



DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR:

“ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DE ADN Y DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN DOS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS COMO FACTORES DETERMINANTES DE LA LONGEVIDAD”

PRESENTA: M. en B.E. JUAN CRISTÓBAL CONDE PÉREZ-PRINA

CO-DIRECTORES:

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Investigador Titular C, Depto. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Miguel Ángel León Galván

Profesor Titular A, Depto. de Biología

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESOR EXTERNO:

Dra. Tania Zenteno Savín

Investigador Titular A,

Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR), La Paz, BCS, México.

COMITÉ TUTORIAL

CO-DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Investigador Titular C, Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Miguel Ángel León Galván

Profesor Titular A, Depto. de Biología
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORA EXTERNA:

Dra. Tania Zenteno Savín

Investigador Titular A,
Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR)
La Paz, BCS, México.

JURADOS:

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Investigador Titular C, Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Dr. Edmundo Bonilla González

Investigador Titular C, Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Humberto González Márquez

Investigador Titular C, Depto. Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

El programa del Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I: 309-1) pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia de CONACYT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0. con la clave C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de los directores de tesis, Dra. Mina Königsberg Fainstein y Dr. Miguel Ángel León Galván. El trabajo de investigación fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) con el No. CB-2006-1-59659.

Quiero expresar que recibí el apoyo de CONACYT, con el número de registro 192888.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DE ADN Y DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN DOS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS COMO FACTORES DETERMINANTES DE LA LONGEVIDAD”, con fecha del 5 de diciembre del 2012.

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Presidente

Dra. Tania Zenteno Savín
Secretaria

Dr. Edmundo Bonilla González
Vocal

Dr. Humberto González Márquez
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Mina Königsberg Fainstein** del Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular. Muchas gracias por toda la ayuda durante los últimos 4 años, tanto profesional como personal, para salir adelante, mejorar como investigador, y saber tolerar los embistes de la vida académica, los desastres involuntarios en el laboratorio, los momentos donde todo parecía difícil e imposible de lograr, así como los momentos donde la lógica parecía no tener cabida. Lo sé, tenerme paciencia es un logro increíble. Gracias por todo.

Al **Dr. Miguel Ángel León Galván** del Departamento de Biología. Gracias por toda la ayuda, la paciencia y el apoyo para que el proyecto, primero en su género, fuera posible y que nos permitiera ver tantas cosas de los Quirópteros, de su biología y de su relevancia en el fenómeno del envejecimiento.

A la **Dra. Tania Zenteno Savín**, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (CIBNOR). Aunque a muchos kilómetros de distancia, a lo largo de estos 4 años ha sido una presencia y un ejemplo para aprender como comprender de manera exhaustiva al estrés oxidante.

Al **Dr. Ricardo López Wilchis** del Departamento de Biología de la UAM-Iztapalapa por las instalaciones y el conocimiento para la colecta de murciélagos. A la **QFB Norma S. Sánchez** y al **Dr. Omar Arellano Aguilar** del Instituto de Fisiología Celular y el Instituto de Investigaciones Biomédicas respectivamente, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su asistencia en el análisis de enzimas antioxidantes y en el análisis estadístico. Al **Dr. José Manuel Hernández** del CINVESTAV por la donación de los anticuerpos de actina, a la **Dra. Kathleen Fischer** del Barshop Institute for Aging and Longevity Studies en San Antonio, Texas, por la revisión del artículo de investigación.

A todos **los miembros del Posgrado en Biología Experimental**, a los miembros del **Comité Predoctoral** que contribuyeron con este proyecto, y que con sus palabras y acciones me mostraron todo aquello a lo que quiero aspirar como investigador y como persona y dejar de lado todo aquello que no quiero ser como académico. Muchas gracias por todo.

A **mis Padres**, que durante todo este tiempo me han querido y apoyado en todos los aspectos de mi vida. A **mi mamá**, que ha estado conmigo en todas las facetas de mi vida y que espero haberla hecho feliz al pesar de todos los problemas de la vida cotidiana, deseándole lo mejor en su nueva aventura.

A **mis amigos del Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular** que han estado conmigo y que han sido parte de mi vida todo este tiempo: **Adriana y Armando**, por haberme dejado entrar en su vida y ser parte de algo hermoso y definitivo en mi vida. Al pequeño **Mateo**, que con sus sonrisas siempre me alegra el corazón. A **Viridiana**, por estar siempre ahí y por todos los recuerdos que hemos tenido juntos todos estos años. Gracias por todo.

A mis amigos **Jorge Abraham, Federico, Melisa, Claudia, Carlos, Denisse, Samuel, Javier Esteban**, que siempre han estado conmigo a lo largo de mi vida y que yo siempre los tengo en mi mente y en el corazón.

A mis abuelos, **María Isabel y Juan José**, que de seguro me ven desde lo lejos junto con Furtwängler y Callas y se maravillan de las cosas que pasan en la vida. A mis abuelos **Raúl y Olga**, que desde los cielos me están observando y se maravillan de las creaciones de Dios.

A los miembros de mi familia, a **mis tíos Elsa, Alfredo, Dito, Alberto, mis primos Gastón, Gabriela, Alejandro, Alejandra, Mariana, Pablo y Javier**. Por estar siempre conmigo y en la distancia. A los nuevos miembros de mi familia, mis nuevos papás **Elizabeth y Sergio, Guadalupe, la abuela Adela, y Eric Patricio**, el niño que más me sorprende cada día. A todos los miembros de la Familia Navarro Mabarak Celis que he conocido y querido todos estos años y los que faltan.

A **Cynthia**: Siempre soñé con encontrar a esa persona única con la cual tener una vida feliz, en un lugar donde todo fuera posible a través de la felicidad. Con el tiempo ese lugar parecía no llegar, al punto de querer renunciar a ese sueño. Pero como ocurre en los cuentos de Lovecraft, para que algo exista en la realidad, primero debe de ser soñado. Cuando te conocí, me dí cuenta que ese lugar siempre existió. Que siempre soñé contigo, y por ende, siempre existió la felicidad y que no debía de desesperar.

Ese lugar es tu Corazón. Solo soñé con cosas que aún no ocurrían, pero que existirían en un futuro, que sólo llegarían cuando el momento fuera el adecuado. Y ahora has llegado y solo veo felicidad. Nuestras vidas han cambiado. Y solo sé que quiero seguir soñando con tantas cosas hermosas que todavía no ocurren...pero que esperan. Nuestra vida, juntos, espera.

Te amo.

INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Antecedentes.....	3
Inestabilidad microsatelital y sus repercusiones en el envejecimiento.....	5
Mecanismos de reparación de ADN por malos apareamientos.....	7
Los murciélagos como modelo de estudio del envejecimiento.....	11
Planteamiento y Justificación.....	15
Objetivo General.....	16
Objetivos Particulares.....	16
Hipótesis.....	16
Metodología.....	17
Modelo Biológico de Murciélagos.....	17
1. Criterios de diferenciación por estructura ósea.....	18
2. Criterio de desarrollo somático.....	19
3. Criterios de condición reproductiva.....	20

Determinación de los niveles de proteínas MSH2 y MLH1.....	26
Extracción de ADN y reacción de PCR para análisis de inestabilidad microsatelital.....	27
Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes.....	30
Análisis estadístico de resultados.....	33
Resultados.....	34
Análisis de niveles de proteínas MMR.....	34
Evaluación de microsatélites en ADN mediante análisis por PCR.....	38
Análisis del nivel de actividad de las enzimas antioxidantes.....	42
Discusión.....	50
Conclusiones y Perspectivas.....	61
Bibliografía.....	63

Resumen

La acumulación de daño por estrés oxidante sobre las biomoléculas como el ADN, es conocido como un factor que induce alteraciones en los mecanismos y estructura de la célula que podrían contribuir con el proceso del envejecimiento. El sistema de reparación de malos apareamientos tipo MMR corrige bases apareadas de forma incorrecta durante la replicación del ADN. A su vez, las enzimas antioxidantes pueden reducir el efecto del estrés oxidante como una medida de protección celular. Para poder determinar la importancia de estos factores asociados en el proceso de envejecimiento, se estudiaron los niveles de las proteínas MMR MSH2 y MLH1, así como los niveles de marcadores microsatélites, en tejidos de hígado, pulmón y cerebro de individuos en dos especies de murciélagos silvestres: *Myotis velifer* y *Desmodus rotundus* (especie de vida corta y de vida larga, respectivamente). Las actividades de las enzimas catalasa, glutatión peroxidada y superóxido dismutasa fueron analizadas para determinar si existía una correlación negativa con el daño al ADN. Las actividades de enzimas antioxidantes fueron mayores en la especie más longeva, *D. rotundus* que en comparación con *M. velifer*, la especie menos longeva. Además, los organismos viejos de *M. velifer*, y no los organismos viejos de *D. rotundus*, presentaron niveles reducidos de proteínas MMR y niveles de secuencias microsatélites elevadas. Por lo tanto, a pesar de que nuestros resultados correlacionan la eficiencia reducida de mecanismo MMR, la actividad antioxidante deficiente y el incremento del daño al ADN con el proceso del envejecimiento, esto no es un fenómeno que se observe de la misma manera en todos los organismos vivos.

Abstract

The accumulation of oxidative damage to biomolecules, such as DNA, is known to induce alterations in the cell's mechanisms and structure that might lead to the aging process. Mismatch repair system (MMR) corrects base mismatches generated during DNA replication. In addition, antioxidant enzymes can reduce the effect of oxidative stress in order to protect cells from oxidizing damage. In order to determine the importance of these associated factors during the aging process, levels of MMR proteins MSH2 and MLH1, as well as microsatellite markers, were determined and compared in liver, lung, and brain samples of juvenile, adult, and old, both female and male, individuals from two species of wild bats: the short-lived *Myotis velifer* and the longer lived *Desmodus rotundus*. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase were also analyzed to determine if the antioxidant protection correlates negatively with DNA damage. Antioxidant activities were higher in the longer lived *D. rotundus* than in *M. velifer*. Furthermore, old *M. velifer* but not old *D. rotundus* bats had reduced MMR levels and increased microsatellite instability. Therefore, although our results correlate the reduced MMR efficiency, the deficient antioxidant activity, and the increase in DNA damage with the aging process, this is not always true for all living organisms.

Antecedentes

El envejecimiento se ha definido como el deterioro, tanto estructural como funcional, en los tejidos y órganos de un individuo conforme éste avanza por las etapas de la vida (Martin et al. 1996; 2007). Considerado como un proceso multifactorial, el envejecimiento ha sido estudiado a través de múltiples enfoques.

La teoría del envejecimiento de Harman, propone que la generación y acumulación del daño oxidativo a las biomoléculas en el organismo, siendo una de las más importantes el ADN (Harman, 2003), genera un desbalance a nivel celular que promueve el proceso de envejecimiento. A lo largo de los años, se ha determinado que existen diversos factores externos e internos (Barouki, 2006) que promueven la oxidación de biomoléculas como el ADN, los lípidos y las proteínas. La exposición prolongada a contaminantes, metales pesados y radiación ionizante pueden inducir procesos degenerativos celulares asociados a enfermedades (Florea et al. 2005; Boley et al. 2002). También puede existir generación de oxidantes endógenos, a través de vías metabólicas celulares, como la respiración mitocondrial (Halliwell & Gutteridge, 2004) entre otras. Oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno (ERO), pueden inducir una serie de procesos a nivel celular y molecular que promueven un estado de senescencia prematura en los organismos (Kültz, 2005).

Dentro de las ERO las más estudiadas destacan el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Un incremento de las ERO puede generar el denominado **estrés oxidante**, un estado causado por un desbalance entre la producción de ERO y la capacidad

de los mecanismos enzimáticos antioxidantes, que tienen como función primordial, reducir el efecto tóxico de dichas especies. Dentro del sistema de defensa antioxidante se encuentran las siguientes enzimas: la superóxido dismutasa (SOD), encargada de catalizar la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 (Fridovich, 1978; Bertini et al. 1998). La catalasa (CAT) encargada de catalizar la descomposición de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O y O_2 (Kirkman & Gaetani, 2006) y la glutatión peroxidasa (GPx), que cataliza la reacción de oxidación del glutatión reducido utilizando para ello H_2O_2 , formando H_2O (Li et al. 2000; Scandalios, 2002).

En el caso del ADN, se ha observado que los daños generados por estrés oxidante involucran apareamientos incorrectos de bases nitrogenadas o bien exclusiones e inserciones, que tienen como consecuencia una expresión génica incorrecta (Kültz, 2005). La formación de aductos es un evento muy común como resultado de la oxidación por ERO de alta reactividad, como el $\cdot OH$. El aducto más estudiado es el que se genera en la desoxiguanosina llamado 8-oxo-7,8-dihidro -2'-desoxiguanosina o 8-oxodGuo (8OHdG). También se considera como un daño generado por el estrés oxidante a la formación de secuencias repetidas de dinucleótidos agregados que alteran la secuencia original de ADN, denominados secuencias microsatélite (Moustacchi, 2000; Smolarz et. al. 2010). Este proceso se denomina inestabilidad microsatelital (IMS), y se utiliza actualmente como un indicador de daño al ADN, comúnmente relacionado con estudios de cáncer colorectal y adenocarcinoma ovárico. (Hampel *et al.*, 2005; Helleman *et al.*, 2006).

Inestabilidad microsatelital y sus repercusiones en el envejecimiento

Los microsatélites se pueden encontrar en los centrómeros, telómeros, promotores y segmentos de genes transcritos, ocasionando una inestabilidad en la estructura del ADN al darse estas repeticiones de nucleótidos, susceptibles a mutaciones y causando una modificación de la secuencia genética. De no ser corregidos por procesos de reparación de ADN, dichas alteraciones pueden generar mutaciones dentro de la secuencia; dado que dichas alteraciones son copiadas para la siguiente célula durante la replicación de ADN. Es por esto que la IMS es utilizada como un marcador bioquímico en pruebas clínicas y de laboratorio para diagnosticar enfermedades y patologías relacionadas con el envejecimiento (Lin & Wilson, 2009; Alazzouzi et al. 2005). Este tipo de alteraciones se generan, principalmente, por estímulos nocivos internos y externos a las células, así como fallas y alteraciones en los mecanismos de reparación celular de ADN (Junop et al. 2003). En *Escherichia coli*, se ha determinado que bajas concentraciones de H₂O₂, generan un incremento en la IMS en su genoma. Esto se correlacionó con ensayos de supervivencia celular en los mismos cultivos de *E. coli* y se determinó que la sobrevivencia era menor en los organismos que presentaban mayor porcentaje de IMS (Jackson & Loeb, 2000).

En mamíferos, se ha propuesto que una acumulación de daños no reparados en el ADN llevan al estado de envejecimiento celular. Esto se ha demostrado a través de diversos experimentos. El ADN mitocondrial de cerebro de seis especies de mamíferos con diferentes longevidades en un rango de los 3.5 a 46 años (ratones, ratas, conejos, ovejas, cerdos y caballos) presenta mayores niveles del aducto 8-oxo-7, 8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) en

las especies con menor longevidad, e inversamente proporcional en las especies más longevas (Barja & Herrero, 2000). Los ratones mutantes de la ADN polimerasa γ , se demostró que acumulan daños en el ADN mitocondrial y esto ocasiona un incremento de los marcadores apoptóticos celulares y una disminución en su sobrevivencia, en comparación con los ratones control (Kujoth et al. 2005). También se determinó que, en ratones homocigóticos mutantes de superóxido dismutasa 2 (SOD2), que presentan una actividad enzimática deficiente, se incrementó el daño oxidante y la generación de ERO mitocondriales; la sobreexpresión de SOD2, tanto en ratones jóvenes (4-6 meses) y viejos (26-28 meses), redujo los niveles de lipoperoxidación y la resistencia a estrés oxidante inducido por paraquat como la producción de ATP mitocondrial. Sin embargo, no se observaron cambios en la longevidad de los organismos (Jang et al. 2009). En epidermis de ratones con deficiencia genética de SOD2, se demostró un incremento en el desacoplamiento de la actividad del complejo mitocondrial II, ocasiona daño al ADN nuclear e inducción de senescencia, mas no se observó un incremento de la apoptosis, semejando los resultados observados en células epiteliales de ratones envejecidos de forma natural (Velarde et al. 2012).

La asociación de daños genéticos no reparados, por causa de factores intrínsecos y extrínsecos al organismo, con el advenimiento de un estado de envejecimiento celular podría explicarse con base en fallas conjuntas entre los mecanismos antioxidantes celulares y de reparación de ADN. En estudios recientes se ha visto que un incremento en el estrés oxidativo genera rupturas de cadena sencilla en el ADN, lo cual tiene un efecto de acortamiento de telómeros en los cromosomas y también genera mutaciones a nivel de ADN

mitocondrial, fomentando un estado de envejecimiento y senescencia celular (Jou *et al.* 2007). En modelos de ratas jóvenes y viejas, se ha correlacionado un aumento en la fragmentación de ADN por ensayo cometa, junto con una reducción en las cantidades presentes de glutatión reducido en los grupos de ratas viejas, indicando una incapacidad de poder reducir el estrés oxidante que lleva a un estado de envejecimiento (Hashimoto *et al.* 2008). En estudios con pacientes humanos, se determinó la variación en re-arreglos genómicos debido a incrementos en la IMS de 5 diferentes *loci* en el ADN de muestras de sangre periférica de pacientes sanos (Bologna, Italia), divididos en 3 grupos: 25–35 años, 85–97 y 100 años. El resultado fue que se observó un incremento en las variaciones genéticas proporcional al aumento en la edad de los pacientes, lo cual fue relacionado con una incapacidad de los sistemas de reparación de ADN para reparar los errores en la secuencia genómica conforme los organismos envejecen (Neri *et al.* 2005).

Mecanismos de reparación de ADN por malos apareamientos

Las células tienen diferentes mecanismos para mantener la integridad y estabilidad bioquímica del ADN cuando se genera un daño. Uno de estos mecanismos es el sistema de reparación por escisión de bases (BER), un mecanismo celular que repara bases dañadas en la secuencia del ADN originadas por eventos como desaminación, alquilación y oxidación. Otro sistema de reparación es el de escisión de nucleótidos (NER), que difiere de BER, puesto que mientras BER repara bases dañadas, el sistema NER se encarga de corregir porciones más grandes de daño removiendo la sección de la hebra que contiene el daño a nivel de nucleótidos (Moustacchi, 2000;

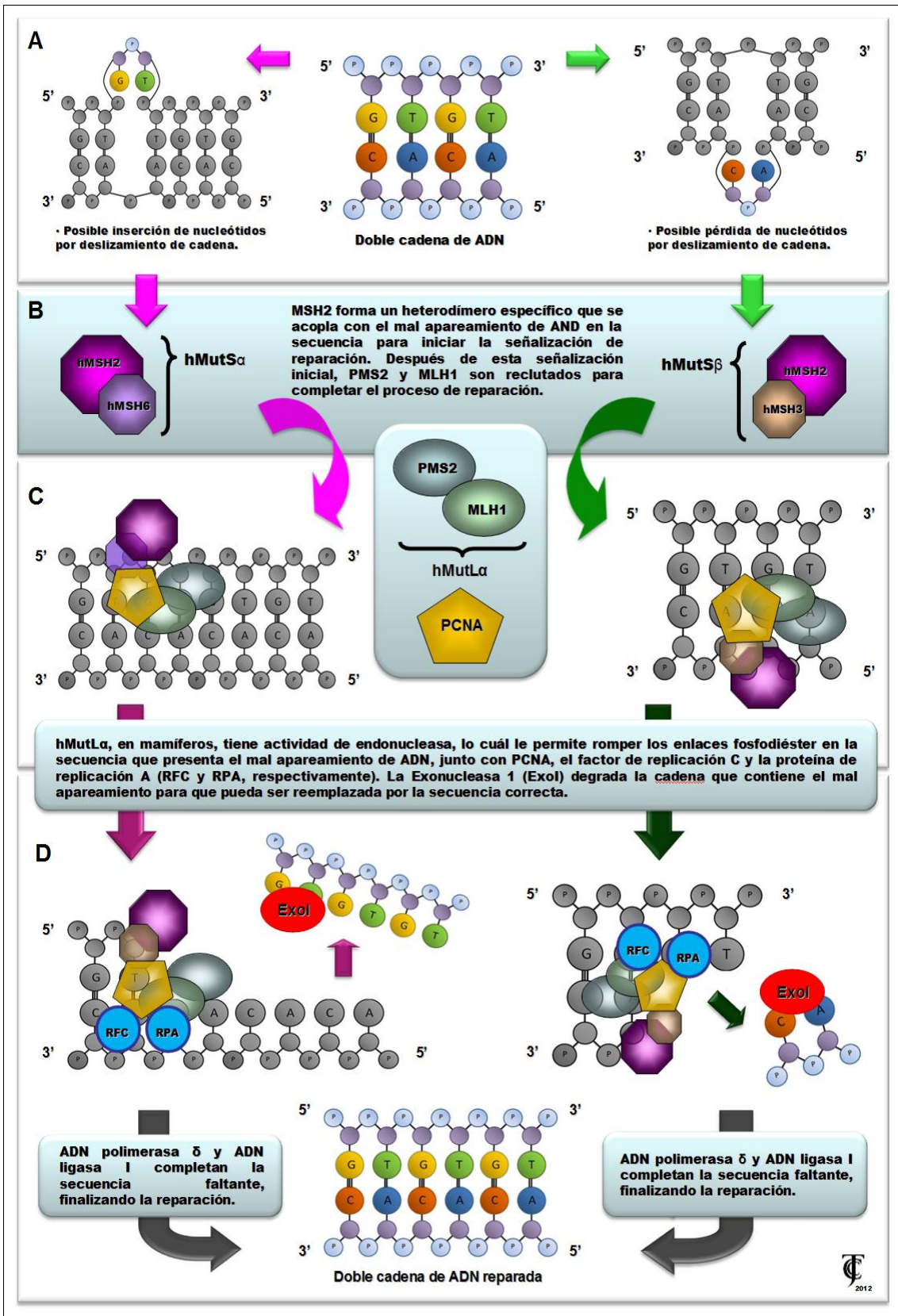
Bernstein et al. 2002; Nakano et al. 2005). Tanto el sistema BER como el NER están constantemente activos en la célula, reparando daños generados en el ADN a medida que surgen y son detectados. Sin embargo, existen otros mecanismos que se activan durante etapas específicas de la célula, tal como ocurre con el sistema de reparación de ADN por malos apareamientos, que se activa principalmente durante la etapa de duplicación.

Cuando la formación de secuencias microsatélites altera la integridad estructural del ADN, los genes *msh2*, *msh6*, *mhl1* y *pms2* se activan para poder participar en un proceso de reparación del ADN, denominado sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR, del idioma inglés) (Mullins *et al.*, 2005). En particular, la proteína MSH2, producto del gen *msh2*, forma parte de una familia de moléculas altamente conservadas filogenéticamente encargadas de reparaciones de bases mal apareadas después de la replicación del ADN y su falla es el principal mecanismo por el cual se generan las IMS (Kültz, 2005). El sistema MMR abarcan la reparación tanto de los apareamientos de bases erróneas como las ausencias e inserciones incorrectas de las mismas (Peltomäki, 2001; Santuci-Darmanin & Paquis-Flucklinger, 2003) (**Fig. 1A**). Para ello, la proteína MSH2 interacciona con la proteína MSH6 para formar el heterodímero MutS α , o bien con la proteína MSH3, ante la eliminación anormal de bases para formar el heterodímero MutS β (Peltomäki, 2001; Santuci-Darmanin y Paquis-Flucklinger, 2003) (**Fig. 1B**). El heterodímero ya formado se une al sitio de la lesión y recluta a las proteínas de la familia MutL, MLH1 y PMS2 (en la forma del heterodímero MutL α) que a su vez inician la señalización para el reclutamiento de las enzimas de reparación de ADN (**Fig. 1C**). El complejo de enzimas de reparación corrige la base mal apareada, e

incorpora la base correcta a través de la acción de la ADN polimerasa δ y de la ADN ligasa I (Phung *et. al.*, 1999; Saribasak *et. al.*, 2008; Jiricny *et. al.*, 2006; López de Saro, 2009) **(Fig. 1D)**.

Se ha reportado que cuando existen defectos en la expresión de *msh2*, se incrementa la IMS en el ADN. Este tipo de cambios en la secuencia genómica causan alteraciones en el funcionamiento celular y su presencia se ha utilizado en investigación clínica como marcador de enfermedades degenerativas y relacionadas con el envejecimiento (Lin & Wilson, 2009; Alazzouzi *et. al.*, 2004). Aproximadamente 15% de los cánceres colorectales muestran niveles altos de secuencias microsatélites en uno o varios de los genes que codifican para MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2, lo cual indica que la IMS puede inclusive llegar a afectar la funcionalidad del sistema MMR mismo (Vilar & Gruber, 2010). Para estudiar si el incremento en la IMS es un fenómeno que se asocia con el envejecimiento, se requiere utilizar modelos de estudio con una alta longevidad, con el fin de poder analizar los cambios en la expresión de proteínas MMR y su eficiencia corrigiendo errores en la secuencia genómica.

Figura 1. Mecanismo General de Reparación de ADN Tipo MMR.



Esquema general del mecanismo de reparación del ADN tipo MMR

Los murciélagos como modelo de estudio del envejecimiento

Los murciélagos (Clase: Mammalia, Orden: Chiroptera) poseen ciertas particularidades fisiológicas dentro de la clase de los mamíferos, que no se encuentran comúnmente en otros órdenes. Su longevidad es, en proporción, 3 veces mayor que la del resto de los mamíferos terrestres de un tamaño equivalente, llegando en promedio a los 25 años. Tienen un metabolismo muy activo, lo cual implica un mayor consumo de energía y de oxígeno, dada su capacidad de vuelo, que es 20 veces mayor respecto a su estado de reposo (aspecto que comparten con las aves) (Neuweiler, 2000). Los murciélagos cuentan también con mecanismos de ahorro de energía, como lo es el aletargamiento fisiológico, que les permite hibernar en temporadas de escasez de alimento y condiciones desfavorables para la vida en su ecosistema, particularmente durante el invierno. Además, los murciélagos tienen un mecanismo de reproducción que varía poco entre especies: cuentan un sistema de reproducción que, generalmente, produce una camada de una cría en una época determinada del año (varía la época dependiendo si su apareamiento es sincrónico o asincrónico estacional, visto este último en murciélagos heterotérmicos), lo cual implica la utilización especializada y controlada de energía durante el desarrollo embrionario de las crías. Es por ello que, para este proyecto, se decidió emplear dos especies distintas de murciélagos: una especie insectívora y menos longeva, representada por *Myotis velifer* y una especie hematófaga y más longeva, representada por *Desmodus rotundus*.

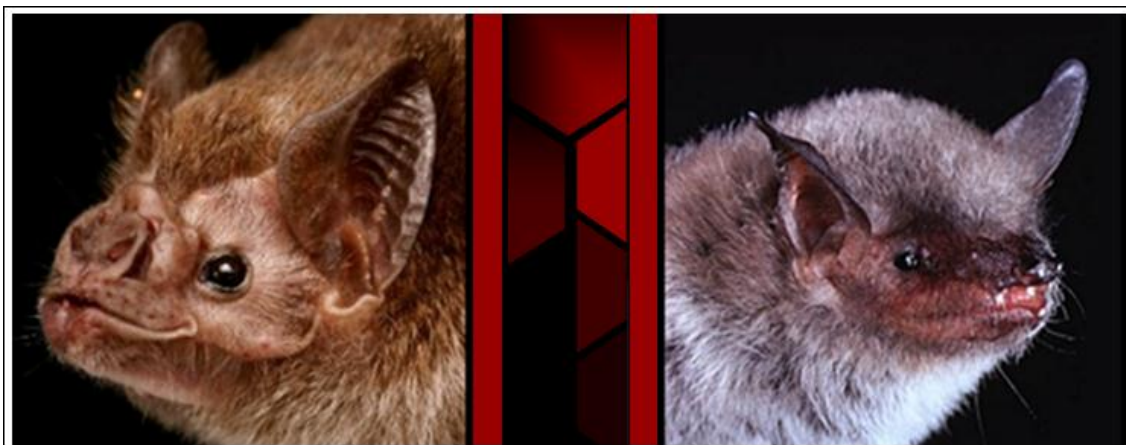
Los murciélagos *Myotis velifer* (**Fig. 2**) son murciélagos insectívoros que tienen un ciclo de vida promedio entre los 8 y 12 años (11.3 en vida silvestre)

(Fitch et al. 1981). Su peso es en promedio de 10.1 g (Wilkinson & South, 2002), Al ser organismos heterotérmicos, tienen la capacidad de atravesar por un proceso denominado aletargamiento fisiológico o hibernación, lo cual implica disminuir su metabolismo, su ritmo cardíaco y su temperatura corporal durante la temporada fría del año (Fitch et al. 1981; Jürguens & Prothero 1987). Su estilo de vida incluye vivir en cuevas como región principal de reposo y protección contra factores ambientales y depredadores. Así mismo, viven en grandes comunidades compuestas por cientos o miles de individuos en una misma región. Su espermatogénesis ocurre a finales del verano y el apareamiento se da en el periodo de octubre-noviembre. Su periodo de gestación ocurre entre los 60-70 días y sólo tienen una cría por camada. Dado que estos organismos son hibernantes, es plausible considerar que los mecanismos celulares predominantes en el proceso de hibernación y en la retención de los espermatozoides en el útero son aquellos relacionados con sistemas antioxidantes, que evitan una degradación por estrés oxidante de las células sexuales y también reducen el estrés oxidante en los tejidos de los murciélagos como se ha visto en la especie *Corynorhinus mexicanus* (León-Galván et al., 1999).

Desmodus rotundus (**Fig. 2**), es una especie hematófaga, es decir, consume sangre como alimento principal. Su ciclo de vida es de 12 a 20 años, aunque se han encontrado organismos con 25 años de edad (Lord et al. 1976) y su peso promedio, como adulto, es de 32.2 g (Wilkinson & South, 2002). Los murciélagos vampiros como *D. rotundus*, se alimentan de sangre del ganado y de animales pequeños, y son organismos homeotérmicos y, no atraviesan por un proceso de aletargamiento fisiológico. (Balmori, 1998; Brunet-Rossini &

Austad, 2004). Su forma de vuelo es corta, con saltos pequeños y caminatas intencionales. Se ha observado que la cantidad de sangre que consume un murciélago del género *Desmodus* es de 15 a 18 g (dos tercios de su peso corporal), lo cual implica una ingesta de hierro de 6.1 mg de la hemoglobina en la sangre. Esta cantidad es 10 veces la cantidad presente en la sangre del murciélago y en humanos equivaldría a 800 veces lo consumido en su ingesta diaria. A pesar de esto, sólo 4.2 µg del hierro es absorbido por día, mientras que el resto se queda depositado en la pared del intestino mediante un mecanismo desconocido. Su ciclo reproductivo es interesante, ya que el periodo de gestación es de 7 meses y sólo producen una cría por camada (Balmori, 1999; Brunet-Rossini & Austad, 2004). Los murciélagos de esta especie no requieren de las cuevas como refugio principal. Se encuentran comúnmente en regiones tropicales, viviendo en su zona de forrajeo, inclusive se llegan a encontrar en zonas templadas. Su grupo social está formado por un macho dominante en una cohorte de hembras, formando un sistema de harem. El macho dominante tiene privilegios sexuales sobre las hembras y entra en conflicto con murciélagos machos satélite que pudieran llegar al harem (Lord et al. 1976).

Figura 2. Primer Plano de *Desmodus rotundus* (Der.) y *Myotis velifer* (Izq.).



D. rotundus, especie perteneciente a la Familia Phyllostomidae y *M. velifer*, la cual pertenece a la Familia Vespertilionidae.

A pesar de las diferencias que presentan estas dos especies de murciélagos en cuanto a su alimentación y forma de vida, un factor en común continúa siendo su longevidad prolongada en comparación con otras especies de mamíferos. También hay que considerar que las dos especies mencionadas tienen, a su vez, diferentes longevidades, lo cual indica que, inclusive dentro del mismo orden de mamíferos, pueden existir diferencias a nivel celular y molecular que expliquen las diferencias de edad promedio entre las especies. Sin embargo, un hecho no determinado aún es: si existen diferencias a nivel molecular que pudieran hacer discrepar de la idea de que en todas las especies se repite un patrón similar de daño al ADN, un fallo en mecanismos de reparación de ADN y baja eficiencia en los mecanismos de enzimas antioxidantes que se relacionaran con el fenómeno del envejecimiento. Se han reportado teorías donde se propone que especies de tamaño pequeño tienen un metabolismo muy acelerado, lo cual los lleva a tener un ciclo de vida corto en comparación con organismos de tamaño grande (Brunet-Rossini & Austad, 2004). Si bien es cierto que muchas especies pequeñas en tamaño físico

tienen ciclo de vida cortos, modelos basados en murciélagos contraponen esta teoría, ya que, inclusive con tasas metabólicas altas debido al tipo de locomoción por vuelo (equivalentes o superiores a la tasa metabólica por vuelo de las aves), estos mamíferos logran tener ciclos de vida muy largos (Balmori, 1999), lo cual los convierte en sujetos de estudio interesantes para determinar los mecanismos celulares relacionados con envejecimiento y senescencia celular.

Planteamiento y Justificación

Si consideramos a los murciélagos como modelos adecuados de estudio y con base en la teoría del envejecimiento de Harman, las diferencias en la longevidad entre las especies *Myotis velifer* y *Desmodus rotundus* podrían explicarse en función de variaciones en la eficiencia en el mecanismo de reparación del ADN de tipo MMR, lo cual evitarían una acumulación de errores en la secuencia genética. Por otro lado, variaciones en los mecanismos enzimáticos antioxidantes pudieran estar contrarrestando el efecto nocivo del estrés oxidante en estas especies de murciélagos en diferentes niveles. Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, los murciélagos no han sido utilizados como modelos de estudio de la IMS que pueda establecer patrones de desregulación genética con respecto a la edad. Por eso que es importante entender el funcionamiento del mecanismo de reparación de ADN basado en la familia de proteínas MMR así como el estado de las enzimas SOD, CAT y GPx en estas especies que presentan características morfofisiológicas diferentes.

Objetivo General

Determinar si el sistema de reparación de ADN del tipo MMR, así como las enzimas antioxidantes, son factores asociados con la longevidad de dos especies de quirópteros que poseen características morfofisiológicas diferentes.

Objetivos Particulares

- Determinar el estado del sistema de reparación de ADN del tipo MMR, cuantificando los niveles de las proteínas MSH2 y MLH1 en muestras de hígado, pulmón y cerebro de murciélagos macho y hembra de las especies *Myotis velifer* y *Desmodus rotundus*.
- Determinar el nivel de daño a la molécula de ADN mediante la amplificación de secuencias microsatélites en las muestras de hígado, pulmón y cerebro de las especies analizadas.
- Analizar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en hígado, pulmón y cerebro de los mismos grupos de estudio.
- Determinar si existe correlación entre la actividad de las enzimas antioxidantes con el daño al ADN en las especies de estudio.

Hipótesis

- Si el proceso de daño al ADN estuviera asociado a la disminución de los mecanismos de reparación de MMR y de los sistemas antioxidantes, entonces

el daño incrementaría en función de la edad, independientemente del estilo de vida del organismo.

Metodología

Modelo Biológico de Murciélagos

La captura de los organismos se realizó en dos diferentes sitios de refugio, localizados en el estado de Puebla, México. La mayoría de los organismos juveniles y adultos de ambas especies (*Myotis velifer* y *Desmodus rotundus*) fueron capturados dentro de la Cueva Chicomostoc (19°57'54"N, 97°36'09"O, 1,420 msnm), en Nauzontla, Puebla. Se capturaron con una trampa de arpa ubicada a 10 m hacia el interior de la entrada principal de la cueva durante el anochecer, cuando los organismos salen para alimentarse (esta etapa se considera adecuada para su captura, ya que presentan niveles bajos de estrés porque salen descansados y bien hidratados del refugio). Los organismos viejos de *M. velifer* fueron capturados de un túnel ubicado en la frontera estatal entre Puebla y Tlaxcala (19°37'14"N, 98°02'02"W; 3,220 msnm), el cual está a una distancia de 57.5 km desde Chicomostoc en Nauzontla, pero ubicada a 1,800 m más de altura. Dentro del túnel, los murciélagos se capturaron con redes de golpe, mientras dormían. Los organismos fueron transportados en bolsas de lino hacia Apulco, Puebla, donde se realizó la extracción de los tejidos deseados para el estudio, con base en las especificaciones de Medellín et al. (1997). Los murciélagos se mantuvieron no más de 10 horas antes de ser sacrificados, todo ello se realizó con base en lo estipulado por la Norma Mexicana Oficial de Ética Animal 062-

ZOO-1999. Los organismos *D. rotundus* viejos, fueron capturados en una cueva que se encuentra prácticamente a la entrada del Centro Piscícola “Ejecayan” (a 3 Km al sur de Zacapoaxtla; 19°51´ latitud N y 97°36´ longitud O). Esta cueva se encuentra localizada en la misma región donde se encuentra la cueva Chicomostoc, por lo que tanto el clima como el tipo de vegetación son los mismos. La captura se realizó durante el día, tras localizar dos diferentes harems que utilizan la cueva como refugio, empleando redes de golpe. La obtención de los órganos se realizó dentro de un periodo de 4 hrs postcaptura ya que se pernoctaba en la misma localidad. Los organismos se examinaron y no se encontraron marcadores de trauma o enfermedades, tales como heridas o infecciones causados por bacterias y hongos. Sólo se registró la presencia de los ectoparásitos comunes observables a simple vista, como ácaros (Acari: Spinturnicidae) y moscas (Diptera: Streblidae). Durante la extracción de los tejidos, se observó el estado de los mismos para determinar las condiciones de salud de los organismos, los cuales no indicaron ninguna complicación. Para la clasificación por edad de los grupos de murciélagos, se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

1. Criterios de diferenciación por estructura ósea:

- *Osificación de las placas de crecimiento epifisial cartilaginosas de la unión metacarpo-falange* (Kunz, 1990). Se determinó a través de transiluminación y con microscopía, determinando el grado de osificación del tercer dedo y del hueso por medio de la tinción con rojo S de Alizarina y del cartílago por medio de la tinción con Azul alciano (Springer & Johnson, 2000).

- *Deterioro dental.* Los cráneos de los murciélagos se limpiaron utilizando larvas de escarabajos del género *Dermestes spp.*, las cuales consumieron el tejido suave, dejando al descubierto el tejido óseo. Tanto el cráneo y las mandíbulas se observaron en microscopio estereoscópico para determinar el grado de deterioro dental. Para *D. rotundus* la clasificación se realizó con base en los estudios previos de Núñez & de Viana (1997) y Davis y colaboradores (2010). Para *M. velifer* no existe un reporte de categorización dental, por lo que se creó un esquema basado en el desarrollo dental reportado por Carleton y colaboradores (1982), con base en la ausencia de desgaste hasta un grado avanzado de desgaste. Las piezas dentales analizadas fueron los caninos, premolares y molares.

2. Criterio de desarrollo somático.

- *Características dermatológicas.* Se determinó el estado del patagio, la textura del pelaje, su lubricación, coloración y flexibilidad (Martin et al. 2001).
- *Características alométricas.* El peso corporal se obtuvo con una balanza portátil eléctrica (Ohaus) (± 0.1 g). La longitud del antebrazo se determinó utilizando un calibrador Vernier (± 0.1 mm). Los datos fueron comparados con los reportados para individuos de las especies de estudio pertenecientes a otras poblaciones (*M. velifer*: Fitch et al., 1981; *D. rotundus*: Greenhall et al., 1983).

3. Criterios de condición reproductiva.

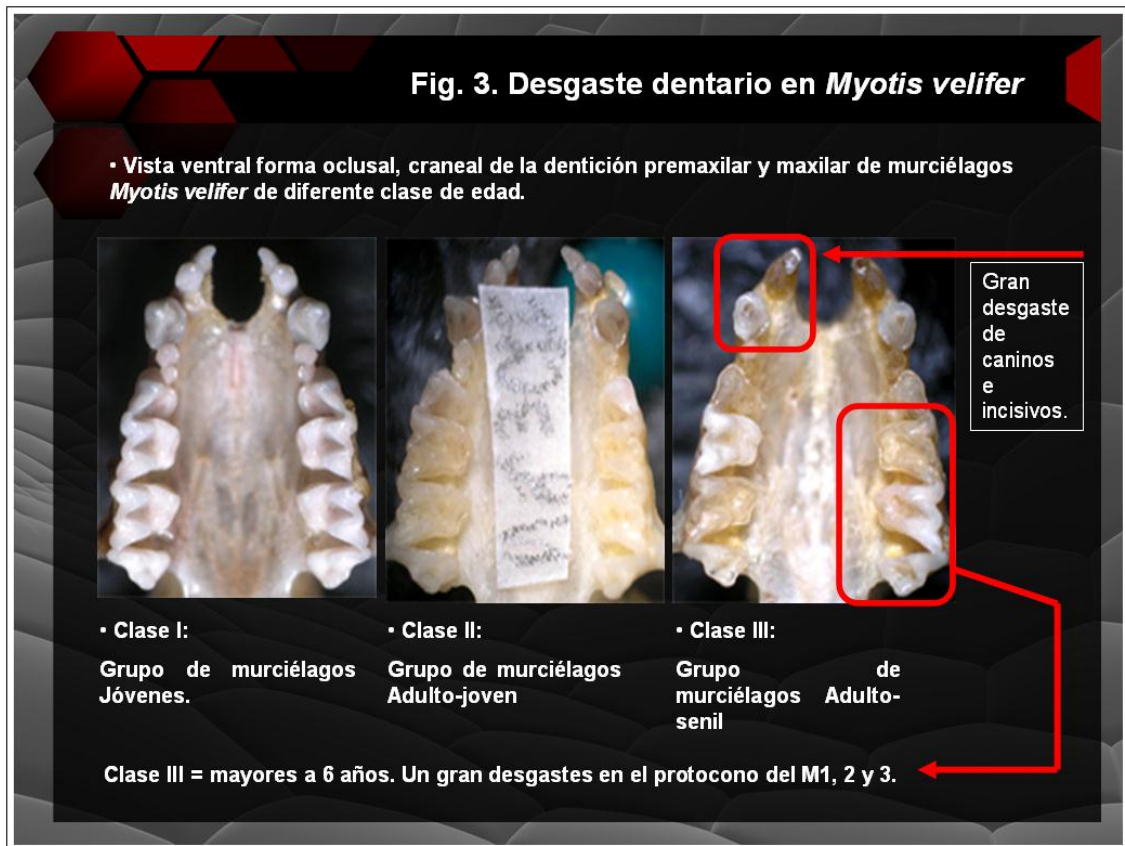
- *Machos*: Se analizó tanto la posición como el tamaño de ambos testículos y el epidídimo.
- *Hembras*: Se consideró el desarrollo de las glándulas mamarias y si se encontraban preñadas.

Myotis velifer: La madurez sexual en las hembras se observa durante el primer año y en los machos durante el segundo año de vida (Kruttsch, 2009). La mayoría de los murciélagos jóvenes se obtuvieron de la Cueva Chicomostoc durante el período Septiembre–Abril, dado que eran inmaduros a nivel sexual por haber nacido en Mayo (los murciélagos jóvenes tenían un estimado de 4 meses de edad y los murciélagos del año previo de 14-15 meses). Los murciélagos adulto fueron capturados durante el período Agosto–Septiembre, antes de que migren a otras zonas para realizar la hibernación. Los murciélagos viejos fueron capturados durante el período de Noviembre–Diciembre. Estos últimos, fueron seleccionados como parte de un estudio demográfico en curso desde 1983, cuando los murciélagos viejos fueron capturados y marcados con anillos numerados (Arratia, 2000). Los murciélagos que se determinaron con más de seis años, se catalogaron como viejos.

- Jóvenes (> 4 meses <1 año y 3 meses): organismos delgados y pequeños (8.5–9.0 g de peso corporal, < 44 mm de longitud del antebrazo), piel sin daño; con dientes que no presentaron desgaste (**Fig. 3**) y las epífisis fusionadas de forma incompleta (**Fig. 5**). En los machos

no se observaron testículos ni epidídimo conspicuo en la membrana interfemoral debido a su tamaño pequeño. Las hembras presentaron glándulas mamarias poco perceptibles, así como pezones inconspicuos.

- Adultos (> 1 año y 4 meses <4 años): presentaron un grado leve de desgaste dental (**Fig. 3**) y sus epífisis cerradas por osificación (**Fig. 5**). Los machos (9.0–11.0 g de peso corporal y 44–46 mm de longitud del antebrazo) se distinguieron por tener un tamaño mayor a los jóvenes. Los testículos se encontraban en el escroto. Los machos fueron capturados en el período de Agosto-Septiembre, cuando la espermatogénesis concluyó; por lo tanto, los testículos eran pequeños, mientras que los epidídimos se observaron claramente distendidos en el uropatagio. En las hembras, las glándulas mamarias presentaron un tamaño intermedio, con pezones de tamaño pequeño a intermedio, sin pelaje alrededor de los mismos, un indicador de que atravesaron por un proceso de lactancia. Sin embargo, no se utilizaron hembras en gestación.
- Viejos: (> 6 años); especímenes robustos (> 11.0 g de peso corporal y 46–49 mm de longitud del antebrazo), desgaste dentario severo (**Fig. 3**) epífisis cerradas, metacarpo engrosado, con el grado máximo de osificación (**Fig. 5**). Tanto los machos como las hembras mostraron señas de piel maltratada (patagio reseco) y pelaje duro. No se observaron señales de actividad sexual. Se observaron testículos escrotales en los machos y pezones pequeños en las hembras.



Imágenes de determinación de edades por desgaste dentario. Se observan las diferencias resaltadas en márgenes rojos en los organismos viejos.

***Desmodus rotundus*:** Presenta dos grandes períodos reproductivos; el primero se da entre Abril y Mayo, y el segundo ocurre entre Octubre y Noviembre. Dado que el crecimiento postnatal culmina a los 5 meses de edad (Greenhall et al. 1983), se consideró el segundo período para capturar a los murciélagos de esta especie; esto con el fin de tener murciélagos jóvenes nacidos durante la primavera previa y para capturar a las hembras que no presentaron señales de lactancia reciente. Las hembras que pudieron dar a luz a sus crías durante el segundo período de Octubre-Noviembre no fueron utilizadas en este proyecto.

- Jóvenes (> 3 meses <1 año y 3 meses): organismos delgados y pequeños (24.5–29.0 g de peso corporal y 56–59 mm de longitud de

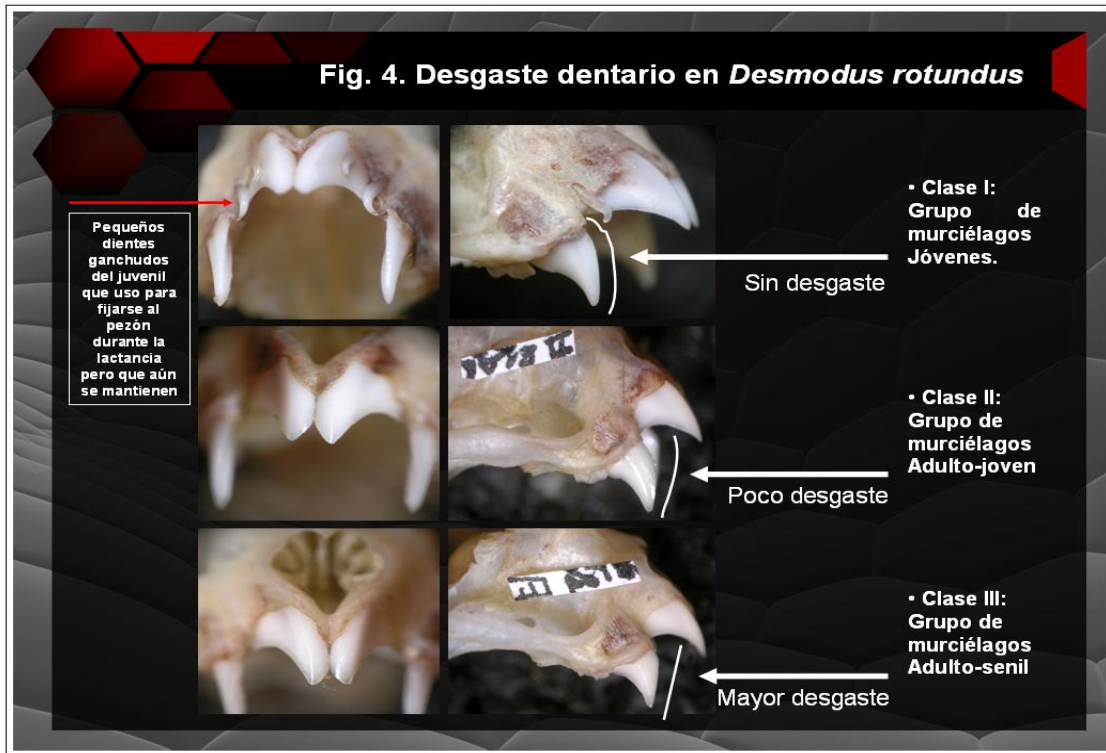
antebrazo), piel sin daño; con dientes que no presentaron desgaste (se puede ver a los juveniles con dientes adicionales en forma de gancho, que precisamente los utilizan para anclarse al pezón de la hembra mientras están alimentándose, esos dientes son desechados al destetar, aunque algunos individuos los mantienen hasta la pubertad por alguna razón desconocida, el adulto ya no los presenta) (**Fig. 4**) y epífisis fusionadas de forma incompleta (**Fig. 5**). En los machos, el testículo se encontraba en la posición intra-abdominal. Se ha reportado que los murciélagos hematófagos hembras tienen a sus primeras crías a los 15 meses de edad (Wilkinson, 1985), por lo que las hembras que se utilizaron son las que presentaron glándulas mamarias no conspicuas.

- Adultos (> 2 años <6 años): presentaron un grado leve de desgaste dental (**Fig. 4**) y epífisis cerradas por osificación (**Fig. 5**). Los machos se distinguieron por tener un tamaño mayor a los jóvenes (29.0–35.0 g de peso corporal y 60–63 mm de longitud de antebrazo). Esta especie es poligámica y se estructura en harem (Park, 1991). Los machos adulto son agresivos y muestran marcas visibles de heridas hechas por otros machos que defienden sus harems. Los testículos de los machos eran escrotales y con un diámetro de 5 mm, el tamaño de los murciélagos con una edad estimada de 12-14 meses (Wilkinson, 1985). Las hembras que habían lactado mostraron marcas de mordeduras en los pezones, lo cual se consideró en la clasificación.
- Viejos (> 10 años); especímenes corpulentos (> 35.0 g de peso corporal y > 63 mm de longitud del antebrazo), severo desgaste dentario (**Fig. 4**) y epífisis cerradas, metacarpo engrosado, con el grado máximo de

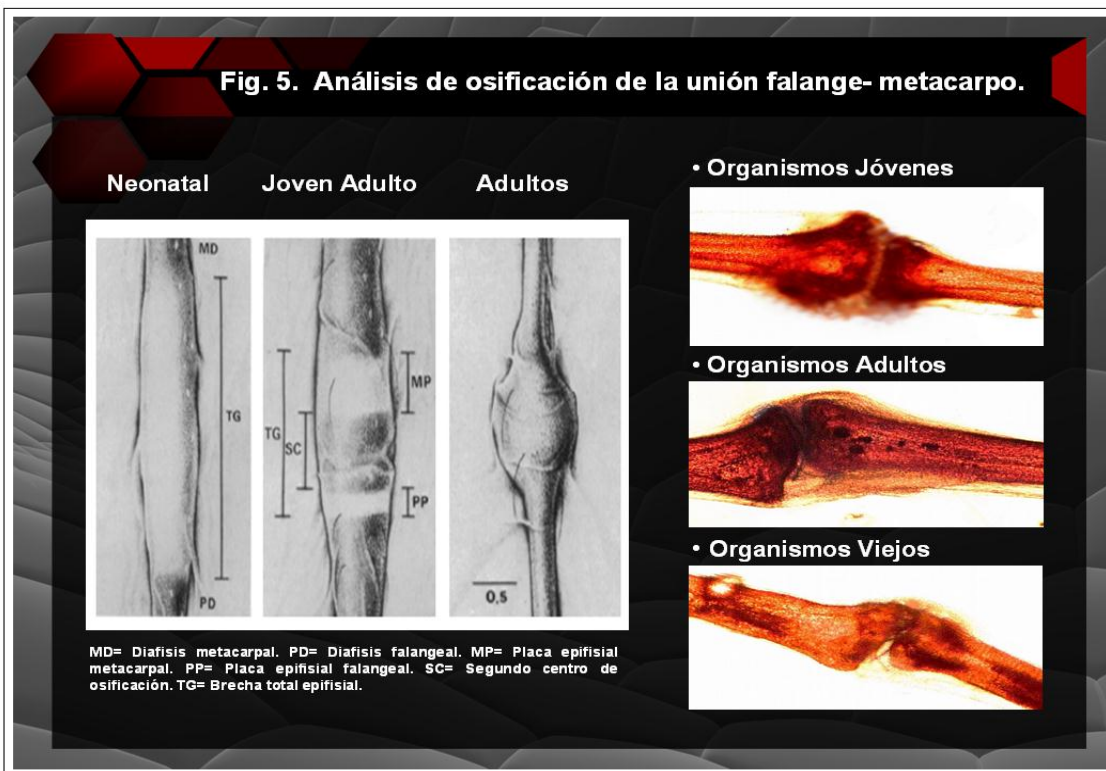
osificación (**Fig. 5**). Tanto los machos como las hembras mostraron señas de piel maltratada (patagio reseco, heridas de mordidas previas) y pelaje de color gris y duro. No se observaron señales de actividad sexual. Se observaron testículos escrotales en los machos y pezones pequeños en las hembras.

Con base en lo anterior, se establecieron 3 grupos de estudio para el análisis comparativo:

- El primer grupo estaba compuesto por 5 hembras y 5 machos de cada especie, con un estimado de 4 meses hasta 12 meses de nacidos (jóvenes control).
- El segundo grupo estaba compuesto por 5 hembras y 5 machos de cada especie, con 1 año y 3 meses hasta de 6 años de edad promedio (adultos).
- El tercer grupo estaba compuesto por 5 hembras y 5 machos de cada especie, con más de 6 años de edad (viejos).



Esquema de determinación de edades por desgaste dentario. Se observan las diferencias resaltadas en blanco de los organismos viejos.



Esquema de determinación de edades por osificación. Se observan las diferencias del tejido en proceso de osificación y desgaste de las estructuras óseas en viejos.

Determinación de los niveles de proteínas MSH2 y MLH1.

Inmunoanálisis: Western Blot

Se extrajeron tejidos de hígado, pulmón y cerebro de los grupos de edad determinados en las dos especies y se homogenizaron en una solución amortiguadora de lisis T-PER (50 mM Tris-HCl a pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% NP40, 100 mM NaF, 0.2 mM NaVO₃, 10 µg/ml de protinina, 5 mM PMSF y 10 µg/ml leupeptina). El volumen de la solución de lisis usada varió dependiendo del tamaño de las muestras, que oscilaron entre los 25-50 miligramos. Los homogenizados se incubaron a 4°C por 5-10 min. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm por 20 min a 4°C. El sobrenadante se colectó y la proteína aislada se guardó a -20°C para posteriormente cuantificar su concentración por ensayo tipo Bradford (Bradford, 1976) y realizar el inmunoensayo tipo Western Blot.

Se realizaron geles de poliacrilamida al 12% con 1 mm de grosor; se utilizaron 5 µl (100 µg) de las muestras de proteínas extraídas en dichos geles y fueron sometidos a electroforesis a 120 V por 2 horas (Laemmli, 1970). Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF mediante una cámara de transferencia durante 2 horas a un voltaje de 60 V a 4°C. Posteriormente la membrana de PVDF se bloqueó con 10 ml de TWEEN-TBS-leche 8% por 1 hora, se lavó y se le agregó el anticuerpo primario contra MSH2 (sc-494) y MLH1 (sc-582) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Estos anticuerpos se agregaron en un volumen de 10 ml, incorporando 20 µl de anticuerpo en una proporción de 1:750. Se hicieron lavados con la solución TBS-TWEEN durante 10 minutos y se realizó un segundo bloqueo de membrana con 10 ml de

solución TWEEN-TBS-leche 8% por 15 minutos. Se le agregó el anticuerpo secundario (sc-2004) en un volumen de 10 ml, incorporando 20 μ l de anticuerpo en una proporción de 1:500. Se lavó la membrana nuevamente en dos sesiones de 10 minutos cada una con la solución TBS-TWEEN y se expuso la membrana con 3 ml del sustrato quimioluminiscente del kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent por 2 minutos y se reveló en una imagen de fotodocumentador Kodak 1-D.

Extracción de ADN y reacción de PCR para análisis de inestabilidad microsatelital

Se realizó el aislamiento de ADN por la técnica de precipitación caotrópica por medio de yoduro de sodio (Matos *et al.*, 2001). Mediante esta técnica se pudo obtener la molécula de ADN de las células de los tejidos homogenizados a partir de 0.5 g de los tejidos en 1 ml de solución amortiguadora A (Sacarosa 320 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0.1 mM y 1% de Tritón-100, pH=7.5) y se centrifugó a 3300 rpm por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió la muestra en 1 ml de solución amortiguadora B (EDTA- Na_2 5 mM, desferroxamina 0.15 mM, Tris-HCl 10 mM, pH=8). Se incorporaron 350 μ l de solución SDS a 10% junto con la solución amortiguadora B y se resuspendió por inversión ligera. Para degradar moléculas de ARN presentes en cada muestra, se agregaron enzimas ARNasas T1 (40 μ l) y ARNasa A (60 μ l), a una concentración de 10 mg/ml y 1000 U/ml, respectivamente, durante un periodo de incubación de 1 hora. Posteriormente se utilizó la enzima proteasa K en una concentración de

20mg/ml para desnaturalizar proteínas que puedan degradar ADN durante un segundo periodo de incubación de 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó a cada muestra 2 ml de solución de yoduro de sodio (NaI 7.6 M, Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, desferroxamina 0.3 mM, pH=8) seguido de 3 ml de isopropanol absoluto. Se dejó la muestra toda la noche en reposo a -20° C. Al día siguiente se recuperó la muestra precipitada de ADN y se resuspendió con 1 ml de isopropanol al 60% en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó la muestra a 8090 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se volvió a resuspender la solución con 1 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar la muestra a 8090 rpm por 10 minutos a 4°C. Se retiró el etanol al 70% y se incorporaron de 200 a 300 µl de solución con desferroxamina 0.1 mM y se resuspendió hasta obtener una consistencia viscosa. Se midieron los niveles de la molécula de ADN por espectrofotometría a una frecuencia de onda de 260 y 280 nm (para realizar un cociente de pureza de la muestra de ADN), utilizando 10 µl de la muestra diluida en 990 µl con agua. Para determinar la pureza del ADN se consideró como valor aceptable de cociente > 1.75. La fórmula utilizada para determinar la concentración de ADN en la muestra es la siguiente:

$$\text{(Valor de absorbancia a 260 nm)(dilución)(50) = Cantidad de ADN en } \mu\text{g/ml}$$

Se utilizó 1 µl (100 ng) de cada muestra en una reacción de amplificación por PCR, considerando los siguientes oligos para la amplificación

de secuencias microsatélites: los oligos MS3DO2 y MS3EO2 fueron diseñados a partir de estudios realizados previamente en *Myotis sodalis* y los oligos DESM00 y DESM01 fueron diseñados a partir de estudios realizados en *Desmodus rotundus*. (Trujillo & Amelon, 2009; Piaggio *et. al.* 2008).

Tabla indicadora de secuencia oligos para PCR de secuencias microsatélites. MS3DO2 y MS3EO2, diseñadas para *M. velifer*. DESM00 y DESM01, diseñadas para *D. rotundus*.

MS3DO2 Forward	CTAAGACCCTTTCCAGCTCTCA
MS3DO2 Reverse	GATACCATCACTCTTTCCCCTG
MS3EO2 Forward	GCCAATAAGAGCCCAGACATAC
MS3EO2 Reverse	GGGGATTAGGGATAGGTTAGCA
DESM00 Forward	AGGTGGGTACTGCCCAGGATTATT
DESM00 Reverse	AAGAGCCCAGCATCTGACTTCCTT
DESM01 Forward	TTAGCAAGGAGCCAGCAGAGCATA
DESM01 Reverse	TCGTTCGGAACTTCTACCGCATCA

Se inició el proceso de PCR mediante una desnaturalización a 94°C por 5 minutos. Se agregó la GoTaq polimerasa (1.25 unidades diluidas en 10 µl) después de la desnaturalización inicial. Posteriormente, se iniciaron 35 ciclos designados para la reacción:

- 30 segundos a 95°C (desnaturalización)
- 30 segundos a 55°C (alineamiento).
- 30 segundos a 72°C (elongación).
- 4 min a 72°C (final de la elongación).

Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Superóxido Dismutasa (SOD): Se determinó la actividad de esta enzima utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa como un generador constante del radical superóxido, el cual al entrar en contacto con el nitroazul de tetrazolio (NBT) lo reduce y forma el producto formazan, cuyo color puede ser detectado por espectrofotometría cuando la SOD inhibe la reducción del NBT (Suzuki, 2000).

Se homogenizaron 25 mg de los tejidos en 2 ml de la solución para homogenizar a 50 mM, pH=7.5 (500 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, 8.33ml de EDTA a 60 mM, ajustada a 1 litro con H₂O desionizada) con 20 µl de solución PMSF 1mM (1.7 mg de PSMF, 10 ml de etanol).

Se centrifugaron las muestras a 330 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se incorporó en 25 µl de la muestra con 1.45 ml de la solución de trabajo (100 ml de solución amortiguadora de sodio-carbonato a 50 mM, 1.5 mg de xantina, 20.4 mg de NBT, 2.9 mg de EDTA), 25 µl de solución de xantina oxidasa preparada en fresco (0.1 U de XO en ml de sulfato de amonio 2 M). Para la muestra blanco de calibración, se incorporaron los mismos elementos, excepto que se utilizaron 25 µl de solución para homogenizar en lugar de muestra. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 560 nm, una lectura cada 30 segundos durante 5 min.

Las actividades se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

- % de inhibición= $\frac{\text{Absorbancia a 560 nm blanco} - \text{Absorbancia a 560 nm muestra}}{\text{Valor de absorbancia a 560 nm blanco}} (100)$
- USOD/ml= (% de inhibición) / (50%) (ml de muestra)
- USOD/mg proteína de tejidos= [(U/ml) / (mg/ml de proteína en la muestra)] Factor de dilución

Catalasa (CAT): Se determinó la actividad de esta enzima utilizando como sustrato para la misma el H₂O₂, midiendo el decremento de su concentración por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 240 nm (Aebi, 1984).

Se homogenizaron 25 mg de los tejidos en 2 ml de la solución para homogenizar a 50 mM, pH=7.5 (500 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, 8.33ml de EDTA a 60 mM, ajustada a 1 litro con H₂O desionizada) con 20 µl de solución PMSF 1mM (1.7 mg de PSMF, 10 ml de etanol). Se centrifugaron las muestras a 300 rpm durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se incorporó en una celda de cuarzo 10 µl de la muestra con 1.5 ml de la solución de trabajo (200 ml de solución amortiguadora de fosfatos a 0.1 M, 200 ml de H₂O₂ a 20 mM). Para la muestra blanco de calibración, se incorporaron los mismos elementos pero sin muestra. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 240 nm, midiendo la reducción de la concentración de H₂O₂ cada 15 segundos durante 1 min.

Las actividades se calcularon mediante la siguiente ecuación:

- $$\text{UCAT/g de proteína (tejidos)} = \frac{\text{Absorbancia a 240 nm} / 0.0394}{\text{mg/ml de proteína en la muestra}} (1000)$$

Glutación peroxidasa (GPx): Se determinó su actividad mediante la catalización del H₂O₂ en H₂O mediada por glutación reducido; se monitoreó la reducción del NADPH al mantener constantes los niveles de glutación reducido (Flohé & Günzler, 1984).

Se homogenizaron 25 mg de los tejidos en 2 ml de la solución para homogenizar a 50 mM, pH=7.5 (5 ml de solución amortiguadora de fosfatos 500 mM pH=7.2, 0.5 ml de EDTA a 50 mM, 44.5 ml de H₂O desionizada) con 20 µl de solución PMSF 1mM (1.7 mg de PSMF, 10 ml de etanol). Se centrifugaron las muestras a 300 rpm durante 25 min. a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

Para realizar la cuantificación:

- Se utilizó un blanco experimental contenido en una celda de cuarzo que tenía 100 µl de solución de azida de sodio 20 mM, 100 µl de solución de glutación reductasa a 15 U/ml, 100 µl de solución de NADPH a 1.5 mM y 500 µl de H₂O desionizada. Se registró la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Todas las soluciones se preparan en fresco, además de ser sensibles a la luz.
- Luego se utilizó un primer blanco, a partir del blanco experimental, agregando 20 µl de solución de GSH 250 mM y 50 µl de la muestra. Se

registró el cambio en la absorbancia a 340 nm cada 3 seg. durante 40 seg.

- Posteriormente se agregaron 20 µl de solución de H₂O₂ 10 mM a la celda anterior. Se registró la absorbancia nuevamente cada 3 seg. durante 40 seg.
- Finalmente se preparó en una celda de plástico 100 µl de solución amortiguadora de fosfatos 500 mM pH=7.2, 10 µl de solución EDTA 50 mM, 100 µl de NaN₃, 100 µl de glutatión reductasa a 15 U/ml, 100 µl de solución NADPH a 1.5 mM, 550 µl de H₂O desionizada, 20 µl de GSH y 20 µl de H₂O₂. Se realizó una lectura a 340 nm.

Las actividades se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

- $UGPx/ml = [(Absorbancia\ a\ 340\ nm\ muestra - Absorbancia\ a\ 340\ nm\ primer\ blanco - Absorbancia\ a\ 340\ nm\ segundo\ blanco) / 6.22] (400)$
- $UGPx/mg\ proteina\ de\ tejido = (UGPx) / (mg/ml\ de\ proteina\ de\ la\ muestra)$

Análisis estadístico de resultados

Se realizaron mediciones básicas de estadística descriptiva: media, desviación estándar, varianza y error estándar. Así mismo, a los resultados obtenidos se les aplicó una prueba de normalidad de Levene. Para determinar las diferencias entre los órganos se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se consideró como nivel de significancia estadística $p < 0.05$ y se realizó la prueba de Tukey-Kramer para análisis inter e intragrupal.

Resultados

Análisis de niveles de proteínas MMR

Los niveles de MSH2 y MLH1 cuantificados en hígado, pulmón y cerebro, tanto de *M. velifer* como de *D. rotundus* (**Fig. 6 y 7** respectivamente), fueron normalizados con respecto al contenido proteínico obtenido de los animales jóvenes, a los cuales se les asignó el valor arbitrario de uno, y son representados por el resultado del ensayo de Western Blot y sus correspondientes densitometrías.

a) *Myotis velifer*

En *M. velifer*, se observó una disminución de ambas proteínas MMR en los organismos viejos comparativamente con los organismos adultos y jóvenes. Los niveles en hígado y pulmón de la proteína MSH2, (**Fig. 6 a-b**) encontrados en el grupo de las hembras viejas fueron aproximadamente 25% más bajos que aquellos observados en las hembras adulto; mientras que en los machos viejos, los niveles de MSH2 fueron solamente 10% más bajos en comparación con los machos adultos ($p < 0.05$). En el caso del cerebro, (**Fig. 6c**), los niveles de MSH2 fueron 19% más bajos en las hembras adulto en comparación con las hembras jóvenes, mientras que en los machos adulto fueron 24% más bajo con respecto a los machos jóvenes ($p < 0.05$). En general, el contenido de MSH2 encontrado en las muestras de hígado fue distinto en los grupos de murciélagos viejos en términos del género, ya que las hembras mostraron niveles de la proteína 10% más bajos ($p < 0.05$) en comparación con los machos.

Los niveles de la proteína MLH1 en *M. velifer*, se encontró que estos fueron más bajos en las hembras adulto (11%) y viejas (15%) en comparación con las hembras jóvenes (**Fig. 6d**). En el caso de los murciélagos macho, la diferencia entre los organismos adulto y los jóvenes varió entre tejidos, un dato que fue más evidente en las muestras de cerebro (**Fig. 6f**), donde la disminución fue cercana al 25% ($p < 0.05$).

Una diferencia entre los grupos por género fue observada en las muestras de cerebro de murciélagos adultos, donde el decremento de los niveles de proteína MLH1 fueron mayores en las hembras con respecto a los machos (12%) ($p < 0.05$).

b) Desmodus rotundus

En la especie *D. rotundus*, los niveles de MSH2 y MLH1 en el grupo de murciélagos adultos fueron significativamente más bajos que los determinados en los murciélagos jóvenes (**Fig. 7a-f**) ($p < 0.05$). En el hígado, los niveles de MSH2 (**Fig. 7a**) fueron aproximadamente 43% más bajos en las hembras adulto comparadas con las jóvenes ($p < 0.05$); mientras que en el pulmón, la diferencia fue de 27% (**Fig. 7b**, $p < 0.05$) y en cerebro la reducción fue solamente 14% (**Fig. 7c**, $p < 0.05$). En general, los grupos de hembras fueron los que mostraron una menor diferencia en los niveles de MSH2 en términos de edad al compararlos con los machos.

En los machos adulto, los niveles de la proteína MLH1 fueron aproximadamente 20% más bajos en cada uno de los tres tejidos (**Fig. 7d-f**). Tanto en machos como en hembras se encontraron diferencias significativas en

términos de la proteína MLH1 en cerebro, lo que no se vio reflejado en los otros tejidos (13% menos en la hembras, $p < 0.05$) (Fig. 7f).

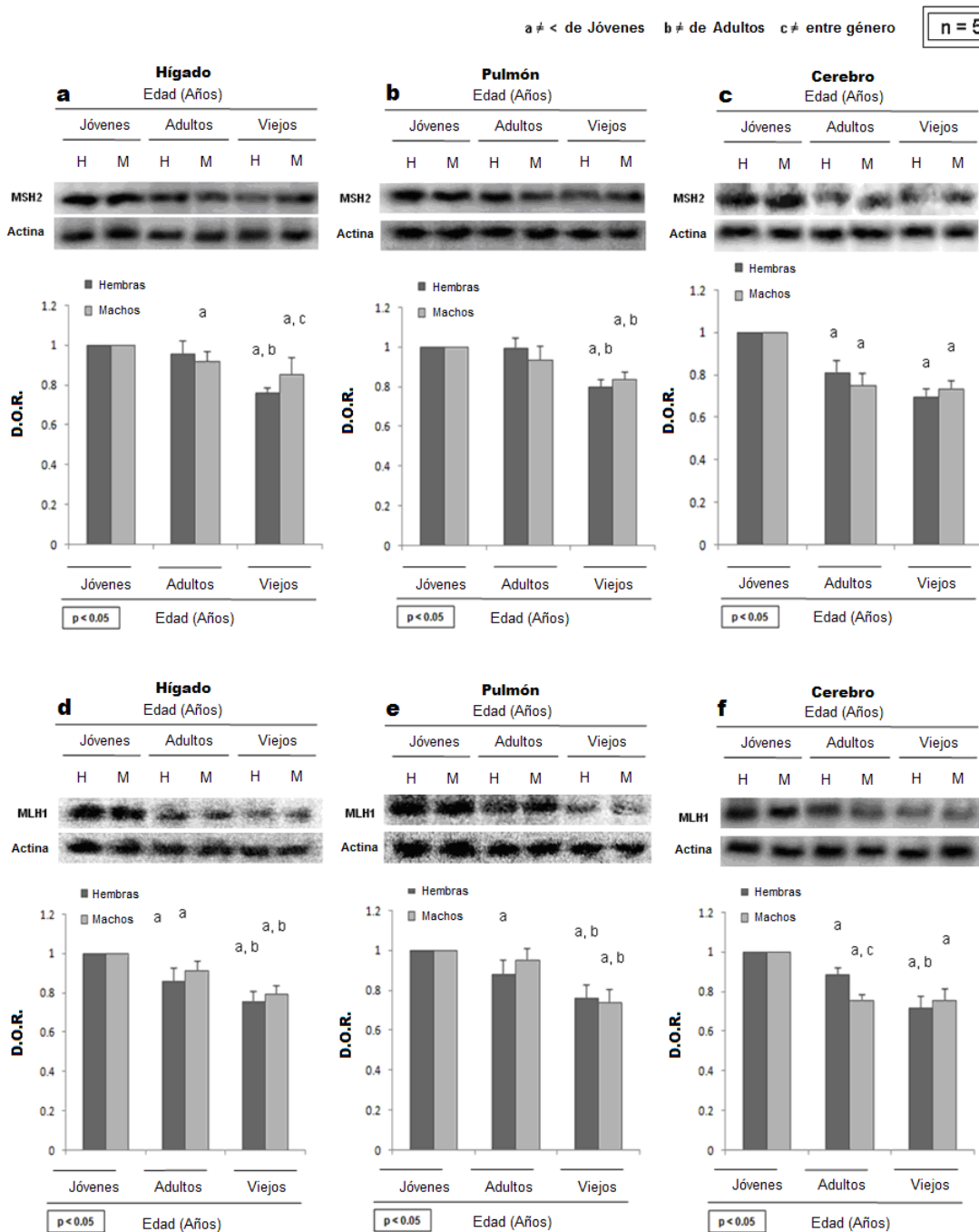


Figura 6. Niveles de proteínas MMR en *Myotis velifer*. Se observan imágenes representativas del ensayo tipo Western blot y densitometrías representativas de tejidos de hígado (a y d), pulmón (b y e) y cerebro (c y f). Peso molecular de MSH2=100 kDa. Peso molecular de MLH1= 85 kDa. Peso molecular de Actina= 42 kDa. $n = 5$ por cada grupo de edad.

a ≠ de Jóvenes b ≠ de Adultos c ≠ entre género

n = 5

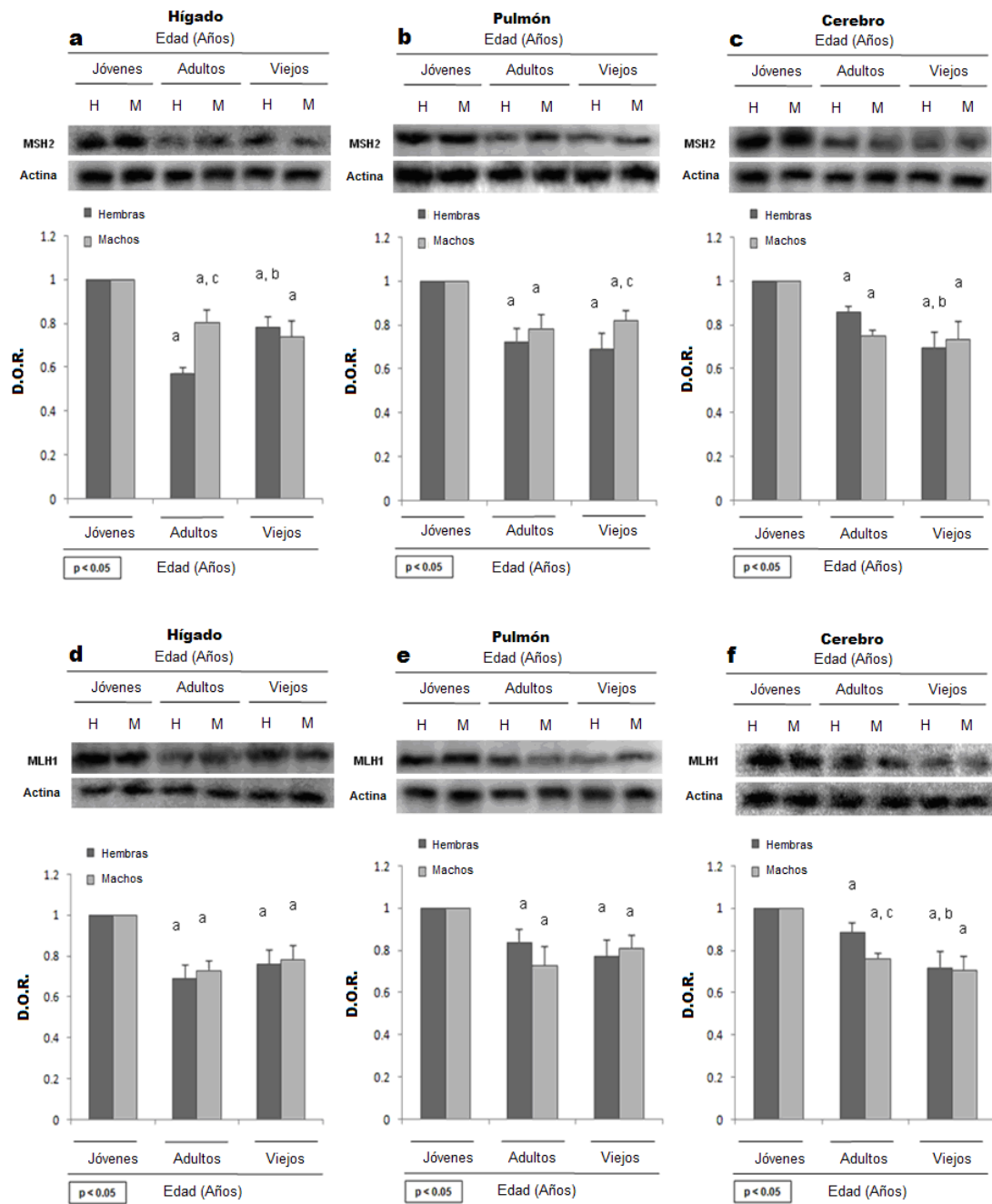


Figura 7. Niveles de proteínas MMR en *Desmodus rotundus*. Se observan blots y densitometrías representativas de tejidos de hígado (a y d), pulmón (b y e) y cerebro (c y f). Peso molecular de MSH2=100 kDa. Peso molecular de MLH1= 85 kDa. Peso molecular de Actina= 42 kDa. $n= 5$ por cada grupo de edad.

Evaluación de microsatélites en ADN mediante análisis por PCR.

a) *Myotis velifer*

En la figura 8a-f se observan los resultados obtenidos de la amplificación de secuencias microsatélites MS3DO2 y MS3EO2 en *M. velifer*. En todos los casos se observó un incremento en las secuencias microsatélites en los tejidos de murciélagos viejos. En las hembras viejas, las muestras de hígado y pulmón mostraron un incremento del 40% y 18%, respectivamente en el caso del marcador MS3DO2, al ser comparados con las hembras adulto. Al comparar los datos correspondientes para las hembras jóvenes contra viejas, la diferencia es del 43% y 32%, en hígado y pulmón, respectivamente ($p < 0.05$) (Fig. 8 a-b). Se encontró un incremento en la inestabilidad de las secuencias del segundo marcador microsatelital, MS3EO2, en los pulmones de hembras viejas comparados con los de hembras adulto y jóvenes ($p < 0.05$) (Fig. 8 d-e).

Las muestras de cerebro de las hembras viejas presentaron un incremento del 26% en el caso del marcador MS3DO2 y del 29% para el marcador MS3EO2 ($p < 0.05$) en comparación con el grupo de hembras adulto (Fig. 8c y 8f). MS3EO2 fue el marcador con el mayor incrementó, con un 45% en hígado y 22% en pulmón, en comparación con los mismos tejidos pero de machos adulto ($p < 0.05$). En el caso de los machos viejos, los niveles de MS3DO2 en hígado fueron 13% más elevados que los niveles observados en machos adultos ($p < 0.05$). Mientras que en las muestras de cerebro, ambos marcadores fueron significativamente más elevados (45% para MS3DO2 y 28% para MS3EO2) comparados con los organismos adulto ($p < 0.05$).

Se encontraron diferencias por género con respecto a las secuencias microsatélites del marcador MS3DO2. Las hembras viejas presentaron un incremento de 21% en el marcador MS3DO2 en hígado, comparado con ese mismo tejido obtenido de machos viejos, mientras que las muestras de cerebro de machos viejos presentaron un aumento del 33% en los niveles del marcador MS3DO2, comparado con los encontrados para las hembras viejas. En el caso del marcador MS3EO2, se encontraron diferencias de género solamente en el pulmón, cuantificándose 26% más secuencias microsatélites en las hembras viejas que en los machos viejos.

b) Desmodus rotundus

En el caso de la especie *D. rotundus*, los marcadores microsatelitales DESMOO y DESMO1 fueron más bajos en los organismos adulto comparados con los organismos jóvenes y viejos (**Fig. 9 a-f**) ($p < 0.05$); pero en general, ambos marcadores microsatelitales se vieron incrementados en los grupos de organismos viejos y esto se evidenció en particular con las muestras de cerebro (**Fig. 9c y 9f**) ($p < 0.05$). Los niveles del marcador DESMOO fueron menores en hígado y pulmón de hembras adulto en comparación con las hembras jóvenes (10 y 21%, respectivamente; $p < 0.05$) (**Fig. 9 a-b**). En machos, los niveles del marcador DESMOO fueron mayores en un 20% para hígado y 10% para pulmón, mientras que en las muestras de cerebro, la diferencia fue del 13% ($p < 0.05$), todo ello al comparar las muestras con las correspondientes para los organismos jóvenes.

a ≠ de Jóvenes b ≠ de Adultos c ≠ entre género

n = 5

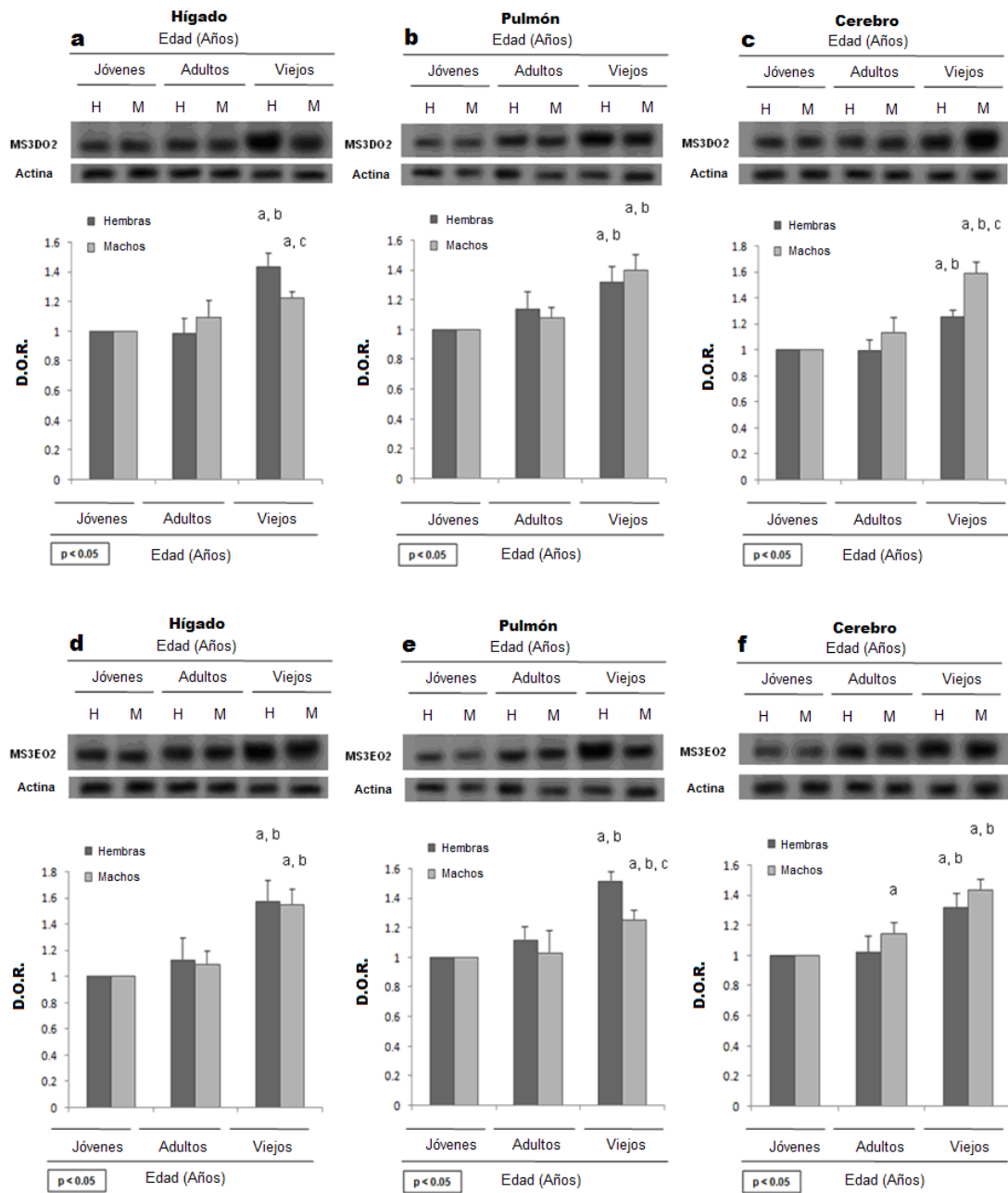


Figura 8. Amplificaciones de secuencias microsatélites en *Myotis velifer*. Se observan imágenes y densitometrías representativas de tejidos de hígado (a y d), pulmón (b y e) y cerebro (c y f). Tamaño de secuencia MS3D02=229 pb. Tamaño de secuencia MS3E02= 409 pb. Tamaño de secuencia Actina= 150 pb. $n=5$ por cada grupo de edad.

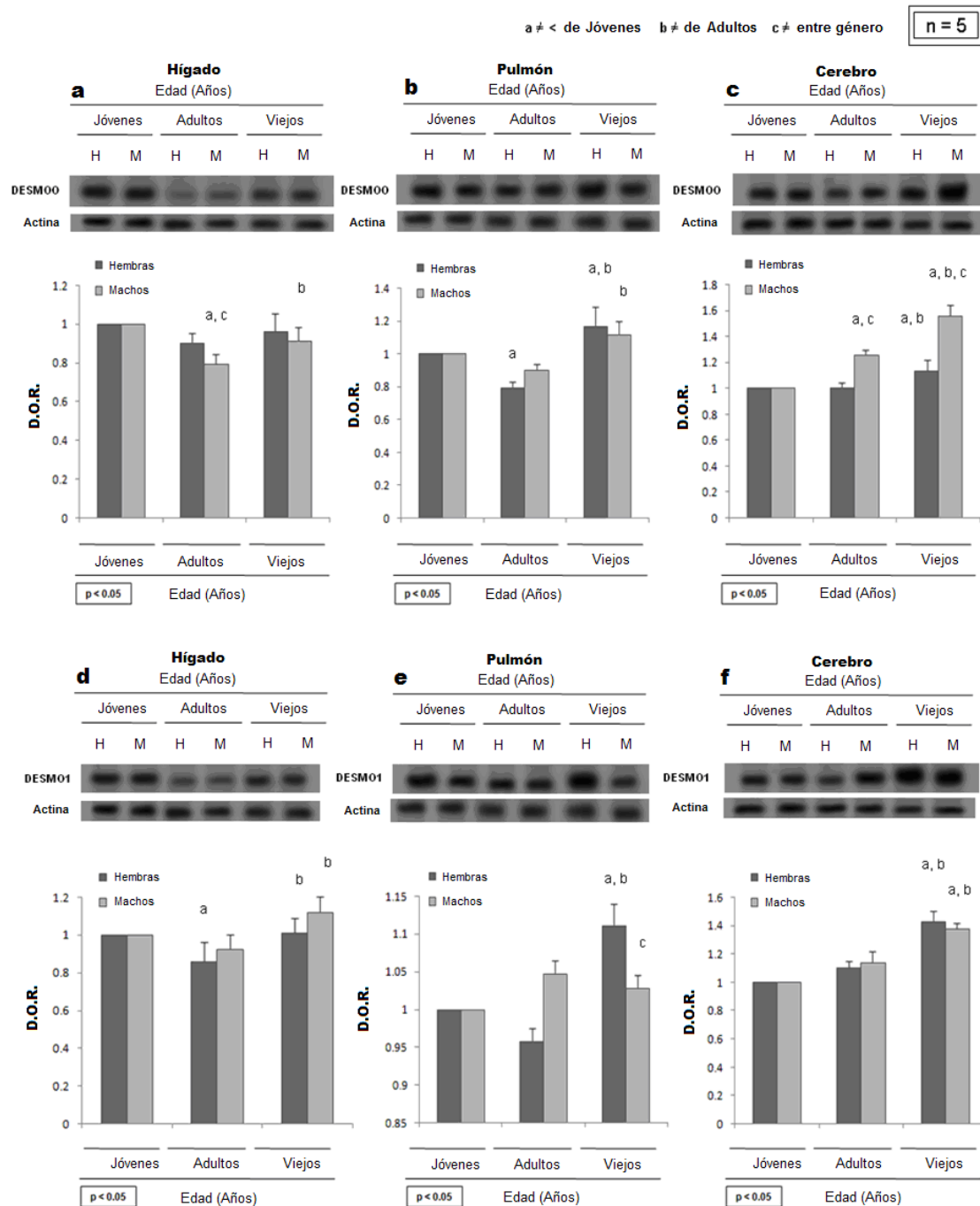


Figura 9. Amplificaciones de secuencias microsatélites en *Desmodus rotundus*. Se observan imágenes y densitometrías representativas de tejidos de hígado (a y d), pulmón (b y e) y cerebro (c y f). Tamaño de secuencia DESMOO=200 pb. Tamaño de secuencia DESMO1= 300 pb. Tamaño de secuencia Actina= 150 pb. $n = 5$ por cada grupo de edad.

Análisis del nivel de actividad de las enzimas antioxidantes

Los resultados obtenidos de los ensayos con enzimas antioxidantes se muestran en las Tablas 1, 2 y 3, en donde se observa que las actividades de CAT y GPx fueron menores en los murciélagos viejos de ambas especies en comparación con los murciélagos jóvenes y adultos, siendo menores las actividades determinadas en el cerebro ($p < 0.05$).

a) M. velifer

En *M. velifer*, las muestras de hígado presentaron mayor actividad de CAT tanto en hembras jóvenes como en machos jóvenes ($p < 0.05$), mientras que la actividad de CAT fue significativamente más baja en los organismos viejos (60% en hembras y 66% en machos) ($p < 0.05$) (**Tabla 1**). La actividad de GPx fue menor en los machos viejos comparados con los jóvenes (47% y 52%, respectivamente) (**Tabla 2**).

b) D. rotundus

En *D. rotundus*, tanto la actividad de CAT como la actividad de GPx fueron mayores en comparación con las actividades de las mismas enzimas en *M. velifer* ($p < 0.05$). En particular, la mayor actividad de GPx fue encontrada en los hígados de las hembras jóvenes de *D. rotundus*; la actividad fue 43% en las hembras viejas y en un 53% en machos viejos ($p < 0.05$). Con la excepción de la actividad de CAT en cerebro y GPx en pulmones de machos, la actividad enzimática antioxidante en los tejidos de organismos viejos de *D. rotundus* fue similar a lo visto en tejidos de organismos adultos de *M. velifer*.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de la enzima SOD, entre los grupos de estudio de ambas especies, aunque se aprecia una tendencia hacia una mayor actividad en hígado, seguida por pulmón y luego cerebro, en orden descendiente. Así mismo, los individuos viejos tienen generalmente mayor actividad de SOD que los adultos y los jóvenes independientemente del órgano analizado, y esta diferencia se presenta tanto en hembras como en machos de las dos especies. Al analizar los datos de forma específica, se determinó que, tanto en *M. velifer* como en *D. rotundus*, la actividad de las enzimas SOD, CAT y GPx fue (en orden decreciente) mayor en hígado, seguido por la actividad en pulmón y finalmente en cerebro, tanto en hembras como en machos. La actividad de las enzimas CAT y GPx fue mayor en el grupo de organismos jóvenes, y disminuyó en los grupos de adultos y viejos, también en hembras y en machos. También se observó que la actividad de la enzima CAT en cerebro era mayor en machos con respecto a hembras, mientras que la actividad de la enzima GPx en el mismo órgano es mayor en hembras con respecto a machos.

Se observó mayor actividad de la enzima SOD, en los organismos viejos al compararlos con los jóvenes y adultos en hembras y en machos; aunque en algunos casos la actividad registrada en los adultos fue mayor que en los jóvenes y en otros fue mayor en el joven que en el adulto, la constante es que la actividad se mantiene elevada en los órganos de los viejos. La actividad de SOD en cerebro no mostró una tendencia clara en las diferencias por género.

Tabla 1. Actividad de específica de enzima CAT en *M. velifer* y *D. rotundus*.

Actividad CAT (mmol/g)							
<i>Myotis velifer</i>				<i>Desmodus rotundus</i>			
Hembras	Hígado	Pulmón	Cerebro	Hembras	Hígado	Pulmón	Cerebro
Jóvenes	10.34±0.28	7.43±0.09	0.950±0.21	Jóvenes	13.39±0.22	7.11±0.24	2.46±0.33
Adultas	9.47±0.12	5.77±0.33	0.76±0.41	Adultas	11.42±0.30	10.74±0.42	1.89±0.52
Viejas	4±0.19*,**	3.95±0.16*	0.27±0.14*,**	Viejas	9.79±0.25	5.62±0.57	0.78±0.43*
Machos	Hígado	Pulmón	Cerebro	Machos	Hígado	Pulmón	Cerebro
Jóvenes	9.51±0.22	8.8±0.21	3.11±0.31	Jóvenes	12.92±0.31	8.42±0.15	3.21±0.49
Adultos	6.72±0.14	7.67±0.45	2.53±0.88	Adultos	11.35±0.41	9.26±0.17	4.17±0.25
Viejos	3.33±1.19*,**	2.78±0.17*,**	0.97±0.33*	Viejos	8.43±0.38	7.69±0.38	1.43±0.37*

Datos de la tabla: Análisis de ANOVA, ($p < 0.05$, $n = 5$); *= diferencia significativa de grupos viejos vs. jóvenes, **= diferencia significativa de grupos viejos vs. jóvenes y adultos.

Tabla 2. Actividad específica de enzima GPx en *M. velifer* y *D. rotundus*.

Actividad GPx (mmol/g)							
<i>Myotis velifer</i>				<i>Desmodus rotundus</i>			
Hembras	Hígado	Pulmón	Cerebro	Hembras	Hígado	Pulmón	Cerebro
Jóvenes	21.71±0.62	17.36±0.44	13.87±0.52	Jóvenes	41.73±0.85	30.90±0.75	13.54±0.98
Adultas	16.13±0.22	14.23±0.17	8.12±0.78	Adultas	36.12±0.80	22.41±0.49*	7.31±0.67*
Viejas	10±0.74*	5.82±0.64*,**	3.61±0.54*,**	Viejas	18.21±0.64*,**	11.72±0.79*,**	1.45±0.35*,**
Machos	Hígado	Pulmón	Cerebro	Machos	Hígado	Pulmón	Cerebro
Jóvenes	27±0.82	15.84±0.91	8.76±0.81	Jóvenes	36.19±0.84	13.27±0.75	6.31±1.01
Adultos	19.38±0.24*	12.30±1.05	5.13±0.44	Adultos	27.74±0.61*	12.26±0.96	5.68±0.49
Viejos	14.21±0.98*	7.42±0.56*,**	2.39±0.92*	Viejos	18.99±0.38*,**	5.24±0.13*,**	2.07±0.62

Datos de la tabla: Análisis de ANOVA, ($p < 0.05$, $n = 5$); *= diferencia significativa de grupos viejos vs. jóvenes, **= diferencia significativa de grupos viejos vs. jóvenes y adultos.

Tabla 3. Actividad específica de enzima SOD en *M. velifer* y *D. rotundus*.

Actividad SOD							
<i>Myotis velifer</i>				<i>Desmodus rotundus</i>			
Hembras	Hígado	Pulmón	Cerebro	Hembras	Hígado	Pulmón	Cerebro
Jóvenes	1640.84±35.9	568.21±30.65	240.73±49.08	Jóvenes	2144.07±24.8	732.89±19.20	240.73±49.08
Adultas	1540.24±57.13	464.87±25.21	348.17±41.21	Adultas	1998.75±24.98	807.71±42.66	348.17±41.21
Viejas	1935±35.77	591.31±27.10	407.12±32.99	Viejas	2311±46.09	994.74±33.74	407.12±32.99
Machos	Hígado	Pulmón	Cerebro	Machos	Hígado	Pulmón	Cerebro
Jóvenes	1471±25.77	573.84±32.44	336.88±36.30	Jóvenes	2009±13.21	628.17±10.31	210.74±21.01
Adultos	1530.42±21.41	512.80±31.61	292.31±47.11	Adultos	1792.33±31.02	632.40±38.11	311.02±4.77
Viejos	1766.21±17.09	688.39±28.03	422.28±47.05	Viejos	2206.55±45.19	819.22±7.29	475.24±23.67

Datos de la tabla: Análisis de ANOVA, ($p < 0.05$, $n = 5$); *= diferencia significativa de grupos viejos vs. jóvenes, **= diferencia significativa de grupos viejos vs. jóvenes y adultos.

Para determinar si existe una correlación entre los niveles de MSH2 y MLH1 con la IMS y si este tipo particular de daño al ADN pudiera correlacionar con la actividad de las enzimas antioxidantes, se realizó una regresión

matemática lineal para cada par de variables de estudio. El resultado obtenido del análisis en *M. velifer* para ambos marcadores microsatélites y su relación con MSH2 y MLH1 se muestra en las figuras 10 y 12 respectivamente. De la misma forma se presentan en las figuras 11 y 13 las mismas correlaciones para *D. rotundus*. Mientras que la regresión realizada entre marcadores microsatelitales y las enzimas antioxidantes se muestra en las figuras 14 (para CAT) y 16 (para GPX), las Figuras 15 y 17 muestran el mismo tipo de análisis para *D. rotundus*.

En *M. velifer* se aprecia una correlación inversa entre la reducción de los niveles de MSH2 y los marcadores MS3DO2 (**Fig. 10 a-c**) y MS3EO2 (**Fig. 10 d-f**), así como una reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes. Esta correlación es más evidente en los murciélagos viejos al ser comparados con los murciélagos jóvenes y adultos. Se observa la misma correlación inversa entre la reducción de los niveles de MLH1 con un incremento de los marcadores MS3DO2 (**Fig. 12 a-c**) y MS3EO2 (**Fig. 12 d-f**), así como con la actividad de las enzimas antioxidantes.

En *D. rotundus*, se observa que no hay correlación entre los los niveles de MSH2 con una reducción de los marcadores DESMOO en los organismos adultos y viejos (**Fig. 11 a-c**) y DESMO1 (**Fig. 11 d-f**), así como con la actividad de las enzimas antioxidantes. Esta falta de correlación se observa también en los niveles de MLH1 con los marcadores DEMOO (**Fig. 13 a-c**) y DESMO1 (**Fig. 13 d-f**), así como con la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPx (**Fig. 15 y 17**). En cerebro se encontró una correlación entre los niveles de enzimas antioxidantes y variaciones de secuencias microsatélites (**Fig. 17 e- f**).

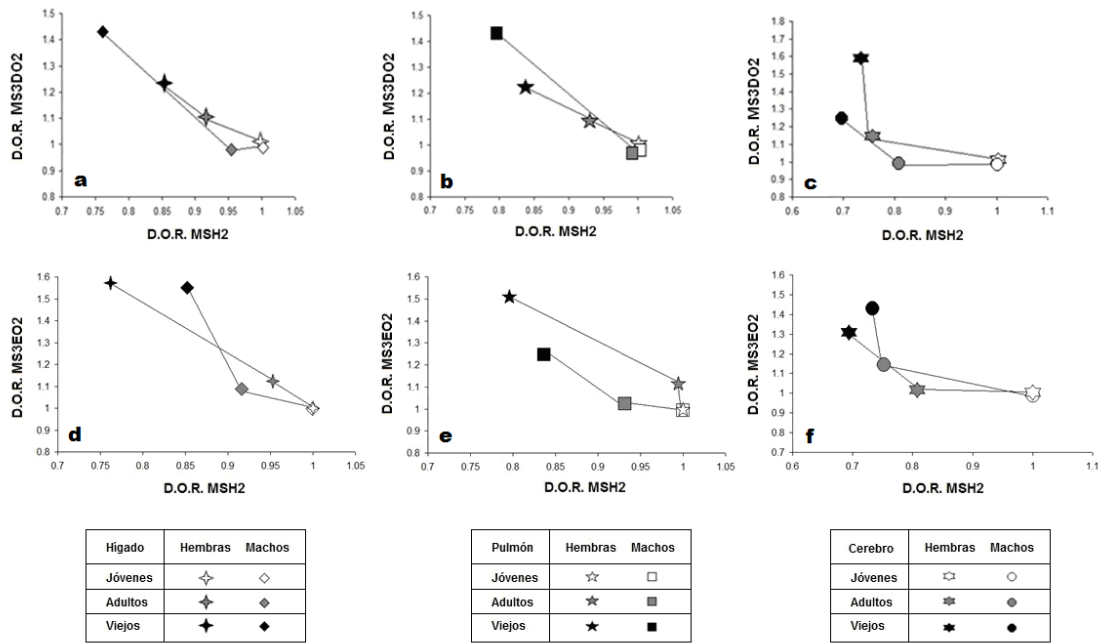


Figura 10. Nomogramas comparativos de MSH2 y secuencias microsatélites MS3DO2 y MS3EO2 en *Myotis velifer*. $n=5$ por cada grupo de edad.

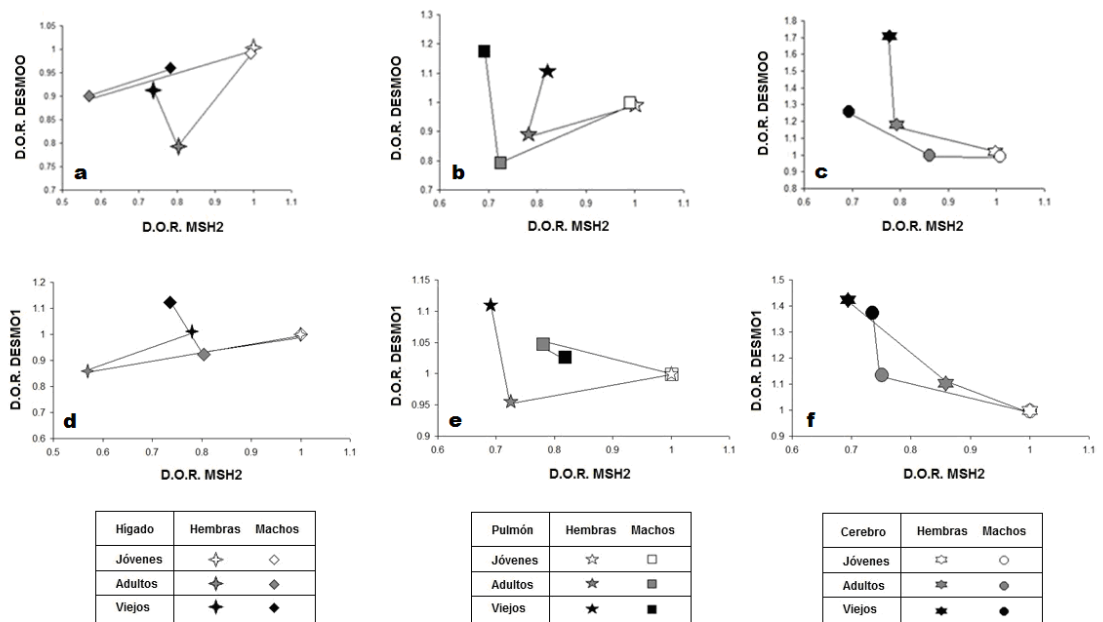


Figura 11. Nomogramas comparativos de MSH2 y secuencias microsatélites DESMOO y DESMO1 en *Desmodus rotundus*. $n=5$ por cada grupo de edad.

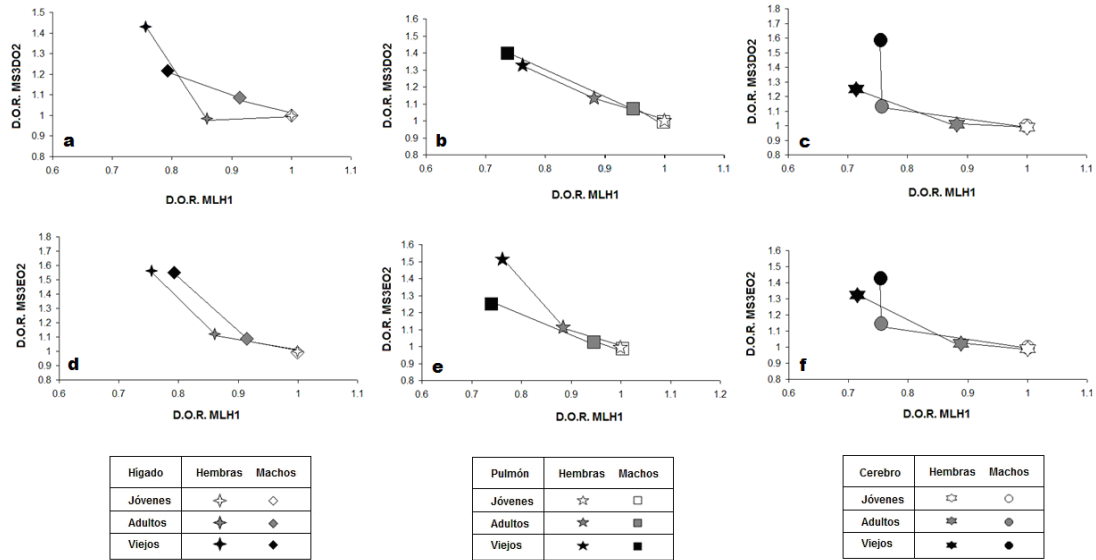


Figura 12. Nomogramas comparativos de MLH1 y secuencias microsatélites MS3DO2 y MS3EO2 en *Myotis velifer*. $n=5$ por cada grupo de edad.

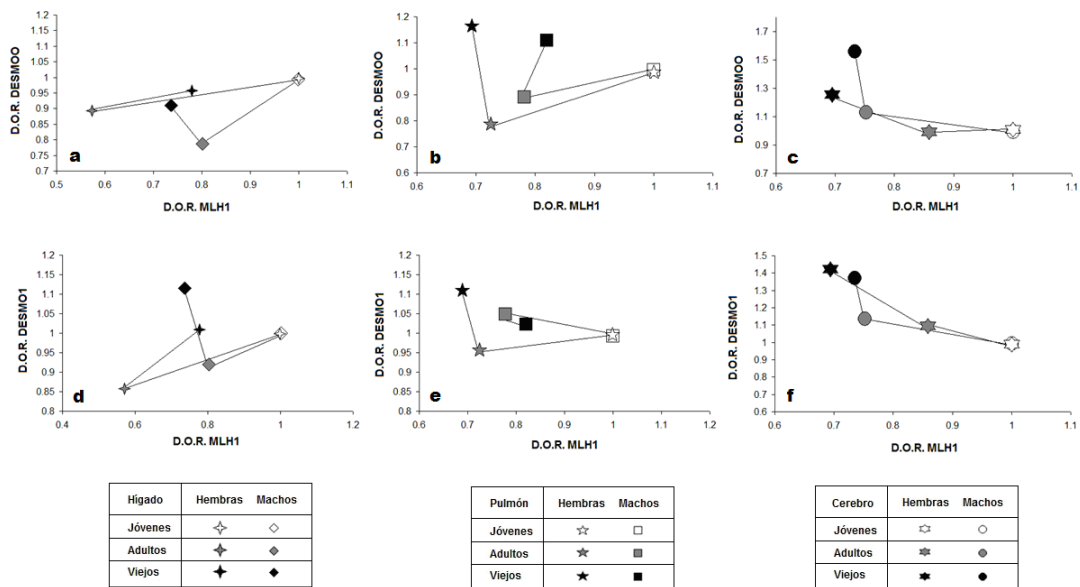


Figura 13. Nomogramas comparativos de MLH1 y secuencias microsatélites DESMOO y DESMO1 en *Desmodus rotundus*. $n=5$ por cada grupo de edad.

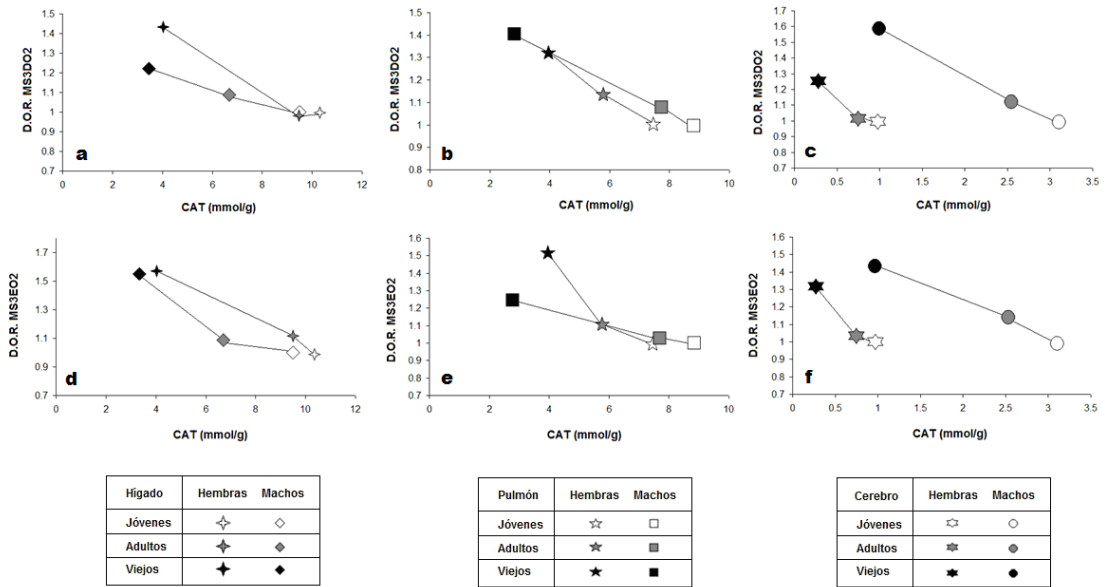


Figura 14. Nomogramas comparativos de secuencias microsatélites MS3DO2 y MS3EO2 con respecto a la actividad de la enzima CAT en *Myotis velifer*. $n=5$ por cada grupo de edad.

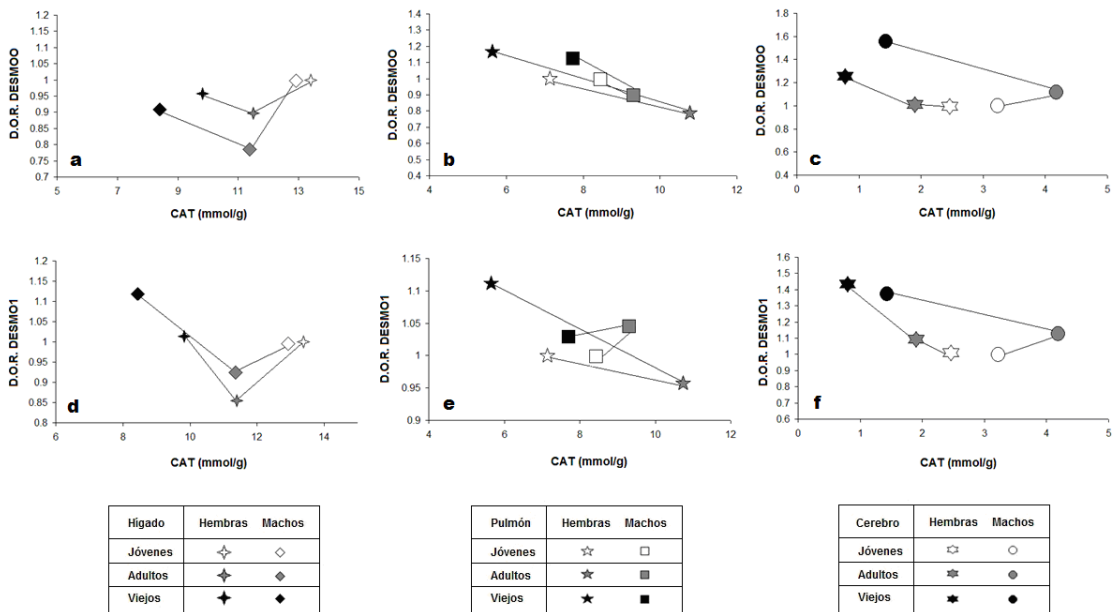


Figura 15. Nomogramas comparativos de secuencias microsatélites DESMOO y DESMO1 con respecto a la actividad de la enzima CAT en *Desmodus rotundus*. $n=5$ por cada grupo de edad.

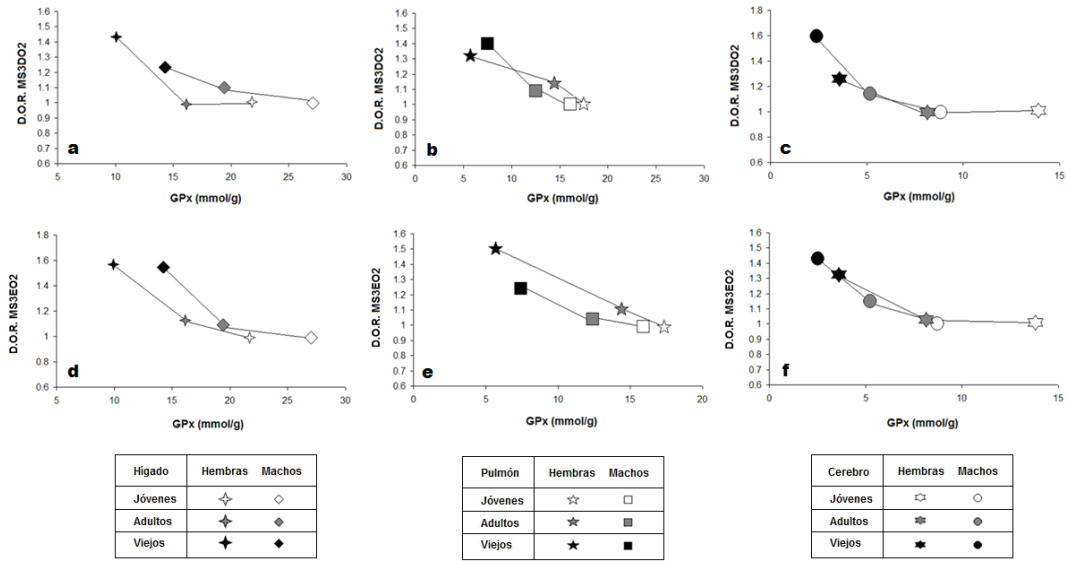


Figura 16. Nomogramas comparativos de secuencias microsatélites MS3DO2 y MS3EO2 con respecto a la actividad de la enzima GPx en *Myotis velifer*. $n=5$ por cada grupo de edad.

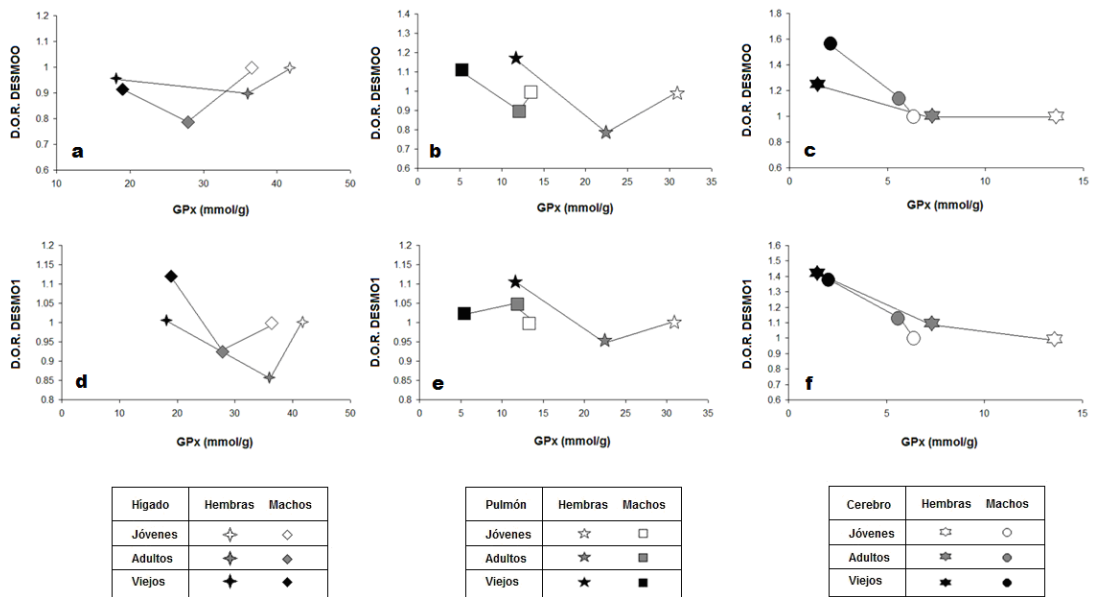


Figura 17. Nomogramas comparativos de secuencias microsatélites MS3DO2 y MS3EO2 con respecto a la actividad de la enzima GPx en *Desmodus rotundus*. $n=5$ por cada grupo de edad.

Discusión

La IMS es el resultado de la acumulación de cambios anormales en la secuencia genética, tales como mutaciones, que se generan a lo largo de la vida de un organismo y que no se corrigieron a consecuencia de factores como fallos en la maquinaria de reparación de ADN (Narine et al. 2007). Se ha sugerido que el daño al ADN por estrés oxidante puede inducir la IMS durante el proceso de replicación del ADN (Jackson & Loeb 2000). Por lo tanto, se requiere entender la relación entre la eficiencia de los mecanismos antioxidantes y de reparación, el daño al ADN y la longevidad. Sin embargo, datos que apoyen dicha relación son escasos y no concluyentes. Las ERO han sido consideradas como un factor inductor de daños al ADN, que tienen un impacto sobre la fidelidad genética y la homeostasis celular (Jackson et al. 1998). Se ha demostrado que la IMS incrementa cuando se dan deficiencias en el sistema de reparación MMR en el ADN, en particular cuando se presentan fallas en la expresión de la proteína MSH2. En modelos experimentales como cepas de *E. coli* genéticamente modificadas para tener deficiente el sistema de reparación por malos apareamientos, se generan incrementos de frecuencias de mutación de cambio de secuencias de hasta 300 veces más que en las cepas silvestres (Jackson et al. 1998). En cepas de ratones modificadas genéticamente para tener deficiencias combinadas de MLH1/ATM (ataxia-telangiectasia), junto con una disfunción de la actividad de SOD1, se presenta un incremento del estrés oxidante así como una sensibilidad a la radiación, lo cual conlleva a un incremento en la aparición de linfomas agresivos. Sin embargo, a pesar de estos resultados, dichos animales no mostraron

diferencias significativas en términos de su longevidad y ciclos de vida. (Ziv et al. 2005).

En este estudio, los niveles de MSH2 y MLH1 fueron más bajos en los grupos de animales viejos de *M. velifer*, en comparación con los grupos de animales jóvenes y adultos. Por otro lado, los organismos de la especie *D. rotundus* presentaron niveles reducidos de proteínas del sistema MMR de los observados en *M. velifer* adultos y viejos. El hecho que los murciélagos vampiros adulto tengan niveles reducidos de proteínas MMR podría ser un indicador que existen otros procesos o vías de señalización que estuvieran modificando la expresión de estas proteínas, tales como una reducción de los daños en la molécula de ADN posiblemente como consecuencia de la eficiencia de los procesos BER o NER. Al mismo tiempo, se observó un incremento mayor al 40% de los marcadores microsatelitales en los organismos viejos de *M. velifer*, mientras que los niveles de los marcadores DESMOO y DESMO1 para *D. rotundus* no eran tan altos como los observados en *M. velifer*, siendo más bajos en los grupos adultos comparados con los controles jóvenes (entre el 10 y el 20%). Los murciélagos *M. velifer* viejos presentaron niveles mucho mayores de secuencias microsatelitales, lo que se correlaciona con niveles reducidos de proteínas MMR; *D. rotundus* presentó tanto niveles reducidos de marcadores microsatélites como de proteínas MMR. Dado que *M. velifer* vive menos tiempo que *D. rotundus*, los resultados podrían sugerir que existe una asociación entre el daño al ADN y fallas en el mecanismo de reparación, que podrían afectar la longevidad en los murciélagos.

La expresión de MSH2 y MLH1 a lo largo del fenómeno del envejecimiento no ha sido estudiado en murciélagos; sin embargo sí se han

realizado experimentos en otros modelos experimentales: en *C. elegans* modificado genéticamente para hacerlo deficiente en la expresión de MSH2, se determinó que, con cada generación subsecuente de gusanos, tanto la fertilidad como la tasa de sobrevivencia se redujeron debido a un incremento en las mutaciones atribuidas a la falta de eficiencia del sistema MMR (Estes et al. 2004). Al utilizar como modelo experimental células T de pacientes donadores jóvenes y viejos, con el fin de determinar el proceso de expansión por clonación de las células T *in vitro*, se determinó que los niveles de daño al ADN por estrés oxidante y de IMS aumentaron en un patrón dependiente de la edad y junto con una capacidad de reparación disminuida del ADN. Los resultados obtenidos de otro estudio utilizando el modelo de clonas de células T de donadores ancianos con buena salud mostraron que la reparación de ADN se mantiene constante, lo cual se refleja en un daño al ADN por estrés oxidante que se mantiene en el mismo nivel (Pawelec et al. 2004). En experimentos con humanos, se ha determinado que el riesgo de adquirir cáncer colorectal incrementa al alcanzar una edad promedio de 70 años o más, en comparación con el riesgo en pacientes de 30 y 50 años de edad. Este incremento no sólo fue correlacionado con un incremento en las mutaciones de los genes de MSH2 y MLH1 en pacientes de 70 años, sino también con la tasa incrementada de mutaciones del gen de MLH1 de pacientes machos comparado con las pacientes hembra en todos los grupos clasificados por la edad, así como las pacientes mujeres mostraron un incremento en las mutaciones del gen de MSH2, en comparación con los pacientes hombres (Choi et al. 2009). A pesar de las mutaciones inherentes que podrían estar afectando su funcionalidad, esta información podría dar cuenta de diferencias

por género en términos de la susceptibilidad al envejecimiento y a enfermedades degenerativas en los organismos a medida que envejecen, resultando en diferentes defectos de la señalización de reparación del ADN.

De acuerdo con Lyman (1970), los murciélagos presentan niveles altos de consumo de oxígeno por su actividad diaria contra organismos de tamaño pequeño terrestres, una característica que contrasta con los descensos drásticos en consumo de oxígeno cuando entran en aletargamiento fisiológico. Existen registros de individuos que sobreviven más allá de los 30 años en la vida silvestre existen para cinco especies de murciélagos. De éstas, tres pertenecen al género *Myotis*, las cuales también tienen la capacidad de hibernar. Wilkinson y South (2002) han sugerido que el ciclo de vida del murciélago incrementa significativamente con la hibernación, la masa corporal y el uso ocasional de cuevas, pero disminuye con la tasa reproductiva, mientras que la influencia de la dieta permanece sin esclarecerse. También se ha visto que *M. velifer* tiene niveles de actividad antioxidante incrementada durante la hibernación. Sin embargo, datos respecto a este tema para *D. rotundus* son escasos (Salmon et al. 2009).

Es posible que existan causas adicionales que podrían estar influyendo en la longevidad de los murciélagos. *M. velifer*, como especie, es propensa a vivir en cuevas, una condición que, junto con su capacidad de vuelo, le permite tener una mejor capacidad de evadir a sus depredadores (Fitch et al. 1981). El proceso de hibernación dentro de las cuevas juega un papel importante en prolongar la longevidad de estos murciélagos y reduce la mortalidad extrínseca: los murciélagos que hibernan pueden lidiar con períodos largos sin disponibilidad de alimento, mientras que las cuevas proveen un ambiente

protector, reduciendo su riesgo de morir por falta de alimento y por depredación. Se ha sugerido que los murciélagos que hibernan poseen longevidades más largas en comparación con las especies tropicales (Wilkinson & South 2002). Sin embargo, los murciélagos tropicales, como *D. rotundus*, también son especies muy longevas; por lo tanto, la hibernación puede no ser el único factor que esté incrementando la longevidad en todas las especies de murciélagos. *D. rotundus* no es un organismo que recurra mucho a las cuevas como ambiente protector, como lo hace *M. velifer*, no hiberna y además de ser capaz de volar, este vampiro puede dar pequeños brincos con el propósito de alcanzar su presa (como ocurre con el ganado); por lo tanto se encuentra más expuesto a diferentes tipos de depredadores. En teoría, las especies que están menos expuestas a factores ambientales, como los murciélagos de cuevas, tienden a ser especies con una alta tasa de sobrevivencia y ciclos de vida largos. Por otro lado, de acuerdo con la teoría evolutiva del envejecimiento, a la senescencia se le atribuye una disminución de su poder de selección natural a lo largo de diferentes edades después de pasar la madurez sexual. Esto significa que la acumulación genética de alelos de acción tardía y/o la selección de alelos con efectos pleiotrópicos podrían modificar la longevidad de estas especies (Austad & Fischer 1991). El murciélago vampiro, a pesar de estar expuesto a condiciones ambientales de peligro y depredadores, también vive en regiones tropicales, lo cual le permite tener condiciones de humedad y temperatura que promueven características genéticas favorables, así como una mayor disponibilidad de comida que podrían mejorar su calidad de vida y por lo tanto su longevidad. Además, dado que *Desmodus* no es un morador de cuevas como *Myotis*, no está expuesto a

otro tipo de factores; por ejemplo, los productos secundarios generados durante su ciclo de vida, que pueden llegar a ser tóxicos. Los murciélagos de cuevas generan concentraciones elevadas de amoníaco, principalmente por la degradación de urea y los excrementos, lo cual podría estar generando un estrés fisiológico por especies reactivas de nitrógeno en especies como *M. velifer* y que *D. rotundus* no experimenta (McFarlane et al. 1995). El metabolismo de la degradación del nitrógeno es un factor de potencial importancia, ya que es conocido como un proceso generador de altos niveles de estrés oxidante y nitrosativo y que podría influir en la longevidad de las especies (Oliveira et al. 2010).

Las actividades de CAT y GPx fueron menores en los murciélagos viejos hembra de *M. velifer* comparadas con los murciélagos adulto y viejos de la misma especie (**Tablas 1 y 2**). Los machos presentaron una reducción lineal de su actividad antioxidante con la edad. Estas observaciones son similares a las reportadas previamente sobre especies tales como *M. nigricans* (Wilhelm et al. 2007), indicando un mecanismo que les permite a estos organismos con ciclos de vida largos compensar la alta tasa metabólica con diferentes respuestas antioxidantes. En *D. rotundus* se observó una actividad antioxidante reducida en los murciélagos viejos; sin embargo, las actividades antioxidantes enzimáticas en los vampiros viejos fueron equivalentes a las actividades registradas en los organismos *M. velifer* adulto. Una actividad enzimática antioxidante alta puede otorgar a los murciélagos vampiro una ventaja en términos de protección contra el estrés oxidante, que a su vez podría incrementar su longevidad, dado que estos organismos no entran en hibernación. La actividad de SOD incrementó en los murciélagos viejos,

mostrando una diferencia considerable comparada con la actividad de CAT y GPx (**Tabla 3**). Esto podría significar que los murciélagos viejos tienen la capacidad de incrementar su protección contra el estrés oxidante. También podría sugerir que el daño por estrés oxidante es mucho mayor y que la actividad medida es un indicador de la exposición de estos tejidos a dicho estímulo durante su ciclo de vida. En ambas especies, el cerebro fue el órgano que presentó menor actividad de las tres enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx). Se pueden apreciar diferencias en el sistema antioxidante en función de género, pero estas diferencias son más marcadas para CAT y GPx (independientemente de la especie) a nivel del cerebro.

SOD transforma al $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 , y tanto CAT como GPx actúan sobre este mismo sustrato. De acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio, se puede considerar que en los murciélagos viejos de ambas especies, la mayor actividad de SOD en los tres órganos estudiados puede estar relacionada con una mayor generación del $O_2^{\bullet -}$. Esto traería como consecuencia una mayor generación de H_2O_2 mientras que la actividad de CAT y GPx es menor. Ello que parece indicar que, efectivamente, en los murciélagos viejos el sistema antioxidante para modular a esta ERO con mayor vida media que el $O_2^{\bullet -}$ se encuentra disminuido. Las diferencias en la actividad de CAT y GPx en el cerebro de hembras y machos viejos (mayor CAT en machos y mayor GPx en hembras) podrían indicar que, dependiendo del sexo (y por tanto de funciones biológicas como reproducción, cuidado del harem, etc.), hubiese una modulación diferencial del H_2O_2 ; es decir, a menor concentración de H_2O_2 actuaría CAT y a mayor concentración de H_2O_2

actuaría GPx. Sin embargo, los resultados del presente estudio no brindan suficiente evidencia para poder validar esta explicación.

Otra característica a considerar son las diferentes dietas de las dos especies. Las diferencias encontradas en el perfil antioxidante pueden estar reflejando las diferencias respecto al tipo de alimentación entre estas especies (sangre versus insectos). Se ha reportado que los murciélagos vampiros presentan mayores niveles de daño oxidante debido al alto contenido intracelular de hierro en sangre (Ferreira-Cravo et al. 2007). En nuestro estudio, los niveles de daño por estrés oxidante no se vieron reflejados en un incremento en la inestabilidad del ADN, dado que esta molécula parece estar mejor protegida contra el daño en *Desmodus*. Esta diferencia en la inestabilidad genómica puede estar relacionada con el perfil antioxidante observado en los tejidos estudiados. Además, se observaron diferencias en los niveles de antioxidantes entre tejidos, lo que puede indicar que cada tejido podría estar expuesto a diversos tipos de estrés oxidante. Por ejemplo, los pulmones están expuestos a una mayor tensión de oxígeno en comparación con el resto de los órganos; por lo tanto pueden requerir de necesidades antioxidantes especiales. El hígado y el cerebro son conocidos por ser órganos que requieren de una cantidad determinada de energía, con altos niveles de mitocondrias y, por lo tanto, pueden ser susceptibles de un nivel alto de estrés oxidante, particularmente en el cerebro.

Sin embargo, en *D. rotundus* la tendencia difiere considerablemente. De acuerdo con la teoría evolutiva del envejecimiento, los constituyentes celulares pueden eventualmente fallar debido a errores y acumulación de daño, En contraste, considerando la teoría del “rango de vida”, la acumulación de errores

podrían estar relacionada con procesos fisiológicos. Lo anterior se relaciona con tasas metabólicas específicas de masa. En *M. velifer*, esto podría explicar porqué la IMS es mayor que lo visto en *D. rotundus* y podría estar asociado con las altas tasas metabólicas encontradas en otras especies de murciélagos (Austad & Fischer 1991; Wilhelm et al. 2007).

Otra característica para tomar en cuenta al comparar la longevidad máxima entre las especies, es la relación con la masa corporal. En este estudio *D. rotundus*, que es la especie más longeva, es también la que tiene mayor tamaño corporal. Basado en un regresión de masa corporal contra longevidad máxima, se determinó que el murciélago de cueva *Myotis* podría vivir 2.7 veces más de lo esperado, mientras que el murciélago vampiro *Desmodus* podría vivir 4.8 veces más de lo esperado. Cuando se hace un ajuste por tamaño corporal, varias especies de *Myotis* representan a los mamíferos con el mayor grado de longevidad, inclusive más que lo determinado en *Desmodus*; por lo tanto se requeriría de mayor información sobre la filogenia de estos murciélagos que pudiera esclarecer mejor esta interrogante.

Los análisis morfológicos y filogenéticos han mostrado que la familia Vespertilionidae, a la cual pertenece *Myotis velifer*, está menos emparentada con la familia Phyllostomidae, a la cual pertenece *Desmodus rotundus*. El género *Desmodus* es más antiguo (surgió aproximadamente hace 26 millones de años), que *Myotis* (diverge alrededor de hace 20 millones de años) (Teeling et al. 2005). Existen tres especies de murciélagos vampiros conocidas (*D. rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*) que conforman a la subfamilia Desmodontinae (Jones et al. 2009). Sin embargo, los únicos datos reportados sobre longevidad son referentes a *D. rotundus*, y por ende, no pueden

realizarse comparaciones intraespecíficas en esta subfamilia. El género *Myotis*, que comprende alrededor de 100 miembros (Simmons, 2005), está distribuido alrededor del mundo, excepto en las regiones polares y representa una de las más diversas y más exitosas en términos de radiaciones entre los mamíferos. Existen reportes de ciclos de vida de 22 especies de *Myotis* (Wilkinson & South 2002), con diferentes dispersiones geográficas: 9 especies Paleárticas (Eurasia) con 25.4 ± 6.3 años de vida promedio; 12 Neárticas (Norteamérica) con 17.6 ± 6.9 años promedio y sólo una especie Neotropical (Centro-Suramérica) con 7.0 años promedio de vida. Los análisis filogenéticos indican que las especies Paleárticas son las más antiguas, mientras que la especie más reciente es la Neotropical (Stadelmann et al. 2007). De acuerdo con la afinidad geográfica del género *Myotis*, su longevidad tiende a disminuir; desde la región templada vieja (Paleártica) hacia la más reciente (Neártica) y consecuentemente, la región Tropical. Esto sugiere una posible relación entre la reducción de la longevidad y la dispersión de *Myotis* de regiones templadas a tropicales, así como una reducción en la duración de la hibernación. La mayoría de las especies que habitan en regiones frías o templadas (Regiones Paleártica y Neotropical) cuenta con la capacidad de hibernar y sólo dan a luz a una cría por camada al año (monoestros, con baja tasa reproductiva), mientras que la especie Neotropical (*M. nigricans*), que no cuenta con capacidad de hibernar, de naturaleza poliéstrica y por ende, tiene una alta capacidad reproductiva de 3 crías por camada al año. Estas hembras, curiosamente, tienen un peso corporal menor que el determinado en otros *Myotis* (4 g vs. 10.1 g en *M. velifer*).

El estilo de vida de *D. rotundus* presenta características que no encajan con el modelo de alta longevidad, como por ejemplo su período de gestación de 7 meses, su alimentación basada en sangre (con altos niveles de hierro) y presenta altos niveles de estrés social como individuos de una comunidad, debido a su necesidad de proteger a los miembros de su nicho reproductivo (harem) de machos externos o satélites. Sin embargo, esta especie vive casi 2 veces más que *M. velifer*. Las regresiones lineales de las Figuras 13 y 15 de *M. velifer* muestran lo que se esperaba: una reducción en los niveles de las proteínas MMR y de las actividades antioxidantes con un incremento en la edad, así como un incremento en el daño al ADN. Sin embargo, en las Figuras 14 y 16 se observa un patrón diferente, difícil de explicar. Dado que *D. rotundus* no puede entrar en aletargamiento fisiológico, su consumo de energía es mayor comparado con el de *M. velifer*. Esto podría explicar parcialmente lo determinado en las actividades de CAT y GPx como un mecanismo para contrarrestar la generación endógena de ERO. La actividad de SOD fue mayor en los murciélagos viejos de ambas especies, lo cual puede denotar una mayor producción de O_2^{\bullet} . Sin embargo, estas determinaciones por sí solas no pueden explicar por qué difiere con la noción de que un alto metabolismo incrementa el consumo de oxígeno y el daño por estrés oxidante. *D. rotundus* es un organismo homotérmico que no entra en el proceso de hibernación; esta especie quizá tiene mecanismos con mayor actividad antioxidante, comparada con especies como *M. velifer* que sí cuentan con capacidad de hibernar. Diferencias como éstas pueden inducir un efecto adaptativo en las células ante dosis leves de estrés oxidante, lo cual podría activar la expresión de proteínas citoprotectoras y antioxidantes, permitiendo que el efecto pro-oxidante funja

como un agente hormético (Luna-López et al. 2010). El efecto hormético podría ser una forma de explicar, de manera parcial, los diferentes patrones de respuesta en *D. rotundus*, lo cual podría sugerir una respuesta adaptativa a todos estos factores para mantener un ciclo de vida prolongado y más saludable. Sin embargo, más experimentos son requeridos para poder explicar por completo este fenómeno.

Conclusiones y Perspectivas

Los resultados obtenidos indican que *Myotis velifer*, la especie menos longeva, presenta un incremento en la IMS conforme la especie llega a una edad mayor. Esto se correlaciona con una reducción de las proteínas de reparación tipo MMR, MSH2 y MLH1, conforme llegan a la edad mayor. *Desmodus rotundus*, la especie más longeva, presenta una reducción de su IMS desde la edad adulta y se mantiene con pocos cambios en la etapa de edad mayor. Esto se correlaciona con una reducción de las proteínas de señalización de reparación en los mismos grupos de edad, lo cual podría ser un indicador de que una disminución del daño fomenta una reducción en los niveles de las proteínas MMR. Estos datos indican que a nivel especie, pueden presentarse diferencias en el mantenimiento de la fidelidad genética, que aseguren el propio funcionamiento celular y puedan contribuir a explicar cómo una especie puede diferir de otra en términos del envejecimiento. Así mismo, una reducción significativa de las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y GPx en ambas especies indica un posible efecto en las células, que pudiera a su vez afectar la longevidad de estas especies. *D. rotundus* presenta actividad

de estas enzimas en el grupo de organismos viejos similares a la actividad registrada en el grupo de organismos adulto de *M. velifer*. Ello podría ser indicar una mejor eficiencia para contrarrestar el estrés oxidante en las células.

Sin embargo, más estudios son requeridos para corroborar estos datos, incluyendo evaluaciones de estos marcadores en otras especies como *Mus musculus*, la cuál ha dado buenos resultados en la investigación relacionada con envejecimiento. Se recomienda corroborar el efecto de los sistemas de reparación BER y NER en estas especies, ya que si bien el sistema MMR participa principalmente en el ciclo S en células proliferantes, los otros dos sistemas podrían tener influencia, ya que se encargan de evitar cambios nocivos en la secuencia del ADN que deriven en patologías o afectaciones del ciclo de vida. También se requiere valorar el estado redox de las células, determinando procesos como la síntesis y mantenimiento de glutatión reducido y oxidado. También se considera evaluar la homeostasis del hierro en *D. rotundus*, midiendo la expresión de las proteínas reguladoras del hierro hepcidina, transferrina 1 y ferroportina en muestras de *D. rotundus*, para determinar hasta qué grado su estilo de vida (en particular el hierro ingerido) puede inducir estrés oxidante y generar diferencias como las determinadas en *M. velifer*. Se contempla evaluar el daño al ADN, determinando la acción directa de ERO cuantificando el aducto 8-oxodGuo por medio de HPLC. Así mismo, se desea determinar el grado de lipoperoxidación y oxidación de proteínas en estas muestras para complementar el daño a biomoléculas asociado al estrés oxidante y determinar un panorama completo del efecto de las ERO sobre estas especies.

Bibliografía

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-6, 1984.
2. Ahmad S, Pardini RS. Evidence for the presence of glutathione peroxidase activity towards an organic hydroperoxidase in larvae of the Babbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.* (18): 861-6, 1998.
3. Alazzouzi H, Domingo E, González S, Blanco I, Armengol M, Espín E, Plaja A, Schwartz S, Capella G, Schwartz S Jr. Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis. *Hum. Mol. Genet.* 14(2), 235-9, 2005.
4. Arratia, S. 2000. Algunos aspectos básicos de la biología de *Myotis velifer velifer* (CHIROPTERA: VESPERTILIONIDAE) durante un ciclo anual en los Estados de Puebla y Tlaxcala. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de México, México. 86pp.
5. Austad SN, Fischer KE. Mammalian aging, metabolism, and ecology: evidence from the bats and marsupials. *J. Gerontol* 46:B47–B53. 1991.
6. Balmori A. El estudio de los quirópteros a través de sus emisiones ultrasónicas. *Galemys: Boletín SECEM* 10 (1): 12-9. 1998.
7. Barja G, Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.* 14(2):312-8, 2000.

8. Barouki R. Ageing free radicals and cellular stress. *Med. Sci.* 22(3), 266-72, 2006.
9. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res.* (511): 145–178, 2002.
10. Boley SE, Wong VA, French JE, Recio L. p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene. *Toxicol Sci.* 66 (2): 209-15 2002.
11. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254; 1976.
12. Brunet-Rossini AK, Austad SN. Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology* (5): 211–222, 2004.
13. Choi YH, Cotterchio M, McKeown-Eyssen G, Neerav M, Bapat B, Boyd K, Gallinger S, McLaughlin J, Aronson M, Briollais L. Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 7(1), 14–25, 2009.
14. Davis JS, Nicolay CW, Williams SH. A comparative study of incisors procumbency and mandibular morphology in vampire bats. *J Morphol* 271:853–862, 2010.
15. Estes S, Phillips PC, Denver DR, Thomas WK, Lynch M. Mutation accumulation in populations of varying size: the distribution of mutational effects for fitness correlates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 166(3), 1269-79, 2004.

16. Fitch JH, Shump KA, Shump AU. *Myotis velifer*. Mamm. Species 149:1–5, 1981.
17. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. (105): 114-21, 1984.
18. Florea AM, Yamoah EN, Dopp E. Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction. Environ Health Perspect. 113(6):659-64, 2005.
19. Greenhall AM, Joermann G, Schmidt V. *Desmodus rotundus*. Mamm Species 202:1–6, 1983.
20. Halliwell, B. Gutteridge, J.M.C. 2004. Free radicals in Biology and Medicine. Third edition. Oxford University Press. India. 936 págs. Pp: 17, 23, 32, 115, 123, 133, 248, 280, 327-8, 351, 789.
21. Hampel, H. Frankel, W.L. Martin, E. Arnold, M. Khanduja, K. Kuebler, P. Nakagawa, H. Sotamaa, K. Prior, T.W. Westman, J. Panescu, J. Fix, D.; Lockman, J. Comeras, I. de la Chapelle, A. Screening for the Lynch Syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer). N. Engl. J. Med. 352 (18):1851-60, 2005.
22. Harman, D. The Free Radical Theory of Aging. Antioxidants & Redox Signaling. 5 (5): 557-561, 2003.
23. Hashimoto, K. Takasaki, W. Yamoto, T. Manabe, S. Sato, I. Tsuda. S. Effect of glutathione (GSH) depletion on DNA damage and blood chemistry in aged and young rats. J. Toxicol. Sci. 33(4): 421-429, 2008.

24. Helleman, J. van Staveren, I.L. Dinjens, W.N. V. Ritstier, K.; Ewing, P.C.; van der Burg, M.E. Stoter, G. Berns, E.M. 2006. Mismatch repair and treatment resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*. (6): 201-210.
25. Jackson AL, Chen R, Loeb LA. 1998. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(21): 12468-73.
26. Jackson AL, Loeb LA. Microsatellite instability induced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. 447(2): 187-98, 2000.
27. Jang YC, Pérez VI, Song W, Lustgarten MS, Salmon AB, Mele J, Qi W, Liu Y, Liang H, Chaudhuri A, Ikeno Y, Epstein CJ, Van Remmen H, Richardson A. 2009. Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 64(11): 1114-25.
28. Jiricny J. MutLalpha: at the cutting edge of mismatch repair. *Cell*. 126, 239–41, 2006.
29. Jones KE, Bielby J, Cardillo M, Fritz SA, O'Dell J, Orme CDL, Safi K, Sechrest W, Boakes EH, Carbone C, Connolly C, Cutis MJ, Foster JK, Grenyer R, Habib M, Plaster CA, Price SA, Rigby EA, Rist J, Teacher A, Bininda-Emonds ORP, Gittleman JL, Mace GM, Purvis A. PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. *Ecology* (90):2648, 2009.
30. Jou, M.J. Peng, T.I. Yu, P.Z. Jou, S.B. Reiter, R.J. Chen, J.Y. Wu, H.Y. Chen, C.C. Hsu, L.F. Melatonin protects against common deletion of

- mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J. Pineal Res.* 43(4):389-403, 2007.
31. Junop MS, Yang W, Funchain P, Clendenin W, Miller JH. 2003. In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair (Amst)*. 2(4): 387-405.
32. Jürgens KD, Prothero J. Scaling of maximal lifespan in bats. *Comparative Biochem. and Physiol. Part A: Physiology*. 88(2): 361-7, 1987.
33. Krutzsch PH. The reproductive biology of the cave myotis (*Myotis velifer*). *Acta Chiropterologica* 11:89–104, 2009.
34. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 309(5733): 481-4, 2005.
35. Kültz, D. Molecular and evolutionary basis of the Cellular Stress Response. *Annu. Rev. Physiol* 87(67): 225-57., 2005.
36. Kunz TH. Ecological and behavioral method for the study of bats. Smithsonian Institution Press, Washington DC. p 533, 1990.
37. Kültz, D. Molecular and evolutionary basis of the Cellular Stress Response. *Annu. Rev. Physiol.* (67): 225-57, 2005.

38. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (27): 680–685, 1970.
39. León-Galván MA, López-Wilchis R, Hernández-Pérez O, Arenas-Ríos E, Rosado A. Male Reproductive Cycle Of Mexican Big-Eared Bats, *Corynorhinus Mexicanus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *The Southwestern Naturalist* 50(4): 453-60, 2005.
40. León-Galván, M. A. Fonseca, T. López-Wilchis, R. Rosado, A. Prolonged storage of spermatozoa in the female genital tract in mexican big-eared bat (*Corynorhinus mexicanus*). Role of lipid peroxidation. *Canadian Journal of Zoology* (77): 7-12, 1999.
41. Lin Y, Wilson JH. Diverse effects of individual mismatch repair components on transcription-induced CAG repeat instability in human cells. *DNA Repair*. 8(8), 878-85, 2009.
42. López de Saro FJ. Regulation of interactions with sliding clamps during DNA replication and repair. *Curr Genomics*. 10(3): 206-15, 2009.
43. Lord RD, Muradali F, Lazaro L. Age Composition of Vampire Bats (*Desmodus rotundus*) in Northern Argentina and Southern Brazil *Journal of Mammalogy*. 57 (3): 573-5. 1976.
44. Luna-López A, Triana-Martínez F, López-Diazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A, Gómez-Quiroz LE, Königsberg M. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Rad Biol Med* 49:1192–1204, 2010.

45. Lyman CP. Thermoregulation and metabolism in bats. In *Biology of Bats*. (1): 301-30. Academic Press, New York, 1970.
46. McFarlane DA, Keeler RC, Mizutani H. 1995. Ammonia volatilization in a Mexican bat cave ecosystem. *Biogeochemistry* 30:1–8.
47. Martin RE, Pine RH, DeBlase AF. *A manual of mammalogy: with keys to families of the world*, 3rd edn. McGraw-Hill, New York, p 333, 2001.
48. Martin RC, Ahn J, Nowell SA, Hein DW, Doll MA, Martini BD, Ambrosone CB. Association between manganese superoxide dismutase promoter gene polymorphism and breast cancer survival. *Breast Cancer Res.* 8(4):R45, 2006.
49. Matos, H.R. Capelozzi, V.L. Gomes, O.F. Di Masco, P. Medeiros, M.H.G. Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitiolacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* (396): 171-177, 2001.
50. Medellín AR, Arita TH, Sánchez HO. Identificación de los murciélagos de México. *Clave de campo*, vol 2. Asociación Mexicana de Mastozoología AC Publicaciones Especiales, México, p 83, 1997.
51. Moustacchi E. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res.* 464 (1): 35-40, 2000.
52. Mullins DN, Crawford EL, Khuder SA, Hernandez DA, Yoon Y, Willey JC. CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma. *BMC Cancer.* 5(141), 1-14, 2005.

53. Nakano T, Katafuchi A, Terato H, Suzuki T, Van Houten B, Ide H. Activity of nucleotide excision repair enzymes for oxanine cross-link lesions. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*. (49): 293-4. 2005.
54. Narine KA, Felton KE, Parker AA, Tron VA, Andrew SE. Non-tumor cells from an MSH2-null individual show altered cell cycle effects post-UVB. *Oncol. Rep.* 18(6), 1403-11, 2007.
55. Neri S, Gardini A, Facchini A, Olivieri F, Franceschi C, Ravaglia G, Mariani E. Mismatch repair system and aging: microsatellite instability in peripheral blood cells from differently aged participants. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 60(3): 285-92, 2005.
56. Neuweiler, G. *The Biology of Bats*. Oxford University Press. E.U.A. 310 Págs. Pp: 98-115, 2000.
57. Núñez A, de Viana ML. Comparison of age determination methods for *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev Biol Trop* 45:1237–1242, 1997.
58. Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the aging process. *Scien W J* 15:1121–1128, 2010.
59. Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts. *Analytical Biochemistry.* (154):536-41, 1986.

60. Pawelec G, Mariani E, McLeod J, Ben-Yehuda A, Fulop T, Aringer M, Barnett Y. Engineering anticancer T cells for extended functional longevity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1019): 178-85, 2004.
61. Peltomäki, P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10(7): 735-40, 2001.
62. Piaggio AJ, Johnston JJ, Perkins SL. Development of polymorphic microsatellite loci for the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Mol. Ecol. Resour.* 8(2): 440-2, 2008.
63. Phung QH, Winter DB, Alrefai R, Gearhart PJ. Hypermutation in Ig V genes from mice deficient in the MLH1 mismatch repair protein. *J. Immunol.* 162(6), 3121-4, 1999.
64. Salmon AB, Leonard S, Masamsetti V, Pierce A, Podlutzky AJ, Podlutzkaya N, Richardson A, Austad SN, Chaudhuri AR. The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *FASEB J* 23:2317–2326, 2009.
65. Santuci-Darmanin, S. Paquis-Flucklinger, V. Les homologues de MutS et de MutL au cours de la méiose chez les mammifères. *Med Sci.* 19(1):85-91, 2003.
66. Saribasak H, Rajagopal D, Maul RW, Gearhart PJ. Hijacked DNA repair proteins and unchained DNA polymerases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364(1517), 605–11, 2008.

67. Simmons NB. Order Chiroptera. In: Wilson DS, Reeder DM (eds) Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference, vol 1, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore, p 743, 2005.
68. Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Langner E, Kozłowska E, Kulig A, Dżiki A. Genetic analysis of microsatellite markers in patients from hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Exp Oncol.* 26(3):205-9, 2004.
69. Springer VG, Johnson GD. Use and advantages of ethanol solution of alizarin red S dye for staining bone in fishes. *Copeia* 1:300–301, 2000.
70. Stadelmann B, Lin LK, Kunz TH, Ruedi M. Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Mol Phylogen Evol* 43:32–48, 2007.
71. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* 244(14): 3855-63, 1969.
72. Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn- SOD, p. 91-95. *In* N. Taniguchi, J. Gutteridge (eds). *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Oxford University Press, Oxford, England, U.K.
73. Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ, Murphy WJ. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307:580–584, 2005.

74. Trujillo RG, Amelon SK. Development of microsatellite markers in *Myotis sodalist* and cross-species amplification in *M. grisescens*, *M. leibii*, *M. lucifugus*, and *M. septentrionalis*. *Conserv. Genet.* 10:1965–1968, 2009.
75. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. 2012. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY)*. 4(1):3-12.
76. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 7(3): 153-62, 2010.
77. Wilhelm Filho D, Althoff SL, Dafré AL, Boveris A. Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146(1-2): 214-20, 2007.
78. Wilkinson GS. The social organization of the common vampire bat: I. Pattern and cause of association. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 17:111–121, 1985.
79. Wilkinson GS, South JM. Life history, ecology and longevity in bats. *Aging Cell.* 1(2):124-31, 2002.
80. Ziv S, Brenner O, Amariglio N, Smorodinsky NI, Galron R, Carrion DV, Zhang W, Sharma GG, Pandita RK, Agarwal M, Elkon R, Katzin N, Bar-Am I, Pandita TK, Kucherlapati R, Rechavi G, Shiloh Y, Barzilai A. Impaired genomic stability and increased oxidative stress exacerbate different features of Ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet.* 14(19):2929-43, 2005.

DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*, as possible factors associated with longevity

Juan C. Conde-Pérezprina ·
Armando Luna-López ·
Viridiana Y. González-Puertos ·
Tania Zenteno-Savín ·
Miguel Ángel León-Galván · Mina Königsberg

Received: 30 September 2011 / Accepted: 22 February 2012 / Published online: 28 March 2012
© American Aging Association 2012

Abstract The accumulation of oxidative damage to biomolecules, such as DNA, is known to induce alterations in the cell's mechanisms and structure that might lead to the aging process. DNA mismatch repair system (MMR) corrects base mismatches generated during DNA replication that have escaped the proofreading process. In addition, antioxidant enzymes can reduce reactive oxygen species effects in order to protect cells

from oxidizing damage. In order to determine the importance of these associated factors during the aging process, in this study, levels of MMR proteins MSH2 and MLH1, as well as microsatellite markers, were compared in liver, lung, and brain of juvenile, adult, and old, both female and male, individuals from two species of wild bats: the short-lived *Myotis velifer* and the longer lived *Desmodus rotundus*. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase were also analyzed to determine if the antioxidant protection correlates negatively with DNA damage. Antioxidant activities were higher in the longer lived *D. rotundus* than in *M. velifer*. Furthermore, old *M. velifer* but not old *D. rotundus* bats had reduced MMR levels and increased microsatellite instability. Therefore, although our results correlate the reduced MMR efficiency, the deficient antioxidant activity, and the increase in DNA damage with the aging process, this is not always true for all living organisms.

J. C. Conde-Pérezprina · V. Y. González-Puertos ·
M. Königsberg (✉)
Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,
A.P. 55–535, 09340 México, DF, Mexico
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

M. Á. León-Galván
Departamento de Biología, DCBS,
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,
A.P. 55–535, 09340 México, DF, Mexico

A. Luna-López
Instituto de Geriatria,
Av. San Fernando 2,
14080 México, DF, Mexico

T. Zenteno-Savín
Programa de Planeación Ambiental y Conservación,
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.,
La Paz, Baja California Sur, Mexico

Keywords Aging · Antioxidant activity · Chiroptera · DNA damage · Microsatellite instability · Mismatch repair

Introduction

Harman's theory of aging proposes that the accumulation of oxidative damage to biomolecules induces alterations in the cell's mechanisms and structure that might lead to

the aging process (Harman 2003; Barouki 2006). Increased DNA damage and decreased DNA damage repair stand out as important features in this process (Bokov et al. 2004; Gorbunova et al. 2007). Hence, antioxidant enzymes, which reduce the effects of reactive oxygen species (ROS), are expected to protect cells from oxidizing damage to biomolecules such as DNA (Wei et al. 1996; Xu et al. 2011). Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) are considered to be the most important representatives of cellular antioxidant defense and have, therefore, been widely studied (Scandalios 2002; Martin et al. 2006).

DNA mismatch repair system (MMR) is an evolutionarily conserved process that corrects base mismatches generated during DNA replication that have escaped the proofreading process (Kunkel and Erie 2005). Along with the base excision repair (BER) and the nucleotide excision repair (NER) systems, which correct changes in DNA sequence (Bernstein et al. 2002; Moustacchi 2000; Nakano et al. 2005), MMR accomplishes its role through the interaction of protein heterodimers that bind to the damaged DNA sequence. The MutSH family of proteins, which was originally found in *Escherichia coli*, recognizes errors in the genome sequence after replication and is known to be integrated in eukaryotic organisms by MSH2, MSH3, and MSH6 (Jiricny 2006; Kültz 2005; Mullins et al. 2005). MSH2 binds to MSH6 in the presence of base mispairing and other mismatches forming the MutS α heterodimer (MSH2–MSH6) (Peltomäki 2001; Santuci-Darmanin and Paquis-Flucklinger 2003). Then, the MutS α heterodimer binds to the damaged region and recruits the MutLH family proteins, MLH1 and PMS2, to form the MutL α heterodimer. Finally, the DNA-MMR complexes initiate the signaling process in order to replace the DNA lesion through the action of DNA polymerase activity (Phung et al. 1999; Saribasak et al. 2008).

Since MSH2 is the key component of the MMR system, when its expression decreases or its interactions fail to initiate the DNA repair signal, the malfunctioning of cells can derive in injury and disease (Denver et al. 2005). Recent evidence suggests that the activity of the MMR system decreases when cells are near or at the senescent stage (Young et al. 2003); furthermore, MSH2 deficiency increases the formation of microsatellite regions. Microsatellites are frame-shift mutations consisting of repeated units from one to six nucleotides which, when inserted into the DNA, can expand it,

changing the original sequence and altering the normal genetic expression of key cellular components and pathways (Alazzouzi et al. 2005; Lin and Wilson 2009).

Increased frequency of microsatellite regions, related to MSH2 deficiency, has been reported to promote degenerative conditions in the cell (Chang et al. 2008); however, studies correlating the alterations in MMR systems with aging or senescence are few. Experimental models like *Caenorhabditis elegans Msh2* knock-out have significantly decreased life expectancy (Estes et al. 2004). It has also been corroborated that damaging stimuli, such as oxidative stress due to increased ROS production, can induce an increase in genetic variability in strains of *Trypanosoma cruzi* with deficiencies in their MMR pathways (Campos et al. 2011; Machado-Silva et al. 2008). Our group has previously shown that MSH2 levels are reduced with age in CD1 breeding female mice due to increased methylation in its gene promoter region (Conde-Pérezprina et al. 2008).

As a different model, bats (class: Mammalia, order: Chiroptera) offer particular and unique characteristics for aging studies. Their longevity is three times that of the rest of their small terrestrial mammalian counterparts (up to 25 years of age), and their metabolism is highly active because of their flight capacity, a characteristic similar to birds (Neuweiler 2000). We studied two chiropteran species, *Myotis velifer* (J. A. Allen, 1890) and *Desmodus rotundus* (E. Geoffroy, 1810).

M. velifer, the cave myotis, is an insectivorous bat that has an average lifespan of 8 to 12 years (11.3 years in the field) based on mark-recapture studies and an average adult weight of 10.1 g (Wilkinson and South 2002). As its common name states, *M. velifer* is a cave inhabitant, where several thousands of individuals can congregate during spring and summer, while at early fall, they migrate to higher altitudes to mate and hibernate (Fitch et al. 1981). Since this bat can undergo hibernation, it is considered a heterothermic organism (Jürgens and Prothero 1987). On the other hand, the vampire bat (*D. rotundus*) has an average lifespan of 12 to 20 years (Lord et al. 1976) and an average adult weight of 32.2 g (Wilkinson and South 2002). Vampire bats feed on the blood of stock animals (Balmori 1998; Brunet-Rossini and Austad 2004). These bats are homeothermic and do not undergo hibernation (Balmori 1998; Brunet-Rossini and Austad 2004); however, like *M. velifer*, *D. rotundus* lives in communal roosts using tree holes, caves, or other structures as refuges (Greenhall et al. 1983; Wilkinson 1985).

The objective of this study was to compare the MMR systems, the levels of DNA damage, and antioxidant enzyme activities in two species of wild bats, one short lived, *M. velifer*, and one longer lived, *D. rotundus*, in order to determine the contribution of these factors to the aging process. Our hypothesis is that the long-lived *D. rotundus* will show increased levels of antioxidant activity compared to *M. velifer*. DNA MMR proteins MSH2 and MLH1 were analyzed in liver, lung, and brain of juvenile, adult, and old bats, both female and male. To determine a possible association between MMR deficiency and DNA damage, microsatellite sequences, specific for each species, were quantified. Finally, activities of CAT, SOD, and GPx were analyzed to determine if the antioxidant protection correlates negatively with DNA damage.

Organisms of both species showed variations of MSH2 and MLH1 levels according to age. In *M. velifer*, the reduced levels of MMR proteins in old organisms correlate with an increase in microsatellite instability (MSI), determined as an accumulation of microsatellite markers MS3DO2 and MS3EO2, but not for DESMOO and DESM01 markers in *D. rotundus*, which are reduced since adult age correlating with reduced levels of MMR proteins at this stage. Antioxidant enzyme activities tended to decrease when bats achieved old age, except for SOD activity which was higher in older animals of both species. Furthermore, the longer lived species had higher levels of antioxidant enzyme activities than the short-lived species, suggesting that antioxidant response of those animals might be related to their success to achieve long life.

Materials and methodology

Chemicals

All chemicals and reagents were of the highest analytical grade and were mostly purchased from SIGMA (St. Louis, MO). The reagents obtained from other sources are detailed throughout the text.

Animals

Bat collection

Captures were performed in two different refuges located in the central part of Mexico, mostly in the Mexican state

of Puebla. Most juvenile and adult *M. velifer* and all the *D. rotundus* were captured inside the Chicomostoc Cave (19°57'54"N, 97°36'09"W, 1,420 masl), in Nauzontla, Puebla (refuge 1). In order to capture both species of bats, a harp trap was placed 10 m at the interior of the cave principal entrance during the evening, before dark, and the bats were captured at the moment when they came out to feed. It has been suggested that animals caught in this way are exposed to lower levels of stress since they are well hydrated and rested when they leave their roosts. Other *M. velifer* were captured from a roost in a tunnel (refuge 2) located in the state border between Puebla and Tlaxcala (19°37'14"N, 98°02'02"W; 3,220 masl). The tunnel is 57.5 km in straight line from Chicomostoc cave in Nauzontla, but it is 1,800 m higher. Inside the tunnel, the bats were collected with hoop nets during the evening, while they were dormant.

Organism handling after their capture

The captured bats were individually transported in canvas bags to a room located near the cave (Apuco, Puebla). In the room, the animals were identified, and the biological material for the study was collected. The identification of the species was done according to Medellín et al. (1997). The bats were kept no more than 10 h before euthanasia, which was performed according to the rules and stipulations of the Mexican official ethics standard 062-ZOO-1999 and to the guidelines approved by the American Society of Mammalogists (Gannon et al. 2007). Tissues that were not used for this work were used by other researchers from our group for their experiments.

Even though formal necropsies were not undertaken, all the bats were thoroughly examined, and none presented evidence of trauma or disease, such as open wounds or infections caused by bacteria and fungus. The only notable feature was the occurrence of common ectoparasites such as Spinturnicid mites (Acari) and Streblid flies (Diptera). During the tissue extraction, the normal anatomic organization of the principal systems and the maintenance of the morphological structure were checked as an indication of the bats health state.

Age class identification

Groups were categorized by age and sex, based on determinations previously established for these

species (Kunz and Anthony 1982; Morris 1972) as follows:

1. Skeletal criteria.
 - (a) Ossification of the cartilaginous epiphyseal growth plates of the third metacarpal–phalangeal joint (Kunz 1990). This feature was evaluated firstly in the field, at the moment of the capture by transillumination, and corroborated secondly at the lab, by microscopy of the third finger after transparenation, as well as bone (Alizarin S red) and cartilage (Alcian blue) staining (Springer and Johnson 2000).
 - (b) Dental deterioration. The bat skulls were cleaned using *Dermestes spp.* (carrion beetle larvae that only eat the soft material and leave the bone), and the jaws were observed at the microscope to determine the degree of dental deterioration. For *D. rotundus*, the classification was done according to Núñez and de Viana (1997) and Davis et al. (2010). For *M. velifer*, to our knowledge, there are no reports on dental categorization; hence, a classification scheme was created based on dental development using Carleton et al. (1982), starting from the absence of wear to an advanced degree of wear. Canines, premolars, and molars were analyzed.
2. Somatic development criteria.
 - (a) Dermatological features. Patagium and pelage texture, lubrication, coloration, and flexibility were used following Martin et al. (2001).
 - (b) Allometric features. Body weight was obtained with an electric portable balance (Ohaus) (± 0.1 g). Forearm length was determined with a Vernier caliper (± 0.1 mm).
3. Reproductive criteria.
 - (a) Males. Position and size of both testicles and epididymis were analyzed.
 - (b) Females. Mammary gland development and pregnancy were considered.
4. Particular information of each species lifestyle, like birth season, time of sexual maturity, etc,

was also taken into consideration when collecting animals; individuals 3 months old and younger were not captured for this study.

Study groups

Sixty animals were collected in total, 15 females and 15 males of each species, and divided into three groups: juvenile bats, adult bats, and old bats. Each age group included five bats of each species.

Myotis velifer

M. velifer is a monoestrous, seasonal species. Sexual maturity is achieved in females during the first year of age and in males during the second year of age (Kruttsch 2009). Most of the juvenile bats that were obtained from the Chicomostoc cave (September–April) were sexually immature specimens, since birth occurs in May. Juvenile cave bats were estimated to have been either 4 months old (born during the year) or 14–15 months (born the year previous to collection). Adult bats were captured during August–September, before their annual migration to higher elevations. The old bats were captured during November–December. Old bats were selected from individuals that are part of an ongoing demographic study that began in 1983, when individual bats were captured and marked with numbered plastic rings. Animals known to be older than 6 years were selected.

- (a) *Juvenile* (> 4 months < 1 year and 3 months): slender individuals (8.5–9.0-g body weight, < 44 -mm forearm length), pristine skin; incompletely fused epiphyses, teeth without wear. The testis and epididymis were undetectable in the interfemoral membrane due to their small size. The female had inconspicuous mammary glands, and the nipples were barely perceptible.
- (b) *Adult* (> 1 year and 4 months < 4 years): epiphyses closed by ossification, mild dental wear. The males could be distinguished by their larger size (9.0–11.0-g body weight, 44–46-mm forearm length). The testicles were scrotal. According to Kruttsch (2009), testicular diameter in adults ranges from 3 to 9 mm, depending on the spermatogenesis stage. These males were captured in August–September when the spermatogenesis

was finishing; therefore, the testis was small, while the epididymis was clearly distended. In the females, the mammary glands were middle size, and the skin around the nipples was without pelage, as occurs in this species at the end of lactation. No gestating females were used in this study.

- (c) *Old* (> 6 years); robust specimens (> 11.0-g body weight, 46–49-mm forearm length), closed epiphyses, thickened metacarpus, maximal grade of ossification and dental deterioration. Males and females showed skin wear (e.g., dry patagium) and rough pelage. No traces of sexual activity were found. Scrotal testicles in males and small nipples in females.

Desmodus rotundus

Even though *D. rotundus* is a continuously breeding species, the vampire bat has two main seasons of reproduction, with the majority of juveniles produced in fall. The first episode of reproduction is in April–May and the second in October–November. Postnatal growth stops at 5 months of age (Greenhall et al. 1983). Based on their reproductive patterns, animals were collected in November–December to capture juvenile bats born the previous spring at roughly 8 months of age and to capture females that showed no evidence of recent lactation. Females that might have had their offspring during October–November (based on the mammary gland size and shape) were not collected or used in this study.

- (a) *Juvenile* (> 3 months < 1 year and 3 months): slim individuals (24.5–29.0-g body weight, 56–59-mm forearm length), pristine skin; incompletely fused epiphyses, teeth without corrosion. In the male, the testis was located in intra-abdominal position. It has been reported that the female vampire bats have their first birth at 15 months of age (Wilkinson 1985), so female with inconspicuous mammary glands were selected.
- (b) *Adult* (> 2 year < 6 years): silky and shiny pelage; epiphyses ossified, mild dental wear. The adult males could be distinguished by their larger size (29.0–35.0-g body weight, 60–63-mm forearm length). Vampire bats are a polygamous species that live in “harems.” (Park 1991). Hence, adult

males are aggressive and show notorious marks and wounds inflicted by other bats while defending their harems. Male's testicles were scrotal, and according to Wilkinson (1985), testicular diameter is 5 mm during 12–14 months of age. The alpha males could be distinguished by their corpulence and aggressiveness. Females that had nursed showed bite marks on their nipples, since lactating vampire bats stick their teeth in their mother's nipple while she carries them.

- (c) *Old* (> 10 years); full-bodied specimens (> 35.0-g body weight, > 63-mm forearm length), closed epiphyses, thickened metacarpus, maximal grade of ossification and dental deterioration. Males and females showed skin wear, including dry patagium, gray pelage, and some old healed wounds. No traces of sexual activity were found. Scrotal testicles in males and worn nipples in females.

Protein extraction and analysis

Proteins were extracted from liver, lung, and brain from the experimental animals using a T-PER Extraction Kit (No 78510, Thermo Fischer Scientific) with protease inhibitor Complete (Santa Cruz Biotechnology, Inc). These organs were chosen because of their lower cellular turnover exchange rate and their particular susceptibility to oxidative stress: The liver and the brain are highly dependent on appropriate oxygen consumption in order to maintain their energetic metabolism, which is one of their main features, whereas the lungs are continuously exposed to high pO_2 (López-Torres et al. 1993). Consequently, these three tissues generate large amounts of free radicals, and any impediment in ROS removal should generate oxidative damage in these tissues.

Total protein concentration was determined spectrophotometrically at 595 nm using a commercial Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Bradford 1976).

MSH2 and MLH1 were quantified by Western Blot using specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Total protein levels were previously quantified in each sample (Laemmli 1970). Proteins were separated on 12 % SDS–PAGE gels, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Invitrogen), and probed with anti-MSH2 and anti-MLH1 (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Membranes were washed three times with TBS–Tween and incubated with anti-mouse IgG secondary antibody (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) for 1 h. After three consecutive washes, the blots were developed using a commercial chemiluminescence reagent (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fischer Scientific). The proportion of these proteins was quantified by densitometric analysis, using a Kodak IMAGEN GEL DOC using Kodak software (v. 3.1). Since there are no specific antibodies for bats, polyclonal antibodies were used. In order to determine if the antibodies recognized proteins obtained from the Chiroptera order, all the antibodies were standardized and compared with samples from mouse, rat, and a human cell line (data not shown).

DNA extraction and microsatellite determination

DNA was isolated from the same tissues using the chaotropic NaI method (Wang et al. 1994), as modified by Matos et al. (2001). The DNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm. Its purity was assessed by ensuring that the A260/A280 ratio was >1.75, and its integrity was confirmed by agarose gel electrophoresis.

Genomic DNA from the obtained samples was used in the microsatellite PCR assay. Primers were used for this assay according to information from microsatellite sequences specifically determined by Trujillo and Amelon (2009) for *Myotis*; for *D. rotundus*, new primers were designed by modifying the information published by Piaggio et al. (2008) (GenBank: EF591570.1). The primers used for *M. velifer* were marker MS3DO2: 5'-CTAAGACCCTTTCCAGCTCTCA-3' (forward) and 5'-GATACCATCACTCTTTCCCTG-3' (reverse), (amplification product 229 pb). For the marker MS3EO2: 5'-GCCAATAAGAGCCAGACATAC-3' (forward) and 5'-GGGGATTAGGGATAGGTTAGCA-3' (reverse), (amplification product 409 pb). For *D. rotundus*, the primer designed for microsatellite was named DESMOO: 5'-AGGTGGGTA CTGC CCAGGATTATT-3' (forward) and 5'-AGGAGC CCAGCATCTGACTTCCTT-3' (reverse), (amplification product 200 pb). For microsatellite DESMO1: 5'-TTAGCAAGGAGCCAGCAGAGCATA-3' (forward) and 5'-TCGTTTCGGA ACTTCTACCGCATCA-3'

(reverse), (amplification product 300 pb). In each reaction, 2 μ L (200 ng) of DNA per sample was used, as well as 5 μ L PCR 10 \times Buffer (166-mM (NH₄)₂SO₄, 670-mM Tris–HCl pH 8.8, 67-mM MgCl₂, 100-mM β -mercaptoethanol), 1.0-mM deoxynucleotide triphosphate (dNTPs), 20 mM of each primer, and 1.25 U of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA), the total volume was 25 μ L. PCR amplifications were performed as follows: 94°C for 5 min (hot start), denaturalization 94°C for 30 s, annealing 55°C for 30 s, elongation 72°C for 30 s, for 35 cycles, with a final step at 72°C for 4 min. Since amplification was done out of total genomic DNA, to ensure that the target microsatellite sequences were being amplified, PCR products were sequenced using ABI Prism BigDye Terminators, version 3.1, on an ABI3100 automated sequencer according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described by Villarreal-Molina et al. (2007) (data not shown). The products were separated in 0.8 % agarose gels and stained with ethidium bromide. The proportion of product was quantified by densitometric analysis, using a Kodak IMAGEN GEL DOC using Kodak software (v. 3.1).

Antioxidant enzyme activity

Antioxidant enzyme activity was analyzed spectrophotometrically in liver, lung, and brain. Each sample (100 mg), processed with an OMNI TH Homogenizer, was used for enzymatic assays. CAT activity was quantified using the protocol established by Aebi (1984) which evaluates H₂O₂ decrease at 240 nm. One unit of catalase activity (UCAT) was considered as the amount of enzyme necessary to catalyze 1 μ mol of H₂O₂ per minute. GPx activity was analyzed spectrophotometrically at 340 nm through a protocol described by Ahmad and Pardini (1998). One unit of GPx activity indicates how much enzyme is required to neutralize H₂O₂ using NADPH (Flohé and Günzler 1984). SOD activity was evaluated through the xanthine/xanthine oxidase system, based on protocols by Paoletti et al. (1986); Stirpe and Della Corte (1969). The superoxide anion formed through this system reacts with nitro blue tetrazolium (NBT) which generates formazan dye that can be measured spectrophotometrically at 560 nm. One unit of enzymatic activity

in this assay is considered as the amount of SOD needed to inhibit 50 % of the superoxide reaction with NBT.

Data analysis

The data are reported as means \pm SD. One-way ANOVA tests, followed by the Tukey–Kramer variance analysis, were used to compare between each group by sex and age. A 0.05 level of probability was used as a minimum criterion of significance in all analysis.

Results

MMR protein level analysis

MSH2 and MLH1 levels were determined in liver, lung, and brain of *M. velifer* (Fig. 1) and *D. rotundus* (Fig. 2). All the data were normalized against the protein content obtained from the juvenile animals, which was designated one. The representative blots and the densitometry presented in Fig. 2 show a decrease in both MSH2 and MHL1 protein content in the old animals when compared with the adult and juvenile animals. Specifically, MSH2 levels in liver and lung (Fig. 1a, b) from the old females were approximately 25 % lower than those in the adult females; in the old males, MSH2 levels were only 10 % lower as compared with adult males ($p < 0.05$). In brain (Fig. 1c), MSH2 was 19 % lower in the adult female bats when compared with the juvenile females, while the male adults presented a 24 % decrease against the juvenile ones ($p < 0.05$). MLH1 levels in *M. velifer* were 11 % lower in the female adults than in the juvenile ones; MLH1 levels continued decreasing to an approximate 15 % in the old animals (Fig. 1d) compared to the younger ones. In males, the difference between adult and juvenile animals varied between tissues and was more evident in brain samples (Fig. 1f), where the decrease was close to 25 % ($p < 0.05$). The average protein content found for MSH2 in liver differed by sex in the old groups; females decreased their levels 10 % more ($p < 0.05$) than the males. Another difference between genders was observed in the adult group brains, where there was a

higher decrease in females' MLH1 levels versus males (12 %) ($p < 0.05$).

In *D. rotundus*, MSH2 and MLH1 levels were significantly lower in the adult group when compared to the juvenile ones (Fig. 2a–f) ($p < 0.05$). In particular, MSH2 levels in liver (Fig. 2a) were drastically reduced in the female adults compared with the juvenile females (approx. 43 %, $p < 0.05$); while in lung tissue, the decrease was 27 % (Fig. 2b, $p < 0.05$), and in the brain, the reduction was only 14 % (Fig. 2c, $p < 0.05$). In adult males, MLH1 protein levels are approximately 20 % lower in each of the three tissues (Fig. 2d–f). Females showed greater age-related reductions in MSH2 than males. Liver tissue has the greatest difference (23 %) between adult and juvenile female bats ($p < 0.05$). Males and females showed significant differences in MLH1 levels in the brain but not other tissues (13 % less in females, $p < 0.05$) (Fig. 2f).

DNA microsatellite assessment through PCR analysis

Figure 3a–f shows the results obtained for the microsatellite sequences for *M. velifer* (MS3DO2 and MS3EO2). In all the cases, an increase in microsatellite incidence was observed in the tissues obtained from old bats. In old females, liver and lung showed an increase of 40 % and 18 %, respectively, of the MS3DO2 marker when compared with the adult female bats ($p < 0.05$) (Fig. 3a, b). The MS3EO2 marker was higher in the lungs of old bats compared with the adult and juvenile female bats ($p < 0.05$) (Fig. 3d, e). Brain tissue obtained from old female bats showed an increase of 26 % and 29 %, respectively, for each marker, MS3DO2 and MS3EO2 ($p < 0.05$), in comparison with the adult female group (Fig. 3c, f). In old males, MS3EO2 was 45 % higher in liver and 22 % higher in lung compared with the same tissues of adult bats ($p < 0.05$); MS3DO2 levels in liver from old bats were 13 % higher than the levels observed in adult bats ($p < 0.05$). In brain tissue, both markers in old males were also significantly higher (45 % in MS3DO2 and 28 % in MS3EO2) compared with the adults ($p < 0.05$). We also observed sex differences in MS3DO2 levels. Old females had 21 % more MS3DO2 in liver tissue compared to old males in old groups, while in brain samples, old

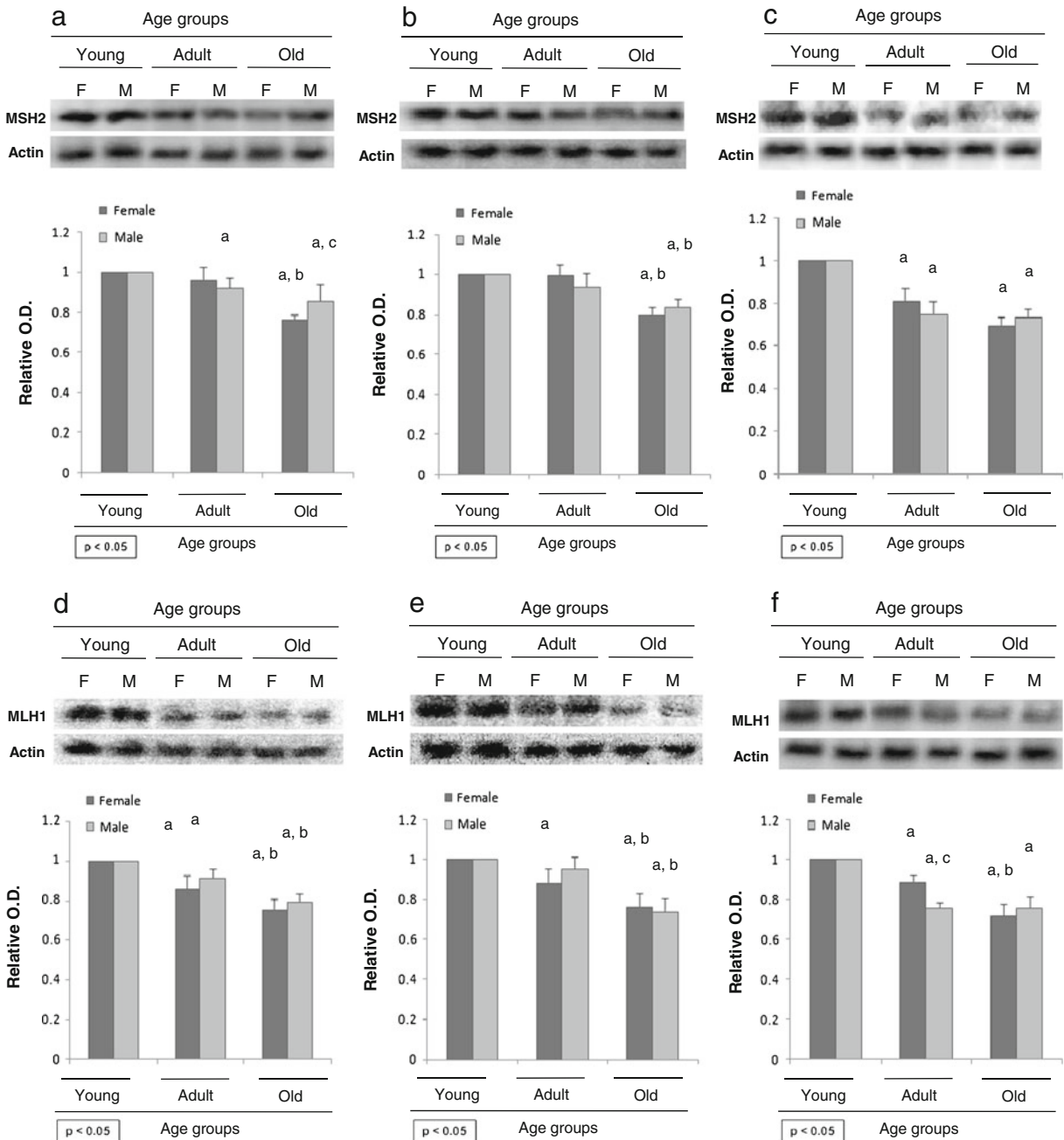


Fig. 1 Levels of MMR proteins in *Myotis velifer*. The figure shows representative blot and densitometry performed for MSH2 levels in **a** liver, **b** lung, and **c** brain as well as MLH1 levels from **d** liver, **e** lung, and **f** brain. MMR protein levels were compared between age and gender groups. Relative optic density was normalized against juvenile animals as control. Each

point represents the mean \pm S.D. of five determinations performed in independent donor animals. Statistical significance with respect to control (juvenile group) (a) or adult (b) $p < 0.05$ was considered. Letter c stands for statistical significance between genders ($p < 0.05$). MSH2 protein weight= 100 kDa; MLH1 protein weight= 85 kDa; actin protein weight= 42 kDa

males had 33 % more MS3DO2 compared to old females. In the case of MS3EO2, sex differences

were found only in lung tissue, 26 % greater in old female bats compared to old male bats.

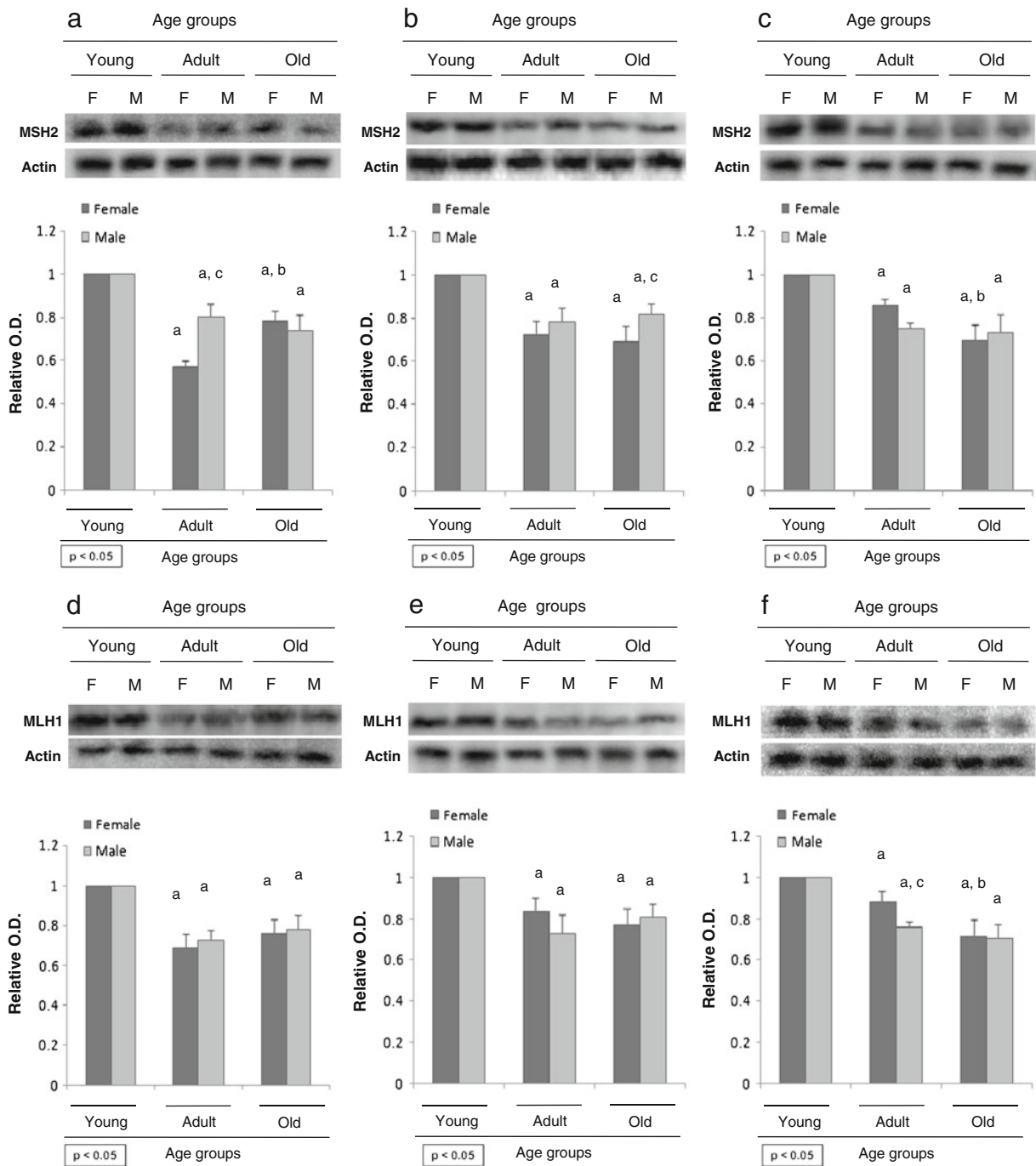


Fig. 2 Levels of MMR proteins in *Desmodus rotundus*. The figure shows representative blot and densitometry performed for MSH2 levels in **a** liver, **b** lung, and **c** brain as well as MLH1 levels from **d** liver, **e** lung, and **f** brain. MMR protein levels were compared between age and gender groups. Relative optic density was normalized against juvenile animals as control. Each

point represents the mean \pm S.D. of five determinations performed in independent donor animals. Statistical significance with respect to control (juvenile group) (a) or adult (b) $p < 0.05$ was considered. Letter c stands for statistical significance between genders ($p < 0.05$). MSH2 protein weight= 100 kDa; MLH1 protein weight= 85 kDa; actin protein weight= 42 kDa

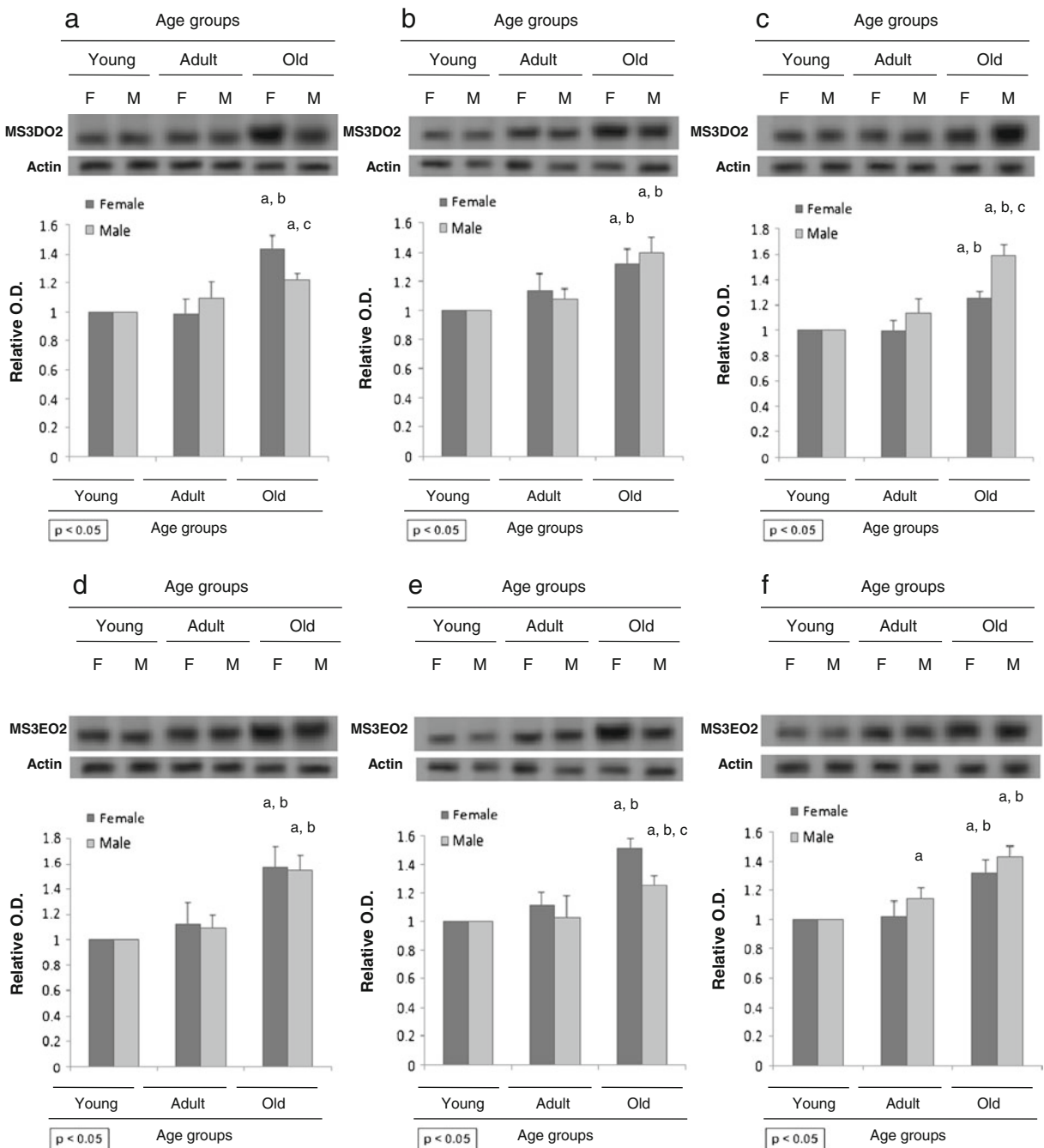


Fig. 3 Microsatellite markers in *Myotis velifer*. The figure shows representative images and densitometry performed for microsatellite MS3DO2 levels in **a** liver, **b** lung, and **c** brain as well as MS3EO2 levels from **d** liver, **e** lung, and **f** brain. Microsatellite levels were compared between age and gender groups. Relative optic density was normalized against juvenile animals

as control. Each point represents the mean \pm S.D. of five determinations performed in independent donor animals. Statistical significance with respect to control (juvenile group) (*a*) or adult (*b*) $p < 0.05$ was considered. Letter *c* stands for statistical significance between genders ($p < 0.05$). MS3DO2 weight= 229 pb; MS3EO2 weight= 409 pb; actin weight= 150 pb

In *D. rotundus*, the microsatellite markers DESMOO and DESMO1 were lower in the adult group compared

with the juvenile and old groups (Fig. 4a–f) ($p < 0.05$), but in general, both microsatellite markers increased in

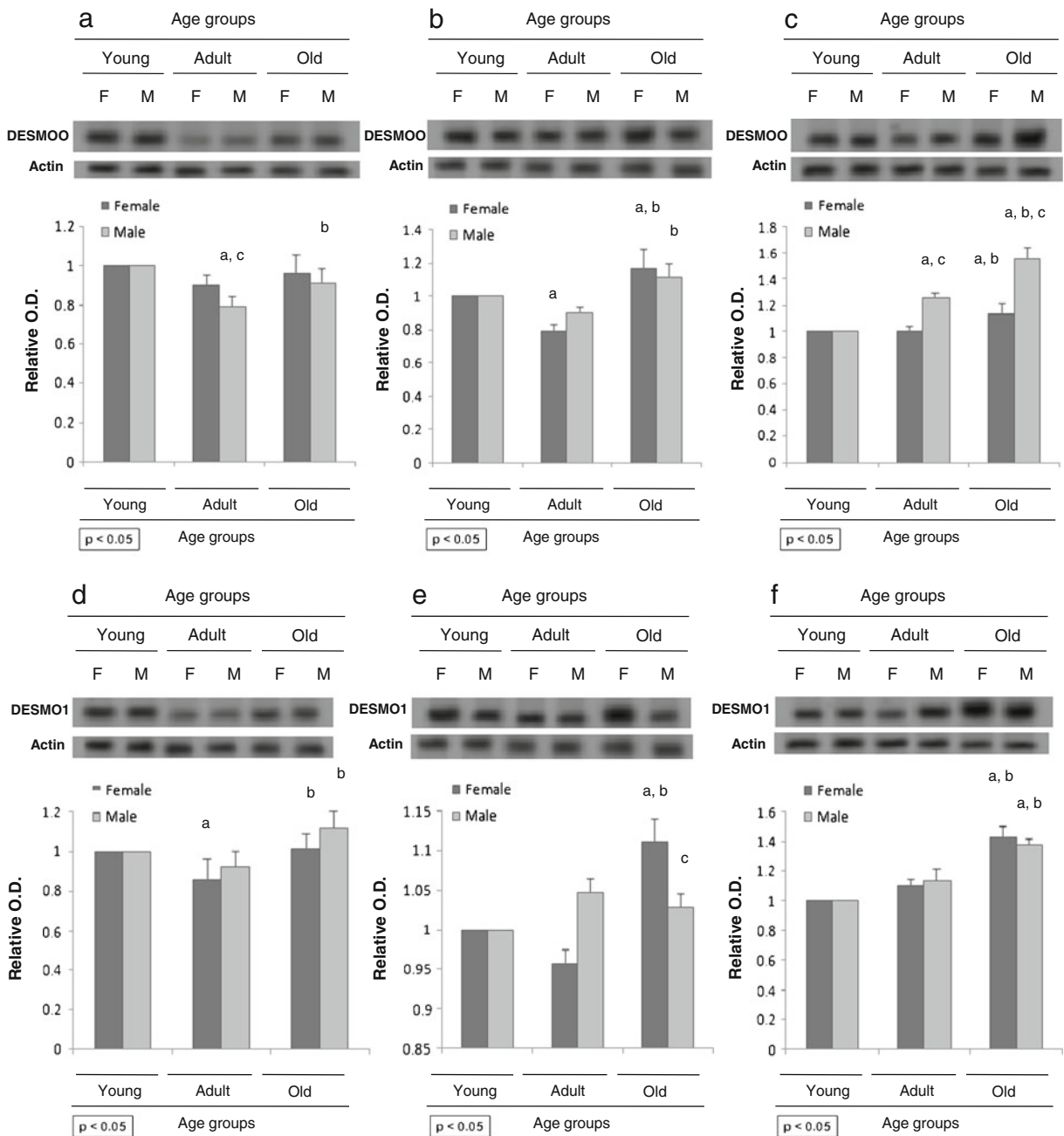


Fig. 4 Microsatellite markers in *Desmodus rotundus*. The figure shows representative images and densitometry performed for microsatellite DESMOO levels in **a** liver, **b** lung, and **c** brain as well as DESMO1 levels from **d** liver, **e** lung, and **f** brain. Microsatellite levels were compared between age and gender groups. Relative optic density was normalized against juvenile

animals as control. Each point represents the mean \pm S.D. of five determinations performed in independent donor animals. Statistical significance with respect to control (juvenile group) (*a*) or adult (*b*) $p < 0.05$ was considered. Letter *c* stands for statistical significance between genders ($p < 0.05$). DESMOO weight= 200 pb; DESMO1 weight= 300 pb; actin weight= 150 pb

the old groups, and this was especially evident in the brain (Fig. 4c, f) ($p < 0.05$). For females, the DESMOO marker decreased in liver and lung (Fig. 4a, b) ($p < 0.05$)

in the adult group in comparison with the juvenile group (10 % and 21 %, respectively) ($p < 0.05$). In males, DESMOO increased 20 % in liver and 10 % in lung,

Table 1 Catalase enzymatic activity measured in *M. velifer* and *D. rotundus*

CAT activity (mmol/g)							
<i>Myotis velifer</i>			<i>Desmodus rotundus</i>				
	Liver	Lung	Brain		Liver	Lung	Brain
Females			Females				
Young	10.34±0.28	7.43±0.09	0.950±0.21	Young	13.39±0.22	7.11±0.24	2.46±0.33
Adult	9.47±0.12	5.77±0.33	0.76±0.41	Adult	11.42±0.30	10.74±0.42	1.89±0.52
Old	4±0.19 ^{*,**}	3.95±0.16 [*]	0.27±0.14 ^{*,**}	Old	9.79±0.25	5.62±0.57	0.78±0.43 [*]
Males			Males				
Young	9.51±0.22	8.8±0.21	3.11±0.31	Young	12.92±0.31	8.42±0.15	3.21±0.49
Adult	6.72±0.14	7.67±0.45	2.53±0.88	Adult	11.35±0.41	9.26±0.17	4.17±0.25
Old	3.33±1.19 ^{*,**}	2.78±0.17 ^{*,**}	0.97±0.33 [*]	Old	8.43±0.38	7.69±0.38	1.43±0.37 [*]

* Statistically different from young groups; ** statistically different from adult groups

while in the brain, the increase was of 13 % ($p<0.05$) when comparing juvenile vs. adult bats.

Antioxidant enzymatic assay analysis

The antioxidant enzymatic activities are shown in Tables 1, 2, and 3. Activities of CAT and GPx for both species were lower in old than in juvenile and adult bats, particularly in brain ($p<0.05$).

In *M. velifer*, liver tissue had the highest CAT activity in both juvenile females and males ($p<0.05$); CAT activity was significantly lower in old animals

(60 % and 66 %, respectively) ($p<0.05$) (Table 1). GPx activity was lower in old bats compared with juveniles (47 % and 52 %, respectively) (Table 2). In *D. rotundus*, both CAT and GPx activities were higher than the activities of those enzymes in *M. velifer* ($p<0.05$). In particular, GPx activity was highest in *D. rotundus* juvenile females' liver tissue; activity declined by 43 % in old females and by 53 % in old males ($p<0.05$). With the exception of CAT activity in the brain and GPx activity in lung of males, antioxidant enzyme activity in tissues from old *D. rotundus* was similar to that in tissues from adult *M. velifer*.

Table 2 Glutathione peroxidase enzymatic activity measured in *M. velifer* and *D. rotundus*

GPx activity (mmol/g)							
<i>Myotis velifer</i>			<i>Desmodus rotundus</i>				
	Liver	Lung	Brain		Liver	Lung	Brain
Females			Females				
Young	21.71±0.62	17.36±0.44	13.87±0.52	Young	41.73±0.85	30.90±0.75	13.54±0.98
Adult	16.13±0.22	14.23±0.17	8.12±0.78	Adult	36.12±0.80	22.41±0.49 [*]	7.31±0.67 [*]
Old	10±0.74 [*]	5.82±0.64 ^{*,**}	3.61±0.54 ^{*,**}	Old	18.21±0.64 ^{*,**}	11.72±0.79 ^{*,**}	1.45±0.35 ^{*,**}
Males			Males				
Young	27±0.82	15.84±0.91	8.76±0.81	Young	36.19±0.84	13.27±0.75	6.31±1.01
Adult	19.38±0.24 [*]	12.30±1.05	5.13±0.44	Adult	27.74±0.61 [*]	12.26±0.96	5.68±0.49
Old	14.21±0.98 [*]	7.42±0.56 ^{*,**}	2.39±0.92 [*]	Old	18.99±0.38 ^{*,**}	5.24±0.13 ^{*,**}	2.07±0.62

* Statistically different from young groups; ** statistically different from adult groups

Table 3 Superoxide dismutase enzymatic activity measured in *M. velifer* and *D. rotundus*

SOD activity							
<i>Myotis velifer</i>			<i>Desmodus rotundus</i>				
	Liver	Lung	Brain		Liver	Lung	Brain
Females			Females				
Young	1,640.84±35.9	568.21±30.65	240.73±49.08	Young	2,144.07±24.8	732.89±19.20	240.73±49.08
Adult	1,540.24±57.13	464.87±25.21	348.17±41.21	Adult	1,998.75±24.98	807.71±42.66	348.17±41.21
Old	1,935±35.77	591.31±27.10	407.12±32.99	Old	2,311±46.09	994.74±33.74	407.12±32.99
Males			Males				
Young	1,471±25.77	573.84±32.44	336.88±36.30	Young	2,009±13.21	628.17±10.31	210.74±21.01
Adult	1,530.42±21.41	512.80±31.61	292.31±47.11	Adult	1,792.33±31.02	632.40±38.11	311.02±4.77
Old	1,766.21±17.09	688.39±28.03	422.28±47.05	Old	2,206.55±45.19	819.22±7.29	475.24±23.67

* Statistically different from young groups; ** statistically different from adult groups

Discussion

Microsatellite instability (MSI) results from accumulated mutations that are believed to occur in an organism (Narine et al. 2007). It has been previously suggested that DNA oxidative damage might induce MSI upon replication of the damaged DNA (Jackson and Loeb 2000). Therefore, it is important to understand the relationship between efficiency of antioxidant mechanisms, metabolic rate, DNA damage, and longevity. However, data supporting the relationship between DNA oxidative damage and MSI formation are scarce and inconclusive. ROS have been considered a DNA damage-inducing factor that has an impact on genetic fidelity and cell homeostasis. It has been demonstrated that MSI increases in the presence of an MMR deficiency scenario, particularly in the absence of a functional MSH2 expression; in models such as genetically modified *E. coli* strains with mismatch repair deficiency, a frame-shift frequency due to MSI increased by 300-fold was observed (Jackson et al. 1998). Modified mouse strains that combine MLH1/ATM (ataxia–telangiectasia) deficiencies, along with superoxide dismutase 1 (SOD1) dysfunction, present an increase in oxidative stress and radiation sensitivity, along with a dramatic increase in aggressive lymphomas; however, these animals did not show any difference on their lifespan (Ziv et al. 2005).

In this study, MSH2 and MLH1 levels were lower in the old groups of *M. velifer* compared with the juvenile and adult groups. On the other hand, *D.*

rotundus had different MMR protein levels than those found in *M. velifer* in the adult and old age groups. The fact that vampire bats (the long-lived species in this study) had reduced levels of MMR could indicate that another process or signal might modify expression of these proteins due to a reduction in errors in the DNA sequence, like BER or NER efficiency. At the same time, an increase (> 40 %) of the microsatellite markers MS3DO2 and MS3EO2 in *M. velifer* was observed in the old groups, while the levels of microsatellite markers DESMOO and DESMO1 for *D. rotundus* were not as high as the ones observed in cave bats, being lower in the adult groups compared with the juvenile controls (10 % to 20 %).

Old *M. velifer* had greater levels of microsatellite instability, which correlates with reduced levels of MMR proteins; similarly, *D. rotundus* had reduced levels of microsatellite markers and also reduced levels of MMR proteins. Since *M. velifer* is a short-lived species compared with *D. rotundus*, these factors could suggest associations between DNA damage and repair failures that might affect the longevity in bats.

MSH2 and MLH1 expression during aging have not been studied in bats, but experiments conducted with genetically modified MSH2 knock-out *C. elegans* showed that with each generation of worms, fertility and survival rate decreased due to an increase in mutations attributed to the lack of MMR efficiency resulting from reduced MSH2 expression (Estes et al. 2004). Using T cells from young and old human donors to model the process of T cell clonal expansion

in vitro, it was determined that levels of oxidative DNA damage and microsatellite instability were increased in an age-associated manner along with decreasing DNA repair capacity. Results obtained from another study using T cell clones from extremely healthy very old donors indicated that DNA repair was better maintained and oxidative DNA damage remained in the same degree (Pawelec et al. 2004). In humans, the cumulative risk for colorectal cancer increases in patients of 70 years of age or more, compared to cumulative risk in patients 30 and 50 years of age. This increase was not only correlated with an increase in MSH2 and MLH1 mutations in the 70 year old patients, but also with the increased rate of mutations in the MLH1 gene male patients compared with female patients in all three age-dependent groups. Female patients also showed increased mutation in the MSH2 gene compared with male patients (Choi et al. 2009). Besides inherited mutations that could affect functionality, this information might account for a sex difference in susceptibility to aging and degenerative diseases in organisms as they grow older, resulting from different defects in DNA repair signaling.

According to Lyman (1970), bats sustain very high oxygen consumption when active, a characteristic that contrasts with the drastic drops in oxygen consumption when they become torpid. Records of individuals surviving more than 30 years in the wild now exist for five species of bats. Of these, three species belong to the genus *Myotis*, which also have the capacity for hibernation. Wilkinson and South (2002) have suggested that bat lifespan significantly increases with hibernation, body mass, and occasional cave use, but decreases with reproductive rate, while the influence of diet remains unclear. It has also been shown that *M. velifer* has increased antioxidant activities during hibernation; cognate data for *D. rotunda* are lacking (Salmon et al. 2009).

However, there might be additional causes that could influence bat longevity. *M. velifer* is prone to live in caves, a condition that coupled with its capacity to fly, enables these bats to better avoid and escape predators (Fitch et al. 1981). Hibernation also plays a significant role in bat longevity due to reduced extrinsic mortality: Hibernating bats can cope with periods of food unavailability, while the cave provides a protected environment, thus reducing the risk of starvation and predation. Therefore, it has been suggested

that hibernating bats possess greater longevity than tropical species (Wilkinson and South 2002). *M. velifer* populations inhabiting the central part of Mexico do not hibernate, but pass through intermittent phases of profound torpor during the hibernation period. Conversely, tropical bats, like *D. rotundus*, are also long-lived; hence, hibernation might not be the only factor to increase longevity in all bats species. In this regard, *D. rotundus* is not a recurrent cave dweller like *M. velifer* and does not hibernate, and although it is able to fly, this vampire bat sprints in order to reach for its prey (such as cattle); therefore, it is more exposed to different types of predators. Nevertheless, it has been estimated that bats that sometimes roost in caves live longer than bats that either never or always roost in caves (Wilkinson and South 2002). These features are interesting since, in theory, the least exposed species to environmental factors, like cave bats, should have a higher survival rate and longer lifespan. On the other hand, according to the evolutionary theory of aging, senescence is attributed to the declining strength of natural selection at successive ages after sexual maturity. This means that the genetic accumulation of late-acting deleterious alleles and/or selection for alleles with pleiotropic effects might modify the longevity of these species (Austad and Fischer 1991). The vampire bat, although it is more exposed to environmental hazards and predators, also lives in tropical areas, which allows conditions in humidity and temperature that promote genetic traits and food availability that could improve life quality and, therefore, its longevity. Besides, since *Desmodus* is not a cave dweller like *Myotis*, it is not exposed to other type of toxic factors like the by-products generated by its life cycle. Cave bats generate large concentrations of ammonia primarily by the degradation of urea and excrements that might generate physiological stress in species like *M. velifer*, which *D. rotundus* does not experience (McFarlane et al. 1995). Nitrogen degradation metabolism is known to generate high levels of nitrosative and oxidative stress (Oliveira et al. 2010).

CAT and GPx activities were lower in the old female *M. velifer* bats, compared with adult and juvenile animals of the same species (Tables 1 and 2). Also, the males showed a linear decrease in antioxidant enzyme activities with age. These observations are similar to those made previously on different bat species like *M. nigricans* (Wilhelm et al. 2007), indicating a mechanism whereby these long-lived

organisms can compensate for their high metabolic rate with different antioxidant responses. In *D. rotundus*, decreased antioxidant activities were observed in old bats; however, antioxidant enzyme activities in the old vampire bats were equivalent to those recorded in the samples from adult cave bats. The higher antioxidant enzyme activity might give vampire bats an advantage in terms of antioxidant protection, which, in turn, could improve its longevity, given that this species does not undergo torpor. SOD activity increased in the old bats, showing a considerable difference compared with CAT and GPx activity (Table 3). This could indicate that old bats increase their protection against oxidative stress. It could also suggest that the oxidative damage in these organisms is higher and that the activity measured is indicative of the tissue exposure during their longer lifespans.

Another important feature to consider is the different diets of the two species, since the differences found in antioxidant profiles might reflect food differences between species (blood versus insects). It has been reported that vampire bats present high levels of oxidative damage due to the high intra-cellular iron content in blood (Ferreira-Cravo et al. 2007), yet in our study, this high level of oxidative damage did not translate into species differences in DNA instability, since DNA seems to be better protected against damage in *Desmodus*. This difference in DNA instability might be related to the antioxidant profile observed in the tissues studied. In addition, differences in antioxidant levels among tissues were also observed. These tissues might be exposed to different levels of oxidative stress. For instance, the lungs are constantly exposed to higher oxygen tension than most of the tissues; therefore, they might have special antioxidant needs. The liver and the brain are known to be very energy-demanding tissues, with elevated numbers of mitochondria, and therefore also highly susceptible to oxidative stress, particularly the brain.

In order to determine if there is a correlation between MSH2 or MLH1 levels with the MSI and if this kind of DNA damage correlates with the enzymatic activities, a mathematical regression was performed. Figure 5 summarizes the results obtained for this analysis for *M. velifer* only using MSH2 (Fig. 5a–c) and CAT (Fig. 5d–f); however, it is important to remark that this regression was also performed with MLH1 and the other antioxidant enzymes (data not shown). Figure 6 shows the same analysis performed for *D. rotundus*. In Fig. 5a–c, it can be seen that for *M.*

velifer, a decrease in MSH2 correlates with an increase of MSI, and the same can be observed in Fig. 5d–f with the decrease in antioxidant activities. This condition is more evident when old bats are compared with adult and juvenile bats. However, in the case of *D. rotundus* (Fig. 6), the tendency differs considerably. Again, according to the evolutionary theory of aging, cellular constituents can eventually fail due to errors and damage accumulation. In contrast, considering the “rate of living” theory, error accumulation would be related to physiological processes as reflected by mass specific metabolic rates. In *M. velifer*, these could explain why the microsatellite instability is higher than *D. rotundus* and could be associated with the high metabolic rates found for other bat species (Austad and Fischer 1991).

Another important feature to take into consideration when comparing the maximum longevity among species is the relationship between body mass and longevity. In this study, it is of particular interest because *D. rotundus*, which lives longer than *M. velifer*, is also larger. Based on a regression of body mass and maximum longevity, the cave *Myotis* might live 2.7 times longer than expected, whereas the vampire bat 4.8 times, thus coinciding with our results.

Morphological and molecular phylogenetic analyses have revealed that the Vespertilionidae family, to which *Myotis velifer* belongs, originated before Phyllostomidae, to which *Desmodus rotundus* belongs; however, the genus *Desmodus* is older (appeared 26 million years ago) than *Myotis* (diverged 20 million years ago) (Teeling et al. 2005). There are three species of vampire bats known (*D. rotundus*, *Diphylla ecaudata*, and *Diaemus youngi*) that belong to the Desmodontinae subfamily (Jones et al. 2009). The only reported data about longevity are related to *D. rotundus*; hence, no comparisons within the species in the subfamily can be made.

On the other hand, the genus *Myotis*, with about 100 members (Simmons 2005), is distributed throughout the world, except in the polar region, and represents one of the most diverse and successful radiations among mammals. There are lifespan data reported for 22 species of *Myotis* (Wilkinson and South 2002), with different geographic dispersion: 9 Palearctic species (Eurasia) 25.4±6.3 years average lifespan, 12 Nearctic (North America) 17.6±6.9 years average lifespan, and just 1 Neotropical species (Center-South America) 7.0-years average lifespan. Phylogenetic analyses indicate that the Palearctic species are the ancient ones, while the Neotropical is the more recent

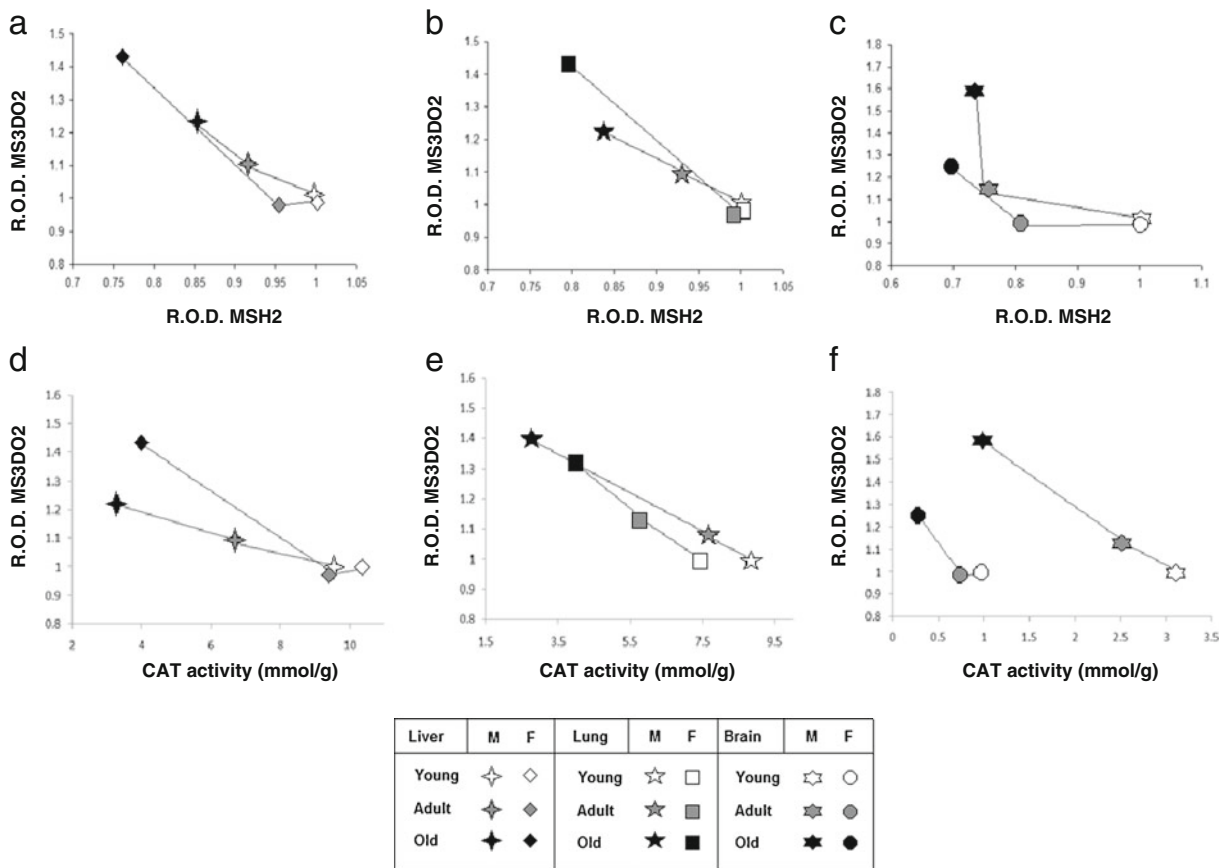


Fig. 5 *Myotis velifer* comparison between MMR levels and MSI. The figures shows comparisons between MSI levels against MMR proteins levels found in **a** liver, **b** lung, and **c**

brain as well as comparing MSI levels against CAT activity levels from **d** liver, **e** lung, and **f** brain in female (F) and male (M) bats of *Myotis velifer*

species (Stadelmann et al. 2007). It is notable that *Myotis* longevity tends to diminish according to its geographic affinity, from the old temperate region (Palearctic) to the recent (Nearctic) and, in turn, to the tropical region. This suggests a possible relationship between longevity reduction and *Myotis* dispersion to temperate and tropical environments, as well as to the decrease in hibernation duration, or maybe it is just that there are longer and better data of bat longevity from the temperate regions. Interestingly, most of the species that inhabit cold or temperate zones (Palearctic and Neotropical) hibernate, but they just breed one offspring per year (monoestrous, low reproductive rate), while the one Neotropical species (*M. nigricans*), which does not hibernate, is polyestrous, with a higher reproductive rate of three offsprings per year. Remarkably, these females have a smaller body weight compared to other *Myotis* (4 vs. 10.1 g *M. velifer*).

Since organisms that hibernate, and probably those who enter into torpor, have higher longevity rates, it is intriguing that *D. rotundus* does not adjust to this pattern. Indeed, *D. rotundus*' lifestyle has some features that does not fit in the expected longer lifespan model, such as a gestational period of 7 months, feeding from blood (which contains elevated levels of iron), and having considerable levels of stress due to its need to protect its reproductive niche from satellite males. However, this species lives almost two times more than *M. velifer*. In fact, the linear regression of Fig. 5 for *M. velifer* completely shows what is expected, a decrease in repair and antioxidant enzymes with age and an increase in DNA damage; however, Fig. 6 for *D. rotundus* presents a very different behavior, which is difficult to explain. In an attempt to understand this phenomenon, we have to take into consideration that since *D. rotundus* cannot enter

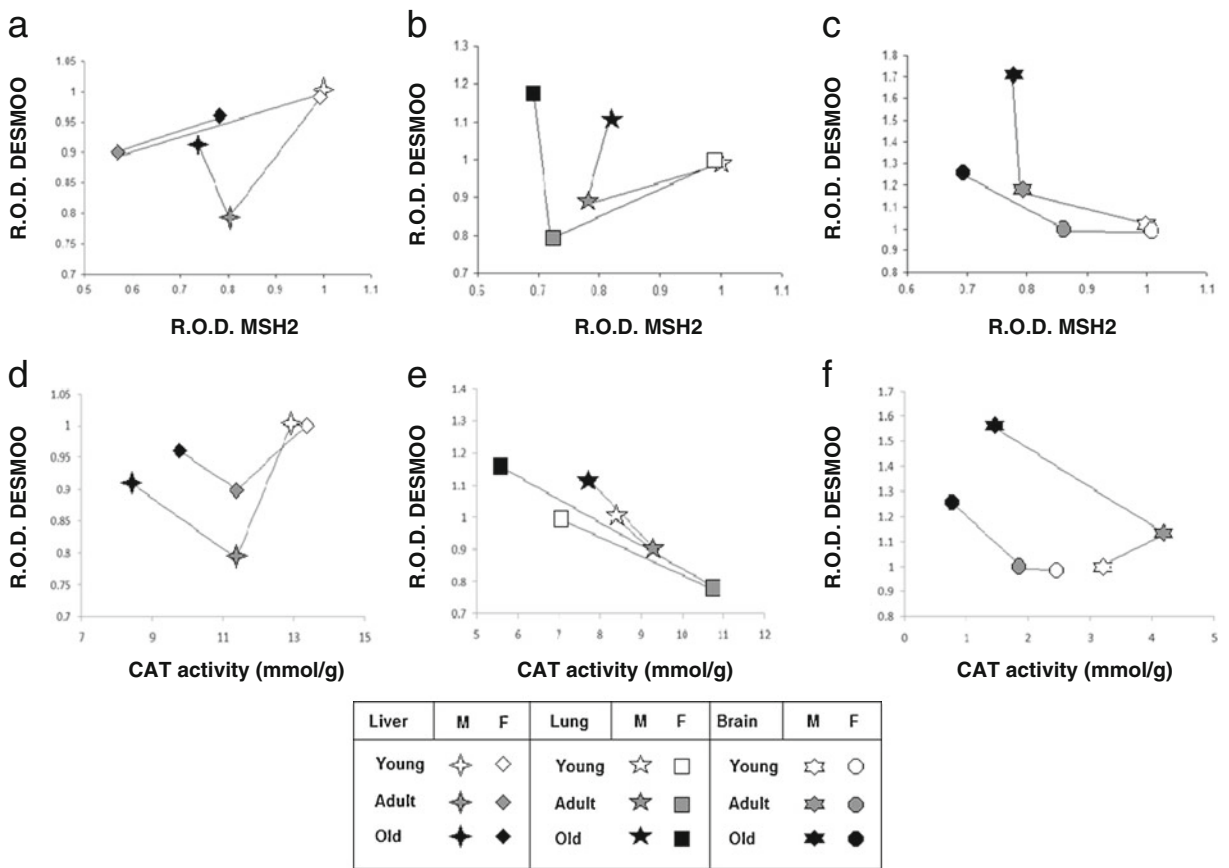


Fig. 6 *Desmodus rotundus* comparison between MMR levels and microsatellite instability. The figures shows comparisons between MSI levels against MMR proteins levels found in **a**

liver, **b** lung, and **c** brain as well as comparing MSI levels against CAT activity levels from **d** liver, **e** lung, and **f** brain in female (F) and male (M) bats of *Desmodus rotundus*

into torpor, metabolic energy consumption is higher compared with *M. velifer*. This could partially explain the higher CAT and GPX activities, as a mechanism to counteract the endogenous generation of ROS. SOD activity was also higher in old bats from both species, which might account for a higher superoxide production. However, this alone cannot explain why it differs with the notion that an increased metabolism increases oxygen consumption and damage. Due to the fact that *D. rotundus* is a homeothermic organism that does not enter torpor, it forces the scenario of having increased antioxidant activities compared with organisms like *M. velifer* that can hibernate; these might induce an adaptive effect on the cells to a low dose of oxidative stress, which might activate the expression of cytoprotective and antioxidant proteins, allowing pro-oxidants to emerge as

important hormetic agents (Luna-López et al. 2010). The hormetic effect might explain, at least partially, the different pattern of response in *D. rotundus*, which suggest an adaptive response to all of these factors helping to maintain a healthy and prolonged lifespan. However, more experiments have to be done to completely understand this phenomenon.

Final regards

Throughout this paper, we have established that the levels of MMR proteins MSH2 and MLH1 have differences in tissues from Chiroptera species *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus* according to age, and the same can be said for the quantification of microsatellite instability which also varies with age.

Therefore, the information obtained from the old groups indicates that these are the ones with the significant variations pointing to associated factors that might lead the aging process. However, more studies are needed since these factors are usually linked with tumorigenic processes rather than the aging condition. Finally, antioxidant capabilities through enzymatic activities can give insights about the cell homeostasis in these species, but hardly explain alone why the behavior in *D. rotundus* contradicts the hypothesis presented here. The low expression of MMR proteins, reduction in microsatellite markers, and higher antioxidant activities, along with a prolonged lifespan, suggest that there might be another factor in *D. rotundus* that could be modifying its behavior compared with the one seen in *M. velifer*. In this respect, more studies are needed, specifically studies that could show a broader spectrum of damage through levels of oxidation in DNA in the form of adducts, as well as protein and lipid oxidation as markers of oxidative stress.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. Ricardo López-Wilchis from the Department of Biology in the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) for the facilities and knowledge in bat collecting, QFB Norma S. Sánchez and Dr. Omar Arellano-Aguilar from the IFC and IIB, UNAM for their help with the enzymatic activities and the linear regressions, Dr. José Manuel Hernández from CINVESTAV for generously donating us the actin antibody, and specially to Dr. Kathleen Fischer from the Barshop Institute for Aging and Longevity Studies, UT Health Science Center San Antonio, for editing and discussing this manuscript. This work was supported by CONACyT's grant No. CB-2006-1-59659. JC Conde-Pérezprina and VY González-Puertos are CONACyT scholarship holders.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- Ahmad S, Pardini RS (1998) Evidence for the presence of glutathione peroxidase activity towards an organic hydroperoxidase in larvae of the Babbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem* 18:861–866
- Alazzouzi H, Domingo E, González S, Blanco I, Armengol M, Espín E, Plaja A, Schwartz S, Capella G, Schwartz S Jr (2005) Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis. *Hum Mol Genet* 14:235–239
- Austad SN, Fischer KE (1991) Mammalian aging, metabolism, and ecology: evidence from the bats and marsupials. *J Gerontol* 46:B47–B53
- Balmori A (1998) El estudio de los quirópteros a través de sus emisiones ultrasónicas. *Galemys Boletín SECEM* 10:12–19
- Barouki R (2006) Ageing free radicals and cellular stress. *Med Sci* 22:266–272
- Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511:145–178
- Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech Ageing Dev* 125:811–826
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brunet-Rossini AK, Austad SN (2004) Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology* 5:211–222
- Campos PC, Silva VG, Furtado C, Machado-Silva A, Darocha WD, Peloso EF, Gadelha FR, Medeiros MH, Lana Gde C, Chen Y, Barnes RL, Passos-Silva DG, McCulloch R, Machado CR, Teixeira SM (2011) *Trypanosoma cruzi* MSH2: functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Mol Biochem Parasitol* 176:8–16
- Carleton JP, Steinberg B, Kunz TH (1982) Dentin, cementum, and age determination in bats: a critical evaluation. *J Mammal* 63:197–207
- Chang IY, Jin M, Yoon SP, Youn CK, Yoon Y, Moon SP, Hyun JW, Jun JY, You HJ (2008) Senescence-dependent MutS alpha dysfunction attenuates mismatch repair. *Mol Cancer Res* 6:978–989
- Choi YH, Cotterchio M, McKeown-Eyssen G, Neerav M, Bapat B, Boyd K, Gallinger S, McLaughlin J, Aronson M, Briollais L (2009) Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario. *Hered Cancer Clin Pract* 7:14–25
- Conde-Pérezprina JC, Luna-López A, López-Diazguerrero NE, Damián-Matsumura P, Zentella A, Königsberg M (2008) MSH2 promoter region hypermethylation as a marker of aging-related deterioration in old retired female breeder mice. *Biogerontology* 9:325–334
- Davis JS, Nicolay CW, Williams SH (2010) A comparative study of incisors procumbency and mandibular morphology in vampire bats. *J Morphol* 271:853–862
- Denver DR, Feinberg S, Estes S, Thomas WK, Lynch M (2005) Mutation rates, spectra and hotspots in mismatch repair-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 170:107–113
- Estes S, Phillips PC, Denver DR, Thomas WK, Lynch M (2004) Mutation accumulation in populations of varying size: the distribution of mutational effects for fitness correlates in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 166:1269–1279
- Ferreira-Cravo MW, Andrade RG, Drew K, Hermes-Lima M (2007) Physiological oxidative stress in the animal world. *Comp Biochem Physiol A* 148:S63–S64
- Fitch JH, Shump KA, Shump AU (1981) *Myotis velifer*. *Mamm Species* 149:1–5
- Flohé L, Günzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114–121

- Gannon WL, Sikes RS, Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists (2007) Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 83:809–823
- Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C (2007) Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* 35:7466–7474
- Greenhall AM, Joermann G, Schmidt V (1983) *Desmodus rotundus*. *Mamm Species* 202:1–6
- Harman D (2003) The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 5:557–561
- Jackson AL, Loeb LA (2000) Microsatellite instability induced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 447:187–198
- Jackson AL, Chen R, Loeb LA (1998) Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12468–12473
- Jiricny J (2006) MutLalpha: at the cutting edge of mismatch repair. *Cell* 126:239–241
- Jones KE, Bielby J, Cardillo M, Fritz SA, O'Dell J, Orme CDL, Safi K, Sechrest W, Boakes EH, Carbone C, Connolly C, Cutis MJ, Foster JK, Grenyer R, Habib M, Plaster CA, Price SA, Rigby EA, Rist J, Teacher A, Bininda-Emonds ORP, Gittleman JL, Mace GM, Purvis A (2009) PanTHERIA: a species-level database of life history, ecology, and geography of extant and recently extinct mammals. *Ecology* 90:2648
- Jürgens KD, Prothero J (1987) Scaling of maximal lifespan in bats. *Comp Biochem Physiol A* 88:361–367
- Kruttsch PH (2009) The reproductive biology of the cave myotis (*Myotis velifer*). *Acta Chiropterologica* 11:89–104
- Kültz D (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 67:225–257
- Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74:681–710
- Kunz TH (1990) Ecological and behavioral method for the study of bats. Smithsonian Institution Press, Washington DC, p 533
- Kunz TH, Anthony ELP (1982) Age estimation and post-natal growth in the bat *Myotis lucifugus*. *J Mammal* 63:23–32
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lin Y, Wilson JH (2009) Diverse effects of individual mismatch repair components on transcription-induced CAG repeat instability in human cells. *DNA Repair* 8:878–885
- López-Torres M, Pérez-Campo R, Cárdenas S, Rojas C, Barja G (1993) A comparative study of free radicals in vertebrates: II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp Biochem Physiol B* 105:757–763
- Lord RD, Muradali F, Lazaro L (1976) Age composition of vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Northern Argentina and Southern Brazil. *J Mammal* 57:573–575
- Luna-López A, Triana-Martínez F, López-Díazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A, Gómez-Quiroz LE, Königsberg M (2010) Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Rad Biol Med* 49:1192–1204
- Lyman CP (1970) Thermoregulation and metabolism in bats. In: Wimsatt WA (ed) *Biology of bats*. Academic Press, New York, pp 301–330
- Machado-Silva A, Teixeira SM, Franco GR, Macedo AM, Pena SD, McCulloch R, Machado CR (2008) Mismatch repair in *Trypanosoma brucei*: heterologous expression of MSH2 from *Trypanosoma cruzi* provides new insights into the response to oxidative damage. *Gene* 411:19–26
- Martin RE, Pine RH, DeBlase AF (2001) *A manual of mammalogy: with keys to families of the world*, 3rd edn. McGraw-Hill, New York, p 333
- Martin RC, Ahn J, Nowell SA, Hein DW, Doll MA, Martini BD, Ambrosone CB (2006) Association between manganese superoxide dismutase promoter gene polymorphism and breast cancer survival. *Breast Cancer Res* 8:R45
- Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG (2001) Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitiolacetate. *Arch Biochem Biophys* 396:171–177
- McFarlane DA, Keeler RC, Mizutani H (1995) Ammonia volatilization in a Mexican bat cave ecosystem. *Biogeochemistry* 30:1–8
- Medellín AR, Arita TH, Sánchez HÓ (1997) Identificación de los murciélagos de México. *Clave de campo*, vol 2. Asociación Mexicana de Mastozoología AC Publicaciones Especiales, México, p 83
- Morris P (1972) A review of mammalian age determination methods. *Mamm Rev* 2:69–104
- Moustacchi E (2000) DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat Res* 464:35–40
- Mullins DN, Crawford EL, Khuder SA, Hernandez DA, Yoon Y, Willey JC (2005) CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma. *BMC Cancer* 5:1–14
- Nakano T, Katafuchi A, Terato H, Suzuki T, Van Houten B, Ide H (2005) Activity of nucleotide excision repair enzymes for oxanine cross-link lesions. *Nucleic Acids Symp Ser* 49:293–294
- Narine KA, Felton KE, Parker AA, Tron VA, Andrew SE (2007) Non-tumor cells from an MSH2-null individual show altered cell cycle effects post-UVB. *Oncol Rep* 18:1403–1411
- Neuweiler G (2000) *The biology of bats*. Oxford University Press, New York, p 310
- Núñez A, de Viana ML (1997) Comparison of age determination methods for *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Rev Biol Trop* 45:1237–1242
- Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM (2010) The role of oxidative stress in the aging process. *Scien W J* 15:1121–1128
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase in tissue extracts. *Anal Biochem* 154:536–541
- Park S (1991) Development of social structure in a captive colony of the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Ethol* 89:335–341
- Pawelec G, Mariani E, McLeod J, Ben-Yehuda A, Fulop T, Aringer M, Barnett Y (2004) Engineering anticancer T cells for extended functional longevity. *Ann N Y Acad Sci* 1019:178–185
- Peltonmäki P (2001) Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 10:735–740

- Phung QH, Winter DB, Alrefai R, Gearhart PJ (1999) Hypermutation in Ig V genes from mice deficient in the MLH1 mismatch repair protein. *J Immunol* 162:3121–3124
- Piaggio AJ, Johnston JJ, Perkins SL (2008) Development of polymorphic microsatellite loci for the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Mol Ecol Resour* 8:440–442
- Salmon AB, Leonard S, Masamsetti V, Pierce A, Podlutzky AJ, Podlutzkaya N, Richardson A, Austad SN, Chaudhuri AR (2009) The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *FASEB J* 23:2317–2326
- Santuci-Darmanin S, Paquis-Flucklinger V (2003) Les homologues de MutS et de MutL au cours de la méiose chez les mammifères. *Med Sci* 19:85–91
- Saribasak H, Rajagopal D, Maul RW, Gearhart PJ (2008) Hijacked DNA repair proteins and unchained DNA polymerases. *Philos Trans R Soc London (Biol)* 364:605–611
- Scandalios JG (2002) Oxidative stress responses—what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol* 3:1019
- Simmons NB (2005) Order Chiroptera. In: Wilson DS, Reeder DM (eds) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, vol 1, 3rd edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore, p 743
- Springer VG, Johnson GD (2000) Use and advantages of ethanol solution of alizarin red S dye for staining bone in fishes. *Copeia* 1:300–301
- Stadelmann B, Lin LK, Kunz TH, Ruedi M (2007) Molecular phylogeny of New World *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. *Mol Phylogenet Evol* 43:32–48
- Stirpe F, Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244:3855–3863
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ, Murphy WJ (2005) A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307:580–584
- Trujillo RG, Amelon SK (2009) Development of microsatellite markers in *Myotis sodalist* and cross-species amplification in *M. grisescens*, *M. leibii*, *M. lucifugus*, and *M. septentrionalis*. *Conserv Genet* 10:1965–1968
- Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodriguez-Cruz M, Riano D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Königsberg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S (2007) The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population. *Diabetes* 56:1881–1887
- Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res* 22:1774–1775
- Wei YH, Kao SH, Lee HC (1996) Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletions and lipid peroxidation in human aging. *Ann NY Acad Sci* 15:24–43
- Wilhelm FD, Althoff SL, Dafré AL, Boveris A (2007) Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comp Biochem Physiol C* 146:214–220
- Wilkinson GS (1985) The social organization of the common vampire bat: I. Pattern and cause of association. *Behav Ecol Sociobiol* 17:111–121
- Wilkinson GS, South JM (2002) Life history, ecology and longevity in bats. *Aging Cell* 1:124–131
- Xu R, Liu N, Xu X, Kong B (2011) Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. *J Dairy Sci* 94:3739–3746
- Young LC, Peters AC, Maeda T, Edelmann W, Kucherlapati R, Andrew SE, Tron VA (2003) DNA mismatch repair protein Msh6 is required for optimal levels of ultraviolet-B-induced apoptosis in primary mouse fibroblasts. *J Invest Dermatol* 121:876–880
- Ziv S, Brenner O, Amariglio N, Smorodinsky NI, Galron R, Carrion DV, Zhang W, Sharma GG, Pandita RK, Agarwal M, Elkon R, Katzin N, Bar-Am I, Pandita TK, Kucherlapati R, Rechavi G, Shiloh Y, Barzilai A (2005) Impaired genomic stability and increased oxidative stress exacerbate different features of ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* 14:2929–2943

Review Article

DNA Mismatch Repair System: Repercussions in Cellular Homeostasis and Relationship with Aging

Juan Cristóbal Conde-Pérezprina, Miguel Ángel León-Galván, and Mina Konigsberg

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, 186 Avenida San Rafael Atlixco, 09340 Mexico City, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Mina Konigsberg, mkf@xanum.uam.mx

Received 31 May 2012; Revised 24 September 2012; Accepted 8 October 2012

Academic Editor: William C. Burhans

Copyright © 2012 Juan Cristóbal Conde-Pérezprina et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The mechanisms that concern DNA repair have been studied in the last years due to their consequences in cellular homeostasis. The diverse and damaging stimuli that affect DNA integrity, such as changes in the genetic sequence and modifications in gene expression, can disrupt the steady state of the cell and have serious repercussions on pathways that regulate apoptosis, senescence, and cancer. These altered pathways not only modify cellular and organism longevity, but quality of life (“health-span”). The DNA mismatch repair system (MMR) is highly conserved between species; its role is paramount in the preservation of DNA integrity, placing it as a necessary focal point in the study of pathways that prolong lifespan, aging, and disease. Here, we review different insights concerning the malfunction or absence of the DNA-MMR and its impact on cellular homeostasis. In particular, we will focus on DNA-MMR mechanisms regulated by known repair proteins MSH2, MSH6, PMS2, and MHL1, among others.

1. Introduction

Throughout their lives, organisms are exposed to many different environmental and internal stimuli that affect or modify their functionality. Aging has been considered an important phenomenon that is promoted or altered by these factors. The aging theory, proposed by Harman [1], establishes that unrepaired oxidative damage to biomolecules caused by free radicals and accumulated during an organism’s lifetime, might bring on the aging process. Based on *in vitro* and *in vivo* analysis, it has been established that cellular metabolic pathways, like mitochondrial respiration, generates oxidants that can induce biomolecules oxidation [2]. Prolonged exposure to pollutants, metals, toxic compounds, and ionizing radiation, can also induce degenerative processes associated with premature aging [3, 4]. When oxidative damage occurs, in particular DNA damage, it creates a cascade of events that may contribute to aging and disease [5]. However, cells have different mechanisms to maintain DNA biochemical integrity and stability. One of them is the base excision repair (BER) system, a cellular mechanism that repairs damaged bases in the DNA sequence

originating from deamination, oxidation, and alkylation. Nucleotide excision repair (NER) is another DNA repair mechanism which differs from BER. While BER repairs individual damaged bases, the NER system corrects larger portions of DNA damage by removing the strand section that contains a major nucleotide lesion [6–8]. Both BER and NER systems are constantly active in the cell, repairing DNA damage as it is detected. However, there are other mechanisms that are activated during specific cellular stages, such as DNA mismatch repair system (MMR).

2. DNA Mismatch Repair Proteins

DNA MMR is an evolutionarily conserved process that corrects base mismatches generated during DNA replication that have escaped the proofreading process [9]. This is accomplished through the interaction of protein heterodimers with the DNA sequence containing the mismatch. Other dimers (e.g., MutL or MutH) are then recruited and interact with the DNA to initiate the repair signaling. When DNA structural integrity is compromised, specific genes and proteins are activated. One of such groups is

the MutS family of proteins, integrated by MSH2, MSH3, and MSH6. These proteins are highly conserved between species and were originally found in *Escherichia coli* [10]; they have received great attention in recent years due to their relationship with several degenerative and pathologic diseases in humans. MSH proteins recognize errors in the genome sequence during replication, preventing the duplication of the damaged strand and repairing single strand breaks [11, 12]. MSH2 either binds to MSH6 in the presence of base mispairing and other mismatches forming the MutS α heterodimer (MSH2-MSH6), or it binds to MSH3 in the presence of base deletions, generating the MutS β heterodimer (MSH2-MSH3) [13, 14] (Figures 1(a) and 1(b)). The MutS α heterodimer then binds to the altered region and recruits the MutL family proteins, such as MLH1 and PMS2 (as a MutL α heterodimer). MLH1 and PMS2 in turn engage the enzymes needed for the DNA mismatch repair (Figure 1(c)). The DNA-MMR complex initiates the signaling process to replace the DNA altered region through the action of DNA polymerase δ and DNA ligase I [15, 16] (Figure 1(d)). The mechanism that recruits MMR proteins is ATP dependent [17].

Additionally, the activity of the two MutS dimers at the DNA mismatch site is dependent on interactions with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [18, 19], which is an important cofactor that participates in both DNA replication and repair mechanisms. PCNA interacts with the MutS α dimer through its MSH6 domain and the MutS β dimer binds with it at a region near the domain of MSH3 [20] (Figure 1(C)). When the basic human MMR system was reconstituted, the components purified were recombinant MutS α or MutS β , MutL α , Exonuclease I (EXO1), PCNA, replication factor C (RFC, which loads PCNA onto DNA), the single-strand binding factor replication protein A (RPA), polymerase δ , and DNA ligase I [21, 22]. In this system, the 5'-to-3' mismatch-directed strand excision required only MutS α , EXO1, and RPA, whereas processing of substrates carrying a 3' nick required also MutL α , PCNA, and RFC [23].

3. Experimental Models Related with DNA MMR Deficiency

MSH2 deficiency has been associated with frame-shift mutations known as microsatellite regions. These are specific DNA regions of tandem repeated units from one to six nucleotides. Microsatellites are found in centromeres, telomeres, promoters, and transcribed genes segments, causing DNA instability by inserting their repeated units and expanding the genomic sequence. This change in the original DNA sequence due to microsatellites can induce mutations within the genetic sequence, when mismatch bases are not corrected and copied to during DNA replication. Hence, microsatellite instability (MSI) has been widely used as a biochemical marker in clinical and laboratory tests for aging-related diseases and malignancies [24, 25].

MMR pathways have been studied in recent years because of their medical importance in several degenerative and pathological diseases in humans [26]. A positive correlation

between MMR proteins deficiency, MSI and the malfunction of different processes, and regulatory mechanisms in cells has been established [27, 28].

4. DNA MMR System and Cell Cycle Arrest Process

Post-replicative DNA-MMR systems are critical during the response against diverse damaging stimuli that affect DNA fidelity, such as oxidative stress, xenobiotics, radiation, and so forth [28]. It has been corroborated that MSH2 participates in cell cycle arrest and apoptosis by different pathways, depending on the extent of DNA damage. Experiments conducted in *msh2*^{-/-} nontumor human lymphoblastoid cell lines have shown that the MMR system promotes G2/M arrest after UV-B induced DNA damage, and that a deficiency in MSH2 leads to a decrease in the induction of G2/M cell cycle checkpoint following this type of radiation. MSH2 proficient human lymphoblastoid cell lines cells also increase cell cycle checkpoint proteins levels such as CHK1, CDC25C, and CDC2, when compared with MSH2-deficient cells, after UV-B radiation treatment [29]. These proteins, when phosphorylated at specific amino acid residues (Ser345, Ser216, Tyr15, and Thr14), regulate cell cycle control and inhibit cells from dividing until the DNA alterations are corrected, in accordance with MMR system's capacity to induce arrest in proliferative cells [30, 31]. In another study, it was shown that MSH2 deficient nonmalignant mouse fibroblasts were partially resistant to UV-B-induced apoptosis and showed reduced S-Phase accumulation; when *msh2* was modified by a point mutation that affected its expression, it was unable to participate in UV-B-induced apoptosis [32].

It has also been shown that UV-B induced DNA damage increases MSH6 protein levels in a p53 nondependent pathway. But in *msh6*^{-/-} primary mouse embryonic fibroblasts cells repair response to this type of damage was found to be significantly less sensitive to UV-B radiation cytotoxic effects as explained by a reduction in MSH6 protein levels. Therefore, MSH6 deficient cells were significantly less sensitive to the UV-B radiation cytotoxic effects and underwent significantly less apoptosis following irradiation than MSH6 proficient cells, thus indicating that UV-B-induced apoptosis was partially dependent on MSH6 levels [33]. These experiments suggest that MSH2 modulates both cell cycle regulation and apoptosis through independent and uncoupled mechanisms.

MMR proteins are also able to repair DNA through homologous recombination, a mechanism that repairs double-strand breaks using perfectly matched nucleotide sequences between two DNA strands. Both genomic and mitochondrial DNA sequences are exchanged through breaking and rejoining by specific protein complexes. The efficiency of homologous recombination depends on the length of uninterrupted sequence identity, as well as on the percentage of sequence identity within the region of homology [34]. These experiments suggest that MSH2 modulates both cell cycle regulation and apoptosis, through independent and uncoupled mechanisms.

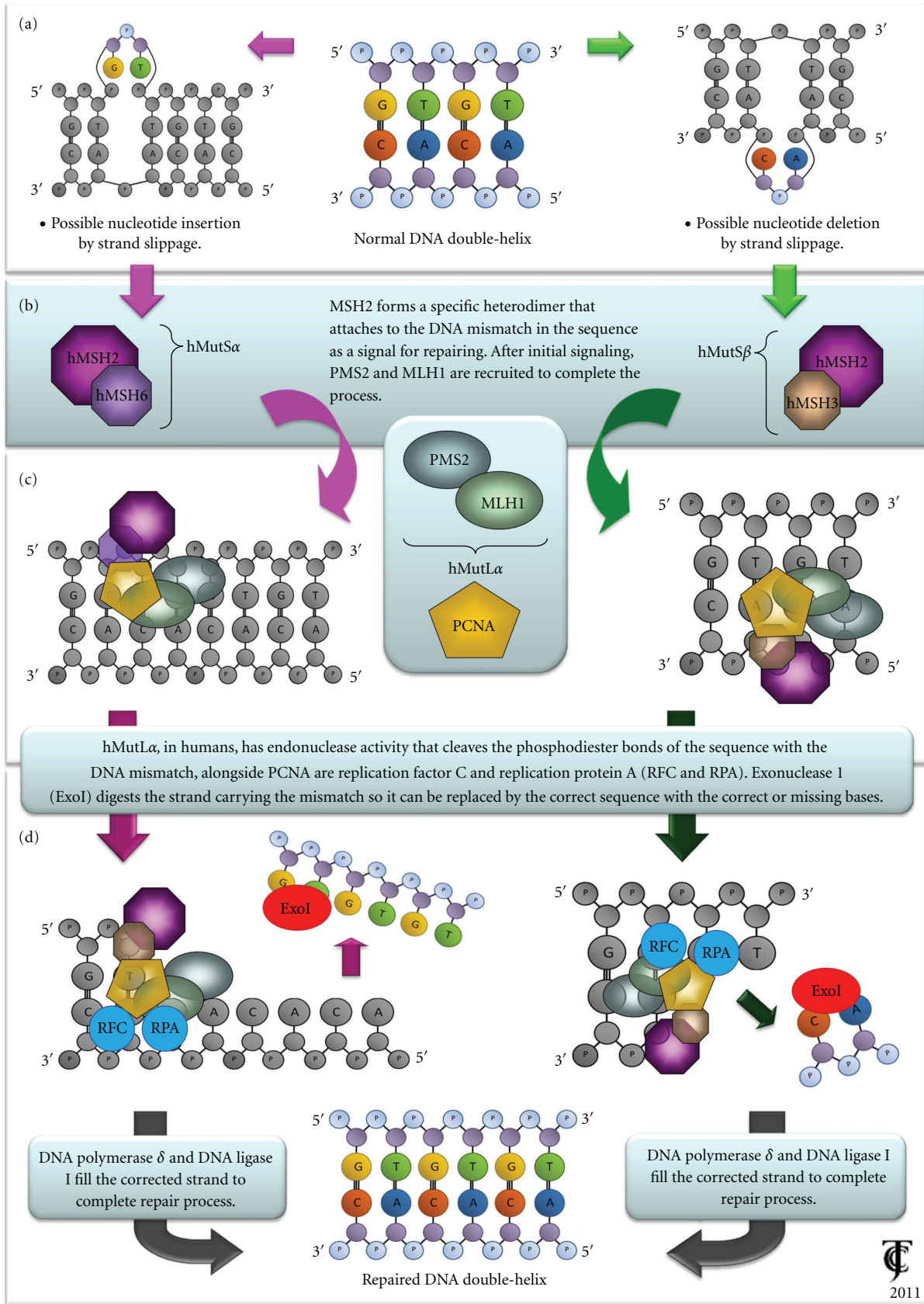


FIGURE 1: General DNA repair mechanisms mediated through MMR proteins MSH2, MSH6, and MSH3. Depending on the specific type of lesion in the genomic sequence, MSH protein family can initiate repair signaling pathways for maintaining genome integrity and fidelity.

5. MMR Deficiency Associated with Aging and Senescence

When deficient DNA repair pathways, such as MMR system, do not detect altered DNA sequences, cell signaling pathways, as well as cell homeostasis, become unstable because DNA fidelity is compromised. Recent data have established a relationship between damaging stimuli, DNA lesions, and aging, with the absence or decrease in DNA repair systems [35]. It has been determined that MSH2 and MLH1 respond to oxidative DNA damage induced by UV-A radiation [36], and that MSH2 malfunction promotes degenerative conditions that increase with age and affect cell cycle and viability.

MMR efficiency has been studied in the detection of DNA-induced damage through cytotoxic compounds, such as cisplatin, used for chemotherapy in cancer patients, and it has been suggested that MSH2, besides its repair function, is able to induce programmed cell death, reducing abnormal cells in organisms. MSH2's role in signaling DNA damage-induced apoptosis has been recently demonstrated by Negreanu and Salsbury, along with confirmation that MMR defects alone can trigger tumorigenesis [37]. Stage II-III colorectal cancer patients, whose tumors retain DNA MMR activity, have shown benefits and better prognosis when 5-fluorouracil, a cytotoxic compound that induces DNA damage, is used; but patients with tumors that lost MMR activity do not [38]. In another study, MSH2 activity was tested on *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* *msh2*-mutant strains, and it was shown that MMR system can also repair DNA lesions caused by oxidative stress [39]. Mutant NER-deficient XP-A fibroblasts were shown to have an increase in CG > TT transitions in methylated CpG islands as a result of prolonged oxidative stress, compared with control fibroblasts with an active NER system [40]. Estes and collaborators [41] using a *Caenorhabditis elegans* *msh2* knock-out model demonstrated that both fertility and survival rate were severely compromised; the life expectancy of these mutants also decreased significantly due to irreversible physiological damage. In another animal model, using CD-1 female mice, physiological stress related to breeding, methylation levels increased in *msh2* promoter region associated to age, ending ultimately in the accumulation of DNA damage markers due to MSH2 reduced expression [42]. All the previous evidence supports the idea that proficiency of MMR-system protects the cells from the early tumor occurrence.

Besides apoptosis, premature senescence has been proposed as another way in which cellular homeostasis is maintained. Damaged cells that undergo senescence do not proliferate and therefore the cellular damage can be stopped. However, studies that correlate MMR systems with the phenomenon of senescence are few. Some experiments conducted in young and senescent colonic and human embryonic lung fibroblast cell lines (CCD-18Co and IMR90, respectively) showed that MMR activity was significantly reduced in the senescent phenotype. In particular, MSH2 and MSH6 proteins were markedly downregulated in senescent cells. However, purified MSH2 and MSH6 extracts that were added to senescent cells led to the restoration of MMR

activity. Semiquantitative RT-PCR analyses also showed that MSH2 mRNA levels were reduced in senescent cells from the same fibroblast cell lines mentioned before [43]. This evidence suggests that MMR system activity decreases during the senescent state, which could be interesting while studying other processes related to the aging process [44].

6. Telomere Shortening and Senescence Related with MMR Deficiency

Classic replicative senescence involves cell cycle arrest due to telomere shortening. Telomeres are protective structures at the ends of chromosomes that consist of tandem TTAGGG repeats bound to a protein complex known as shelterin [45]. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) deficient in *msh2* expression showed a significant increase in chromosome aneuploidy, centrosome amplification, and defective mitotic spindle organization and unequal chromosome segregation [46]. Studies conducted in several models demonstrate that MMR system can regulate telomere maintenance and, therefore, alter cell senescence. In *msh2* knock-out mouse tissues and primary MEFs there was no apparent change in telomerase activity, telomere length, or recombination at telomeres. However, *msh2* knockout MEFs presented chromosome ending without detectable telomeric DNA which correlated with an increase in chromosome end-to-end fusions [47]. Interestingly, it was reported that mutations in MMR proteins in yeast, particularly MSH2, rescued telomerase-deficient strains survival, apparently by allowing telomere stabilization through an independent telomerase mechanism known as "alternating lengthening of telomeres" (ALT), which uses recombination-based pathways to maintain telomere length [48]. However, when this was studied in a mammalian *in vivo* model, by generating double mutant mice for telomerase and PMS2 (a MutL homolog), the previously proposed role for MMR genes in controlling telomere recombination and telomere length was not observed [49]. Similar results were reported in experiments with human colorectal, endometrial, and ovarian tumors, with or without MMR activity, indicating that in mammals the ALT mechanism is not essential during telomere maintenance [47, 49]; nevertheless MMR may be important in detecting DNA damage induced by radiation, cytotoxic compounds, and oxidative stress, and depending on the damage extent, might be linked to cellular fate determination, leading either to apoptosis or to senescence, and therefore is important during tumorigenesis [50].

7. Pathologies Related to MMR System Failure in Humans

As discussed above, the MMR system is responsible for preserving DNA integrity and stability upon exposure to different damaging stimuli. If the MMR system fails, cell structure and functions will probably be affected, resulting in immortalization, malignant transformation, tumorigenesis, and/or degenerative diseases. One of such diseases is the Muir-Torre syndrome, a rare autosomal dominant disorder,

which is characterized by the predisposition to both sebaceous neoplasms and internal malignancies. This condition is caused by an inherited germ-line mutation in one allele of MMR genes *msh2* and *mlh1*, leading to MMR deficiency. This condition causes MSI which in turn leads to DNA mutations [51–53].

Approximately 15% of colorectal cancers display MSI in one or more MMR genes: *mlh1*, *msh2*, *msh6*, or *pms2* [54]. Lynch syndrome, also called non-polyposis colorectal cancer and the most common form of inherited colorectal cancer, is a good example of a malignant disease associated to MSI. It develops in 60% of the patients with MMR gene mutations, commonly before 50 years of age [51, 55]. Muir-Torre, as well as Lynch syndrome, is a condition caused by decreased DNA-MMR activity. Both diseases are characterized by high levels of MSI, supporting the fact that microsatellites are considered excellent markers to detect failures in DNA integrity maintenance [56].

The Ontario Familial Colorectal Cancer Registry is a population-based study of Lynch syndrome occurrence in relation to age, sex, and mutated genes [57]. This study indicated that the cumulative risk for colorectal cancer rose in patients of 70 years old or more, compared with the risk found in patients between 30 to 50 years old. This increase of cumulative risk was correlated with an increase in MSH2 and MLH1 mutations in 70 years patients. The male patients in this particular study presented more mutations in the *mlh1* gene compared with the female patients in all 3 age-dependent groups. However, female patients showed increased mutation levels in the *msh2* gene compared with the male patients, once again in all 3 age-dependent groups. These observations suggest that when genes responsible for maintaining DNA integrity, such as *msh2* and *mlh1*, are mutated, and their capacity to repair DNA decreases, the accumulation of mutations and strand breaks may lead to aging and disease. In other words, when the organisms fail to maintain their homeostasis, they become susceptible to aging and degenerative diseases. Although some of these mutations may be inherited, exposure to toxic and damaging insults like ROS, chemicals, and radiation can abruptly alter or accelerate their formation.

Cell-microorganism interactions can further generate failure of MMR system activity. One example is the mucosa-associated bacteria that significantly contribute to the colonic environment in humans. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) carry the *eae* gene, which encodes the bacterial adhesion protein intimin; this protein enables bacteria to attach to the intestinal epithelium by using a type III secretion system which translocates effector proteins into host cells. These bacteria can influence molecular pathways involved in colorectal tumorigenesis. The ability of EPEC to downregulate DNA-MMR proteins such as MSH2 and MLH1 demonstrates that environmental factors can increase tumorigenesis in colonic epithelial cells [58]. Other tumorigenic processes resulting from MMR system failure are melanoma and breast cancer. MSI and mutations in MMR genes contribute significantly to both conditions in human patients, confirming MMR potential role in carcinoma susceptibility [59, 60]. Another gene associated with MMR

defects that has been extensively studied is the tumor-suppressor gene *BRCA1* [61] related to breast cancer. *BRCA1* encodes a protein that repairs damaged DNA and initiates the apoptotic process. Errors in *BRCA1* expression result in unrepaired DNA [62]. Such mutations cause uncontrollable cell growth resulting in tumor formation. In experimental trials, the role of the *BRCA1* protein in modulating a 6-thioguanine (6-TG) induced MMR damage response was studied, using an isogenic human breast cancer cell line model, including a *BRCA1* mutated cell line (HCC1937). The results showed that the tumor cells were more resistant to chemotherapeutic drugs, like 6-thioguanine, as manifested by a reduced G2/M arrest and decreased apoptosis [63]. In this context, *BRCA1*-mutant cells are more resistant to damage by this drug, than *BRCA1*-positive cells. This might suggest a probable mechanism by which the MMR system may regulate cell cycle and apoptosis, in correlation with the functionality of tumor suppressing genes like *BRCA1* [64].

8. The Use of MMR to Study Aging: The Bats Example

As mentioned before, the accumulation of DNA damage is known to induce alterations in the cell's mechanisms and structure that might lead to aging; and since DNA-MMR system is highly conserved between species, our group decided to determine the importance of this system during the aging process in a different animal model. Bats (class: Mammalia, order: Chiroptera) are an interesting model due to their high longevity and particular resistance to adverse environmental factors [65], and therefore, the levels of MMR proteins MSH2 and MLH1, as well as microsatellite markers were quantified, in liver, lung, and brain of young, adult, and old bats, both female and male. Individuals of two different wild bats species were used: *Myotis velifer* and *Desmodus rotundus*. Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase were also analyzed to determine if the antioxidant protection negatively correlated with DNA damage [66]. The first species, the cave *Myotis*, is an insectivorous bat that has an average lifespan of 8 to 12 years (11.3 years in the field) based on mark-recapture studies and an average adult weight of 10.1 g [67] which migrates to higher altitudes to mate and hibernate [68, 69]. On the other hand, the vampire bat *D. rotundus* has an average lifespan of 12 to 20 years [70] and an average adult weight of 32.2 g [67]. Vampire bats feed on the blood of stock animals and do not undergo hibernation [71, 72]. The study conducted determined that *M. velifer* (the short lived species) presented decreased levels of MSH2 and MLH1 with increased MSI (Figure 2(a)) and reduced antioxidant activity as these insectivorous bats became older. However, in the case of *D. rotundus* (the long lived species), there was a reduced MSI in the vampire bats from adult to old age, compared with the young control bats, which correlated with reduced levels of MSH2 and MLH1 (Figure 2(b)) along with improved antioxidant activities in the old bats that matched the activities seen in the adult groups from the other species [66]. An important feature of this study was the demonstration that the analysis of MMR deficiency and

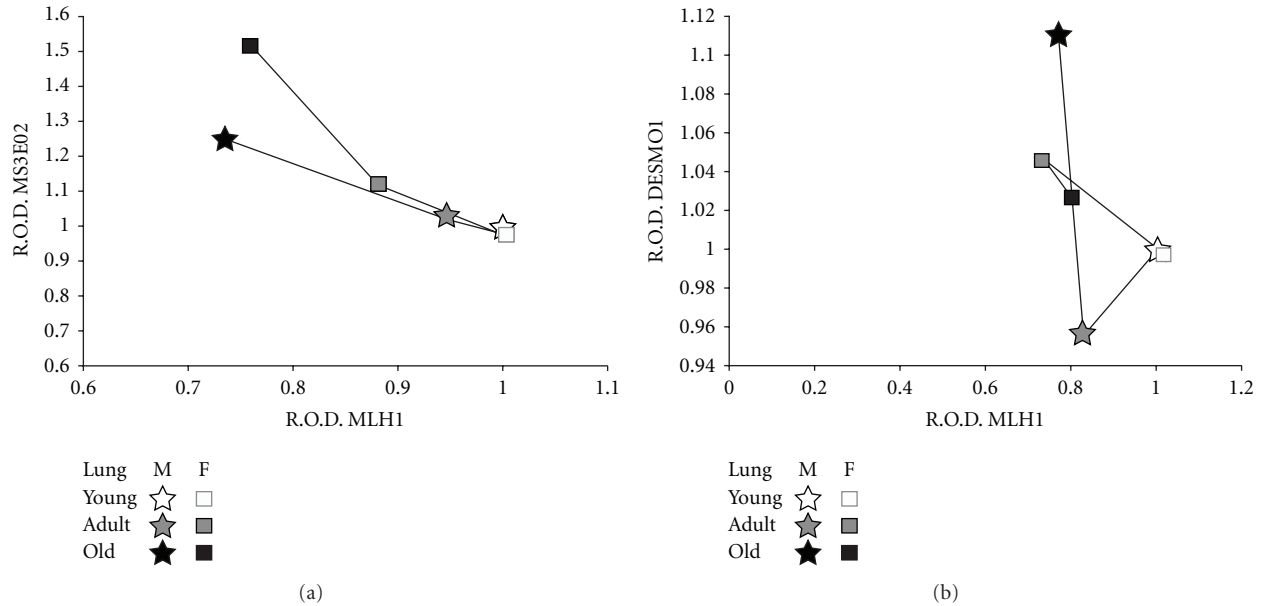


FIGURE 2: Comparisons between MLH1 levels and microsatellite instability. The figure shows the correlations between MSI and MLH1 protein levels, found in the female (F) and male (M) bat lung samples. The correlations were performed considering the relative optical densities (RODs) obtained from the densitometries of the PCR products from DNA microsatellite sequences (MS3EO2 for *M. velifer* and DESMO1 for *D. rotundus*), and the MLH1 protein levels were determined by Western Blot analysis in both species. Young bats were given the arbitrary value of one, in order to compare them with the other age groups. Each age group consisted of 5 invidious ($n = 5$) either male or female bats. One-way ANOVA tests, followed by Tukey-Kramer variance analyses, were used to compare among groups, by sex and age. A 0.05 level of probability was used as a minimum criterion of significance in all analyses. The figures correspond to: (a) *Myotis velifer* (MS3EO2 versus MLH1) and (b) *Desmodus rotundus* (DESMO1 versus MLH1).

the variations of MSI are an excellent model that can be used in aging studies to correlate Harman's theory of aging with processes related to DNA damage.

9. Final Considerations

Although most of the studies related to the MMR deficiency and genomic alterations are associated with carcinogenic processes, there is a high prospective in using these tools for aging and senescence studies. Studying MMR impairment could also be used to correlate cancer and aging. It is known that cancer predisposition is more frequent when DNA repair is deteriorated in the elderly, which correlates with DNA damage accumulation (e.g., MSI) throughout lifetime, and it might explain the origin of these diseases as proposed by Harman [1, 73]. However, mutations in MMR proteins have been related with other malignancies found not only in elderly patients, but also in children, such as haematological malignancies, brain tumors, Lynch syndrome, and neurofibromatosis [74, 75]. Therefore it would be important to determine which of these malignant conditions are exclusively age-dependent processes or solely DNA damage/mutation-dependent. Another issue to consider is the interaction with other proteins complexes that could assist in the MMR system. It was recently determined in *msh2*-knockout mouse embryonic fibroblasts, HEK, and HeLa cell lines that MSH2 is also in charge of the recruitment of the ATR protein, which is in charge, along with ATM protein, of the DNA damage response signaling, frequently

associated with cell death by apoptosis. According to this study ATR is recruited by two different pathways: one of which is mediated by RPA (replication protein A) and relays a signal to the Chk1 protein, whereas the other pathway depends on MSH2 and is responsible for Chk2 activation [76]. Further investigations could be benefited from experiments based on correlations between MMR deficiencies, DNA damage markers in new models such as bats, since they have prolonged longevities that might increase our understanding of MSH2 pathways, revealing new processes that regulate cellular homeostasis by maintaining DNA integrity.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr. Banalata Sen from the National Institute of Environmental Health Sciences and Dr. Carmen Ríos from the Barshop Institute for Aging and Longevity Studies-UTHSCSA for their critical reading and edition of the paper. Mr. Joel Kipi Turok for English editing; Dr. H. González-Márquez, UAM-I, for his help with Figure 1. This work was supported by CONACyT Grant no. CB-2006-1-59659. J. C. Conde-Pérezprina is a CONACyT scholarship holder.

References

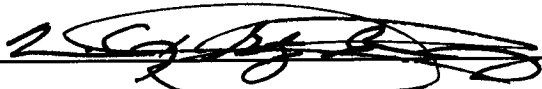
- [1] D. Harman, "The free radical theory of aging," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 5, no. 5, pp. 557–561, 2003.

- [2] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 2004.
- [3] A. M. Florea, E. N. Yamoah, and E. Dopp, "Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction," *Environmental Health Perspectives*, vol. 113, no. 6, pp. 659–664, 2005.
- [4] S. E. Boley, V. A. Wong, J. E. French, and L. Recio, "p53 heterozygosity alters the mRNA expression of p53 target genes in the bone marrow in response to inhaled benzene," *Toxicological Sciences*, vol. 66, no. 2, pp. 209–215, 2002.
- [5] R. Barouki, "Ageing free radicals and cellular stress," *Medicine/Sciences*, vol. 22, no. 3, pp. 266–272, 2006.
- [6] E. Moustacchi, "DNA damage and repair: consequences on dose-responses," *Mutation Research*, vol. 464, no. 1, pp. 35–40, 2000.
- [7] C. Bernstein, H. Bernstein, C. M. Payne, and H. Garewal, "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis," *Mutation Research*, vol. 511, no. 2, pp. 145–178, 2002.
- [8] T. Nakano, A. Katafuchi, H. Terato, T. Suzuki, B. Van Houten, and H. Ide, "Activity of nucleotide excision repair enzymes for oxanine cross-link lesions," *Nucleic Acids Symposium Series*, no. 49, pp. 293–294, 2005.
- [9] T. A. Kunkel and D. A. Erie, "DNA mismatch repair," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 74, pp. 681–710, 2005.
- [10] J. Jiricny, "MutL α : at the cutting edge of mismatch repair," *Cell*, vol. 126, no. 2, pp. 239–241, 2006.
- [11] D. Kültz, "Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response," *Annual Review of Physiology*, vol. 67, pp. 225–257, 2005.
- [12] D. N. Mullins, E. L. Crawford, S. A. Khuder, D. A. Hernandez, Y. Yoon, and J. C. Willey, "CEBPG transcription factor correlates with antioxidant and DNA repair genes in normal bronchial epithelial cells but not in individuals with bronchogenic carcinoma," *BMC Cancer*, vol. 5, article 141, 2005.
- [13] P. Peltomäki, "Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer," *Human Molecular Genetics*, vol. 10, no. 7, pp. 735–740, 2001.
- [14] S. Santucci-Darmanin and V. Paquis-Flucklinger, "Homologs of MutS and MutL during mammalian meiosis," *Medicine Sciences*, vol. 19, no. 1, pp. 85–91, 2003.
- [15] Q. H. Phung, D. B. Winter, R. Alrefai, and P. J. Gearhart, "Cutting edge: hypermutation in Ig V genes from mice deficient in the MLH1 mismatch repair protein," *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 6, pp. 3121–3124, 1999.
- [16] H. Saribasak, D. Rajagopal, R. W. Maul, and P. J. Gearhart, "Hijacked DNA repair proteins and unchained DNA polymerases," *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, vol. 364, no. 1517, pp. 605–611, 2009.
- [17] H. Geng, M. Sakato, V. DeRocco et al., "Biochemical analysis of the human mismatch repair proteins hMutS α MSH2^{G674A}-MSH6 and MSH2-MSH6^{T1219D}," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 13, pp. 9777–9791, 2012.
- [18] Z. Hong, J. Jiang, K. Hashiguchi, M. Hoshi, L. Lan, and A. Yasui, "Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells," *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 19, pp. 3146–3154, 2008.
- [19] S. V. Mudrak, C. Welz-Voegelé, and S. Jinks-Robertson, "The polymerase η translesion synthesis DNA polymerase acts independently of the mismatch repair system to limit mutagenesis caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine in yeast," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 29, no. 19, pp. 5316–5326, 2009.
- [20] F. J. López de Saro, "Regulation of interactions with sliding clamps during DNA replication and repair," *Current Genomics*, vol. 10, no. 3, pp. 206–215, 2009.
- [21] Y. Zhang, F. Yuan, S. R. Presnell et al., "Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system," *Cell*, vol. 122, no. 5, pp. 693–705, 2005.
- [22] N. Constantin, L. Dzantiev, F. A. Kadyrov, and P. Modrich, "Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 39752–39761, 2005.
- [23] L. Dzantiev, N. Constantin, J. Genschel, R. R. Iyer, P. M. Burgers, and P. Modrich, "A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision," *Molecular Cell*, vol. 15, no. 1, pp. 31–41, 2004.
- [24] Y. Lin and J. H. Wilson, "Diverse effects of individual mismatch repair components on transcription-induced CAG repeat instability in human cells," *DNA Repair*, vol. 8, no. 8, pp. 878–885, 2009.
- [25] H. Alazzouzi, E. Domingo, S. González et al., "Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis," *Human Molecular Genetics*, vol. 14, no. 2, pp. 235–239, 2005.
- [26] P. Modrich and R. Lahue, "Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 65, pp. 101–133, 1996.
- [27] A. D. Auerbach and P. C. Verlander, "Disorders of DNA replication and repair," *Current Opinion in Pediatrics*, vol. 9, no. 6, pp. 600–616, 1997.
- [28] Z. Yang, R. Lau, J. L. Marcadier, D. Chitayat, and C. E. Pearson, "Replication inhibitors modulate instability of an expanded trinucleotide repeat at the myotonic dystrophy type 1 disease locus in human cells," *American Journal of Human Genetics*, vol. 73, no. 5, pp. 1092–1105, 2003.
- [29] K. A. Narine, K. E. Felton, A. A. Parker, V. A. Tron, and S. E. Andrew, "Non-tumor cells from an MSH2-null individual show altered cell cycle effects post-UVB," *Oncology Reports*, vol. 18, no. 6, pp. 1403–1411, 2007.
- [30] C. S. Sørensen, L. T. Hansen, J. Dziegielewski et al., "The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair," *Nature Cell Biology*, vol. 7, no. 2, pp. 195–201, 2005.
- [31] V. Leung-Pineda, C. E. Ryan, and H. Piwnicka-Worms, "Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26, no. 20, pp. 7529–7538, 2006.
- [32] M. Seifert, S. J. Scherer, W. Edelmann et al., "The DNA-mismatch repair enzyme hMSH2 modulates UV-B-induced cell cycle arrest and apoptosis in melanoma cells," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 128, no. 1, pp. 203–213, 2008.
- [33] L. C. Young, K. J. Thulien, M. R. Campbell, V. A. Tron, and S. E. Andrew, "DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an in vivo study," *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 10, pp. 1821–1827, 2004.
- [34] M. Kappeler, E. Kranz, K. Woolcock, O. Georgiev, and W. Schaffner, "Drosophila bloom helicase maintains genome integrity by inhibiting recombination between divergent DNA sequences," *Nucleic Acids Research*, vol. 36, no. 21, pp. 6907–6917, 2008.
- [35] A. M. Skinner and M. S. Turker, "Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging," *Science of Aging Knowledge Environment*, vol. 2005, no. 9, article re3, 2005.

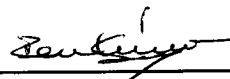
- [36] P. Pitsikas, D. Lee, and A. J. Rainbow, "Reduced host cell reactivation of oxidative DNA damage in human cells deficient in the mismatch repair gene hMSH2," *Mutagenesis*, vol. 22, no. 3, pp. 235–243, 2007.
- [37] L. Negureanu and F. R. Salsbury Jr., "The molecular origin of the MMR-dependent apoptosis pathway from dynamics analysis of MutS α -DNA complexes," *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, vol. 30, no. 3, pp. 347–361, 2012.
- [38] M. Iwaizumi, S. Tseng-Rogenski, and J. M. Carethers, "DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells," *Cancer Biology and Therapy*, vol. 12, no. 8, pp. 756–764, 2011.
- [39] P. C. Campos, V. G. Silva, C. Furtado et al., "Trypanosoma cruzi MSH2: functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 176, no. 1, pp. 8–16, 2011.
- [40] D. H. Lee, T. R. O'Connor, and G. P. Pfeifer, "Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG \rightarrow TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 16, pp. 3566–3573, 2002.
- [41] S. Estes, P. C. Phillips, D. R. Denver, W. K. Thomas, and M. Lynch, "Mutation accumulation in populations of varying size: the distribution of mutational effects for fitness correlates in caenorhabditis elegans," *Genetics*, vol. 166, no. 3, pp. 1269–1279, 2004.
- [42] J. C. Conde-Pérezprina, A. Luna-López, N. E. López-Diazguerrero, P. Damián-Matsumura, A. Zentella, and M. Königsberg, "Msh2 promoter region hypermethylation as a marker of aging-related deterioration in old retired female breeder mice," *Biogerontology*, vol. 9, no. 5, pp. 325–334, 2008.
- [43] I. Y. Chang, M. Jin, P. Y. Sang et al., "Senescence-dependent MutS α dysfunction attenuates mismatch repair," *Molecular Cancer Research*, vol. 6, no. 6, pp. 978–989, 2008.
- [44] L. C. Young, A. C. Peters, T. Maeda et al., "DNA mismatch repair protein msh6 is required for optimal levels of ultraviolet-b-induced apoptosis in primary mouse fibroblasts," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 121, no. 4, pp. 876–880, 2003.
- [45] S. W. L. Chan and E. H. Blackburn, "New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin," *Oncogene*, vol. 21, no. 4, pp. 553–563, 2002.
- [46] M. R. Campbell, Y. Wang, S. E. Andrew, and Y. Liu, "Msh2 deficiency leads to chromosomal abnormalities, centrosome amplification, and telomere capping defect," *Oncogene*, vol. 25, no. 17, pp. 2531–2536, 2006.
- [47] P. Martinez, I. Siegl-Cachedenier, J. M. Flores, and M. A. Blasco, "MSH2 deficiency abolishes the anticancer and pro-aging activity of short telomeres," *Aging Cell*, vol. 8, no. 1, pp. 2–17, 2009.
- [48] A. Rizki and V. Lundblad, "Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation," *Nature*, vol. 411, no. 6838, pp. 713–716, 2001.
- [49] I. Siegl-Cachedenier, P. Muñoz, J. M. Flores, P. Klatt, and M. A. Blasco, "Deficient mismatch repair improves organismal fitness and survival of mice with dysfunctional telomeres," *Genes and Development*, vol. 21, no. 17, pp. 2234–2247, 2007.
- [50] I. Ibanez de Caceres, N. Frolova, R. J. Varkonyi et al., "Telomerase is frequently activated in tumors with microsatellite instability," *Cancer Biology and Therapy*, vol. 3, no. 3, pp. 289–292, 2004.
- [51] S. Perera, L. Ramyar, A. Mitri et al., "A novel complex mutation in MSH2 contributes to both Muir-Torre and Lynch Syndrome," *Journal of Human Genetics*, vol. 55, no. 1, pp. 37–41, 2010.
- [52] A. Morales-Burgos, J. L. Sánchez, L. D. Figueroa et al., "MSH2 and MLH1 Protein expression in muir torre syndrome-related and sporadic sebaceous neoplasms," *Puerto Rico Health Sciences Journal*, vol. 27, no. 4, pp. 322–327, 2008.
- [53] D. Torre, "Multiple sebaceous tumors," *Archives of Dermatology*, vol. 98, no. 5, pp. 549–551, 1968.
- [54] E. Vilar and S. B. Gruber, "Microsatellite instability in colorectal cancer: the stable evidence," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 7, no. 3, pp. 153–162, 2010.
- [55] F. C. C. da Silva, M. D. Valentin, F. D. O. Ferreira, D. M. Carraro, and B. M. Rossi, "Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review," *Sao Paulo Medical Journal*, vol. 127, no. 1, pp. 46–51, 2009.
- [56] P. M. Lynch, "The hMSH2 and hMLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer," *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 18, no. 4, pp. 611–624, 2009.
- [57] Y. H. Choi, M. Cotterchio, G. McKeown-Eyssen et al., "Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario," *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, vol. 7, no. 1, article 14, 2009.
- [58] O. D. K. Maddocks, A. J. Short, M. S. Donnenberg, S. Bader, and D. J. Harrison, "Attaching and effacing Escherichia coli downregulate DNA mismatch repair protein in vitro and are associated with colorectal adenocarcinomas in humans," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 5, Article ID e5517, 2009.
- [59] G. Ponti, L. Losi, G. Pellacani et al., "Malignant melanoma in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer," *British Journal of Dermatology*, vol. 159, no. 1, pp. 162–168, 2008.
- [60] S. A. Martin, A. McCarthy, L. J. Barber et al., "Methotrexate induces oxidative DNA damage and is selectively lethal to tumour cells with defects in the DNA mismatch repair gene MSH2," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 1, no. 6-7, pp. 323–337, 2009.
- [61] F. Fostira, G. Thodi, I. Konstantopoulou, R. Sandaltzopoulos, and D. Yannoukakos, "Hereditary cancer syndromes," *Journal of B.U.ON.*, vol. 12, no. 1, pp. S13–S22, 2007.
- [62] A. Agarwal, S. Gupta, and R. K. Sharma, "Role of oxidative stress in female reproduction," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 3, article 28, 2005.
- [63] K. Yamane, J. E. Schupp, and T. J. Kinsella, "BRCA1 activates a G2-M cell cycle checkpoint following 6-thioguanine-induced DNA mismatch damage," *Cancer Research*, vol. 67, no. 13, pp. 6286–6292, 2007.
- [64] R. A. Jensen, M. E. Thompson, T. L. Jetton et al., "BRCA1 is secreted and exhibits properties of a granin," *Nature Genetics*, vol. 12, no. 3, pp. 303–308, 1996.
- [65] G. Neuweiler, *The Biology of Bats*, Oxford University Press, New York, NY, USA, 2000.
- [66] J. C. Conde-Pérezprina, A. Luna-López, V. Y. González-Puertos, T. Zenteno-Savín, M. A. León-Galván, and M. Königsberg, "DNA MMR systems, microsatellite instability and antioxidant activity variations in two species of wild bats: myotis velifer and Desmodus rotundus, as possible factors associated with longevity," *Age*. In press.
- [67] G. S. Wilkinson and J. M. South, "Life history, ecology and longevity in bats," *Aging Cell*, vol. 1, no. 2, pp. 124–131, 2002.
- [68] J. H. Fitch, K. A. Shump, and A. U. Shump, "Myotis velifer," *Mammalian Species*, vol. 149, pp. 1–5, 1981.

- [69] K. D. Jürgens and J. Prothero, "Scaling of maximal lifespan in bats," *Comparative Biochemistry and Physiology A*, vol. 88, no. 2, pp. 361–367, 1987.
- [70] R. D. Lord, F. Muradali, and L. Lazaro, "Age composition of vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Northern Argentina and Southern Brazil," *Journal of Mammalogy*, vol. 57, pp. 573–575, 1976.
- [71] A. Balmori, "El estudio de los quirópteros a través de sus emisiones ultrasónicas," *Galemys Boletín SECEM*, vol. 10, pp. 12–19, 1998.
- [72] A. K. Brunet-Rossinni and S. N. Austad, "Ageing studies on bats: a review," *Biogerontology*, vol. 5, no. 4, pp. 211–222, 2004.
- [73] T. Arai, M. Sawabe, T. Hosoi, and N. Tanaka, "Role of DNA repair systems in malignant tumor development in the elderly," *Geriatrics and Gerontology International*, vol. 8, no. 2, pp. 65–72, 2008.
- [74] K. Wimmer and J. Etzler, "Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg?" *Human Genetics*, vol. 124, no. 2, pp. 105–122, 2008.
- [75] S. Krüger, M. Kinzel, C. Walldorf et al., "Homozygous PMS2 germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1," *European Journal of Human Genetics*, vol. 16, no. 1, pp. 62–72, 2008.
- [76] N. Pabla, Z. Ma, M. A. McIlhatton, R. Fishel, and Z. Dong, "hMSH2 recruits ATR to DNA damage sites for activation during DNA damage-induced apoptosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 12, pp. 10411–10418, 2011.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "ANÁLISIS DE LAS DIFERENCIAS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DE ADN Y DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN DOS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS COMO FACTORES DETERMINANTES DE LA LONGEVIDAD", con fecha del 5 de diciembre del 2012.



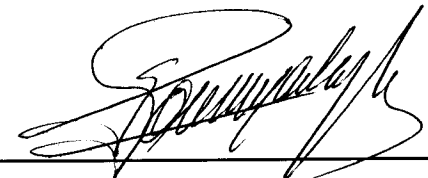
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Presidente



Dra. Tania Zenteno Savín
Secretaria



Dr. Edmundo Bonilla González
Vocal



Dr. Humberto González Márquez
Vocal