**, 1621–1630 (2011). doi:10.1016/j.molimm.2011.04.011.
426. Gonzalez, J. M., Franzke, C. W., Yang, F., Romero, R. & Girardi, G. Complement activation triggers metalloproteinases release inducing cervical remodeling and preterm birth in mice. *Am J Pathol*. **179**, 838–849 (2011). doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.024.
427. Lokki, A. I. *et al.* Complement activation and regulation in preeclamptic placenta. *Front Immunol*. **5**, 312 (2014). doi:10.3389/fimmu.2014.00312.
428. Buurma, A. *et al.* Preeclampsia is Characterized by Placental Complement Dysregulation. *Hypertension*. **60**, 1332–1337 (2012). doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.194324.
429. Borghesi, J., Mario, L. C., Rodrigues, M. N., Favaron, P. O. & Miglino, M. A. Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans—A Review. *Open J Anim Sci*. **04**, 323–336 (2014). doi:10.4236/ojas.2014.45041.

430. Enders, A. C. & Blankenship, T. N. Comparative placental structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **38**, 3–15 (1999). doi:10.1016/S0169-409X(99)00003-4.
431. Simister, N. E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* **21**, 3365–3369 (2003). doi:10.1016/S0264-410X(03)00334-7.
432. Abel, J. *et al.* Defining normal IgG changes throughout pregnancy. *Proc Obstet Gynecol.* **3**, 1–2 (2013). doi:10.17077/2154-4751.1213.
433. Khirwadkar, M. A. & Kher, J. R. Study of serum immunoglobulins in normal pregnancy. *Indian J Physiol Pharmacol.* **35**, 69–70 (1991).
434. Benster, B. & Wood, E. J. Immunoglobulin levels in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* **77**, 518–522 (1970).
435. Larsson, A., Palm, M., Hansson, L.-O., Basu, S. & Axelsson, O. Reference values for α 1-acid glycoprotein, α 1-antitrypsin, albumin, haptoglobin, C-reactive protein, IgA, IgG and IgM during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* **87**, 1084–1088 (2008). doi:10.1080/00016340802428146.
436. Israel, E. J., Patel, V. K., Taylor, S. F., Marshak-Rothstein, A. & Simister, N. E. Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J Immunol.* **154**, 6246–51 (1995).
437. Philips, T. R. Canine Immune System. in *Encyclopedia of Immunology* (ed. Delves, P. J.) vol. 1 411–444 (Elsevier, 1998).
438. Huang, S. C., Hu, Z., Hasler-Rapacz, J. & Rapacz, J. Preferential mammary storage and secretion of immunoglobulin gamma (IgG) subclasses in swine. *J Reprod Immunol.* **21**, 15–28 (1992). doi:10.1016/0165-0378(92)90037-5.
439. Klobasa, F., Habe, F., Werhahn, E. & Butler, J. E. Changes in the concentrations of serum IgG, IgA and IgM of sows throughout the reproductive cycle. *Vet Immunol Immunopathol.* **10**, 341–353 (1985). doi:10.1016/0165-2427(85)90024-8.
440. Brandon, M. R., Watson, D. L. & Lascelles, A. K. The Mechanismo of Transfer of

Immunoglobulin Into Mammary Secretion of Cows. *Aust J Exp Biol Med.* **49**, 613–623 (1971). doi:10.1038/icb.1971.67.

441. Castro, N., Capote, J., Martín, D. & Argüello, A. The influence of dietary conjugated linoleic acid on blood serum and colostrum immunoglobulin G concentration in female goats before and after parturition. *J Anim Physiol Anim Nutr.* **90**, 429–431 (2006). doi:10.1111/j.1439-0396.2006.00623.x.
442. Herr, M., Bostedt, H. & Failing, K. IgG and IgM levels in dairy cows during the periparturient period. *Theriogenology.* **75**, 377–385 (2011). doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.009.
443. Rodinova, H., Kroupova, V., Travnicek, J., Stankova, M. & Pisek, L. Dynamics of IgG in the blood serum of sheep with different selenium intake. *Vet Med.* **53**, 260–265 (2008). doi:10.17221/1944-VETMED.
444. Carter, A. M. & Mess, A. Evolution of the placenta and associated reproductive characters in bats. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* **310**, 428–449 (2008). doi:10.1002/jez.b.21216.
445. Sánchez Hernández, M. G. Estructura histológica de la placenta en el murciélago de orejas grandes *Corynorhinus mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *Nat Desarro.* **1**, 3–14 (2003).
446. Gopalakrishna, A. & Karim, K. B. Fetal membranes and placentation in Chiroptera. *Reproduction.* **56**, 417–429 (1979). doi:https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560417.
447. Kelemen, K., Bogнар, I., Paal, M. & Szekeres-Bartho, J. A progesterone-induced protein increases the synthesis of asymmetric antibodies. *Cell Immunol.* **167**, 129–134 (1996). doi:10.1006/cimm.1996.0016.
448. Brenner, J. *et al.* A possible linkage between gonadal hormones, serum and uterine levels of IgG of dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* **47**, 179–184 (1995). doi:10.1016/0165-2427(94)05383-4.
449. Dewey, K. G. Energy and protein requirements during lactation. *Annu Rev Nutr.* **7**, 19–36 (1997). doi:10.1146/annurev.nutr.17.1.19.
450. Prentice, A. M. & Prentice, A. Energy costs of lactation. *Annu Rev Nutr.* **8**, 63–79 (1988).

doi:10.1146/annurev.nu.08.070188.000431.

451. East, M. L. *et al.* Does lactation lead to resource allocation trade-offs in the spotted hyaena? *Behav Ecol Sociobiol.* **69**, 805–814 (2015). doi:10.1007/s00265-015-1897-x.
452. Ramírez Hernández, G. & Herrera, M. L. G. Allocation of endogenous nutrients for reproduction in the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris yerbabuenae*) in central Mexico. *J Mammal.* **97**, 23–31 (2016). doi:10.1093/jmammal/gyv149.
453. Landete-Castillejos, T., García, A., Gómez, J. Á., Laborda, J. & Gallego, L. Effects of nutritional stress during lactation on immunity costs and indices of future reproduction in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Biol Reprod.* **67**, 1613–1620 (2002). doi:10.1095/biolreprod.102.004507.
454. Gutiérrez, M. A. *et al.* Prolactin-Induced Immunoglobulin and Autoantibody Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Systemic Lupus Erythematosus and Normal Individuals. *Int Arch Allergy Immunol.* **109**, 229–235 (1996). doi:10.1159/000237242.
455. Drexler, J. F. *et al.* Amplification of Emerging Viruses in a Bat Colony. *Emerg Infect Dis.* **17**, 449–456 (2011). doi:10.3201/eid1703.100526.
456. Chan, E. & Swaminathan, R. Role of prolactin in lactation-induced changes in brown adipose tissue. *Am J Physiol.* **258**, R51–6 (1990). doi:10.1152/ajpregu.1990.258.1.r51.
457. Tucker, H. A. Hormonal regulation of milk synthesis. Hormones, mammary growth, and lactation: A 41-year perspective. *J Dairy Sci.* **83**, 874–884 (2000). doi:10.3168/jds.s0022-0302(00)74951-4.
458. Torner, L., Toschi, N., Nava, G., Clapp, C. & Neumann, I. D. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: Involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci.* **15**, 1381–1389 (2002). doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01965.x.
459. Hooley, R. D., Campbell, J. J. & Findlay, J. K. The importance of prolactin for lactation in the ewe. *J Endocrinol.* **79**, 301–310 (1978). doi:10.1677/joe.0.0790301.
460. Freeman, M. E. Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* **80**, 1523–

631 (2000). doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1523.

461. Dogusan, Z., Hooghe, R., Verdood, P. & Hooghe-Peters, E. L. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J Neuroimmunol.* **120**, 58–66 (2001). doi:10.1016/S0165-5728(01)00420-9.
462. Moreno-Carranza, B. *et al.* Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: Effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *Ann J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **305**, 720–726 (2013). doi:10.1152/ajpregu.00282.2013.
463. Leaños-Miranda, A. & Cárdenas-Mondragón, G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology.* **45**, 97–101 (2006). doi:10.1093/rheumatology/kei115.
464. Hernández-Castellano, L. E. *et al.* Sheep and goats raised in mixed flocks have diverse immune status around parturition. *J Dairy Sci.* **102**, 8478–8485 (2019). doi:10.3168/jds.2019-16731.
465. Jacobi, A. M. *et al.* Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann Rheum Dis.* **60**, 242–247 (2001). doi:10.1136/ard.60.3.242.
466. Ross, P. S., Pohajdak, B., Bowen, W. D. & Addison, R. F. Immune function in free-ranging harbor seal (*Phoca vitulina*) mothers and their pups during lactation. *J Wildl Dis.* **29**, 21–29 (1993). doi:10.7589/0090-3558-29.1.21.

APÉNDICE 1

Tabla 1. Localidades, fecha de muestreo, edad, sexo y estado reproductivo de los individuos de *L. yerbabuena* que fueron muestreados (plasma) en México.

Localidad	Fecha	Edad		Machos		Hembras			Total
		Juvenil	Adulto	Activo	Inactivo	Lactante	Preñada	Inactiva	
Coquimatlan, Colima	Mayo 2019		3		3				6
Chamela, Jalisco	Mayo 2019		25	1	21	1		2	25
Hermosillo, Sonora	Mayo 2019		19			6	10	3	19
Hermosillo, Sonora	Julio 2019	18	19			14	1	4	37
Coquimatlan, Colima	Octubre 2019		12	8	4				12
Chamela, Jalisco	Octubre 2019		25	11	4			10	25
Coquimatlan, Colima	Diciembre 2019		6	2	3			1	6
Chamela, Jalisco	Diciembre 2019		27	11	2			14	27
Chamela, Jalisco	Febrero 2020		23		19	1		3	23
Total		18	159	33	56	23	11	37	178

APÉNDICE 2

Determinación de la curva de crecimiento y el título bacteriano de E. coli (ATCC 8739)

Para establecer una concentración de 10^5 bacterias/ml y para caracterizar la fase de crecimiento logarítmico que experimenta *E. coli*. Se utilizaron stocks bacterianos que se encontraban refrigerados a -80 °C. Todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo de laminar o cerca un mechero para evitar la contaminación del stock bacteriano.

- 1- Para activar la suspensión de bacterias congeladas, se rasparon trozos de esta suspensión con un haza estéril, los cuales fueron dispuestos en 3 ml de caldo nutritivo a 37 °C con agitación durante 18 horas.
- 2- Utilizando la suspensión bacteriana propuesta en el punto 1, se realizaron 4 diluciones seriales utilizando el caldo nutritivo como solvente. La primera dilución se realizó utilizando 200 μ l de la suspensión de bacterias (cultivo saturado), a la cual se le añadieron 1800 μ l de medio de cultivo. A partir de esta suspensión bacteriana (1/10), y utilizando los mismos volúmenes propuestos en la suspensión inicial (200 μ l de bacterias en 1800 μ l de caldo nutritivo), se realizaron tres diluciones seriales adicionales (1/100, 1/1000 y 1/10000) para establecer un gradiente de concentración de bacterias.
- 3- A partir de cada suspensión de bacterias (1/100, 1/1000 y 1/10000), se sirvieron 5 μ l en 260 μ l de caldo nutritivo por triplicado en una microplaca de 96 pozos para registrar la absorbancia a 300 nm. Las placas se pondrán a incubar durante un periodo ideal de 12 horas o más, para establecer la curva de crecimiento de *E. coli*. Durante este periodo se registró la absorbancia de los pozos a intervalos de dos horas. Un ejemplo del resultado que se obtendría se muestra en la Figura 12. Este ejemplo está construido con los datos reales que se obtuvieron en esta investigación. Se recomienda construir esta curva de crecimiento para establecer los tiempos adecuados de incubación de la bacteria en los ensayos de la ABP.
- 4- Para establecer la concentración de bacterias que presentan las suspensiones que se construyeron en los puntos 2 y 3. Se utilizaron 5 μ l de cada suspensión (1/100, 1/1000 y 1/10000), los cuales se mezclaron con 195 μ l de PBS y se cultivaron por duplicado en placas de agar (90 μ l por placa),

utilizando el método de extensión de aza. Las placas fueron incubadas a 37 °C boca arriba (la parte con agar de la caja de Petri se dispone en la parte superior), con el objetivo de que la humedad no se acumule en la capa con agar.

- 5- Transcurridas las 24 horas de incubación, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) que han crecido en cada placa. En la Figura 13 se observa un ejemplo de dos réplicas de placas de agar que fueron cultivadas por medio de la metodología propuesta anteriormente. En este ejemplo en particular, se mezclaron 5 µl de suspensión de bacterias en 195 µl de PBS, los cuales fueron divididos en dos alícuotas de 90µl para ser servidos en las placas con agar. Como se indica en la Figura 13, estos 5 µl de suspensión bacteriana dieron origen a 360 UFC. Por lo cual, la concentración estimada de bacterias de esta suspensión es de 6.2×10^4 bacterias/ml.

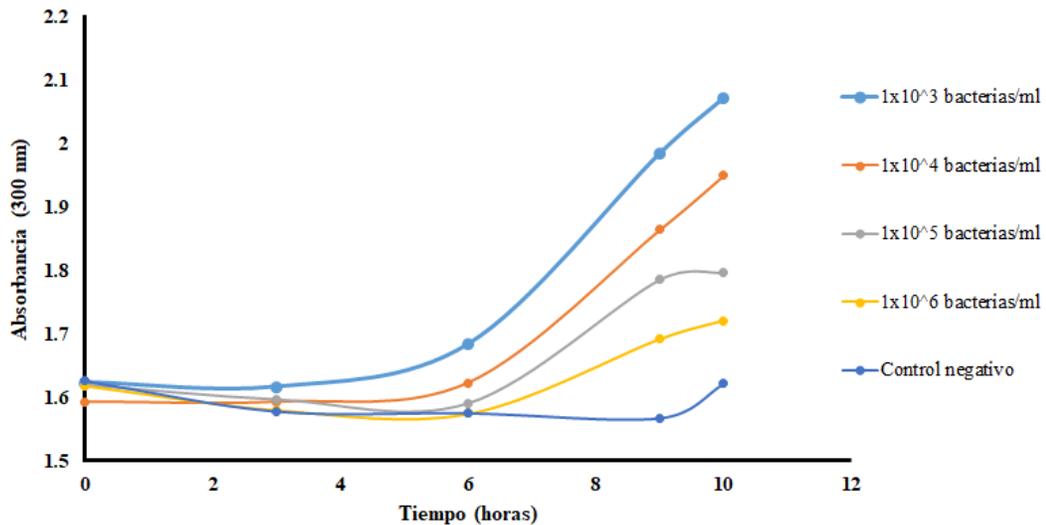


Figura 12. Curva de crecimiento de *E. coli* a través del tiempo, a 37 °C para 4 suspensiones de bacterias que fueron diluidas serialmente a partir de un cultivo saturado de bacterias.

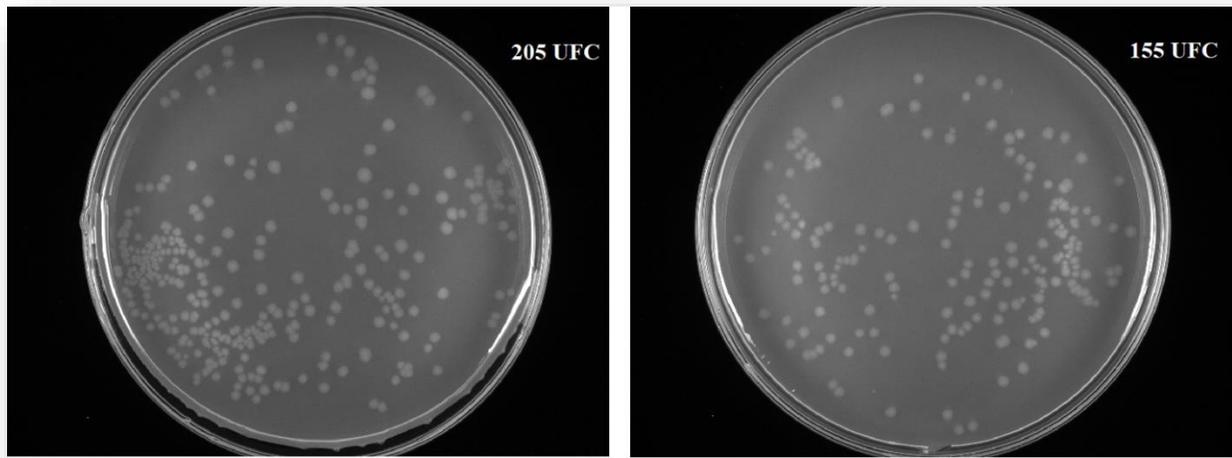


Figura 13. Foto de una placa con agar nutritivo en donde crecieron 205 UFC (izquierda) y 155 UFC (derecha) de E. coli, tras 24 horas de incubación a 37 °C.