



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Estrés oxidante en dos especies de murciélagos vampiros: *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* como modelos para el estudio del envejecimiento

Que para obtener el grado en
Maestro en biología experimental

Presenta
Biól. Rafael Toledo Pérez

Comité Tutorial:

Co-Directora:	Dra. Mina Königsberg Fainstein
Co-Director:	Dr. Miguel Ángel León Galván
Asesor Externo:	Dr. Armando Luna López

CDMX

Noviembre 2017

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

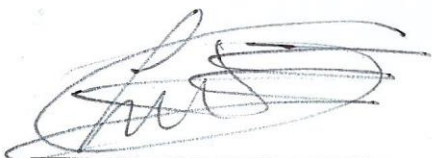
Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 426286

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **Estrés oxidante en dos especies de murciélagos vampiros: *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* como modelos para el estudio del envejecimiento** que presentó el **Biol. Rafael Toledo Pérez** el día 23 de Noviembre del año 2017.

Sinodales

Presidente



Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de ciencias de la salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario



Dr. Armando Luna López
Laboratorio de Envejecimiento y Estrés
Oxidante
Instituto Nacional de Geriatria

Vocal



Dra. Verónica Souza
Departamento de ciencias de la salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Vocal



Dra. María Cristina González Torres
Departamento de ciencias de la salud
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité tutorial:

Co-directora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Correo: mkf@xanum.uam.mx Tel: 5804-4732

Co-director: Dr. Miguel Ángel León Galván

Departamento de Biología

Universidad Autónoma Metropolitana

Correo: leon@xanum.uam.mx Tel: 5554988429

Asesor Externo: Dr. Armando Luna López

Laboratorio de envejecimiento y estrés oxidante

Instituto Nacional de Geriátrica

Correo: allbioexp@yahoo.com Tel: 5525194307

Agradecimiento

Primeramente quisiera agradecer a dios por permitirme existir y lograr vivir un día más.

Quisiera agradecer a mis **Padres** porque sin ellos y sin el empuje que me han dado no hubiera podido llegar hasta donde estoy hoy. Muchas gracias **Ma** por todo el amor y cariño que me has dado, muchas gracias por enseñarme a ser una persona de bien, reprenderme cuando lo merecí y corregirme cuando lo necesite, muchas gracias por alentarme a ser mejor día a día. Muchas gracias **Pa** por enseñarme lo que es correcto y lo que no, enseñarme que siempre hay que dar todo desde una simple competencia de natación hasta en el ámbito profesional, muchas gracias por estar ahí siempre, sé que los dos han estado muy lejos estos últimos 7 años y que la única manera en que nos podemos comunicar es por el celular a pesar de ello nunca se apartaron de mí, siempre me guiaron y me orientaron en momentos difíciles, muchas gracias por sus sabios consejos, los quiero mucho.

Muchas gracias **Alva** por ser la mejor hermana que pudiera merecer, siempre me apoyaste, estuviste ahí para escucharme y aconsejarme, sé que nuestra vida universitaria fue dura, pero saber que tenía alguien cerca para poderme apoyar y aconsejar hizo que fuera más fácil, muchas gracias por todos esos momentos de risas, enojos y llantos, te quiero mucho hermanita.

Muchas gracias Dra. **Mina** por abrirme las puertas de su laboratorio, por todo el apoyo que me ha brindado durante mi formación académica, muchas gracias por todos sus consejos, no solo a nivel académico sino a nivel personal. Muchas gracias por hacernos sentir como parte de su familia, ahora considero al laboratorio como una segunda familia.

Muchas gracias **Dr. Miguel Ángel** por todo su apoyo que me brindo, sé que sin usted este proyecto no se hubiera podido realizar, muchas gracias por brindarme su tiempo y esfuerzo, sé que esas salidas al campo fueron duras, soportar frío, hambre y sueño a altas horas de la madrugada no cualquiera lo hace, muchas gracias por enseñarme este fascinante mundo de los murciélagos, gracias por sus buenos consejos y anécdotas.

Muchas gracias **Dr. Armando** por todo su tiempo que me brindo al enseñarme a trabajar en el laboratorio, incluso tener que llegar temprano solo para prender el equipo y quedarse hasta tarde solo para apagarlo, muchas gracias por orientarme y enseñarme a ser más crítico con mis resultados, mostrarme como me debo de desenvolver a nivel profesional, muchas gracias por sus buenos consejos y el gran apoyo que me ha brindado.

Muchas gracias a todos mis compañeros del **laboratorio de bioenergética y envejecimiento celular**, es especial al **Master Luis** por enseñarme y orientarme a trabajar en cuarto de cultivo, aunque te enojara que te volviera a preguntar lo mismo, siempre tuviste tiempo para resolver mis dudas. También quiero agradecer a **Ula** por todo el apoyo que me brindaste para concluir este proyecto, muchas gracias por tus buenos consejos. Muchas gracias al resto de la pandilla: **Gibrán, Pedro, Ale Ibáñez, Sandra Li, Alejandro, Paola, Ismerai** (aunque ya no estés con nosotros), **Isabel, Betty, David, Natalia, Elisa, Angie, Vero, Roberto**, y a los recién llegados: **Samael y Belén**.

Quisiera también agradecer a **Viri** por todo el apoyo que me brindaste, por la dedicación que tuviste hacia mí al enseñarme a trabajar en el laboratorio, por tus anécdotas y excelentes consejos que me diste, siempre te recordare y te llevare conmigo. Fuiste una excelente Madre, amiga, compañera e investigadora, Descansa en paz.

Muchas gracias a todos los que me ayudaron en campo a la colecta de los organismos, muchas gracias a los compañeros **Ahiezer, Zulim, Fidel, Ivan, Angie Campos, Fabiansky y Victor**, donde quiera que te encuentres te deseo lo mejor, muchas gracias por todo tu tiempo, esfuerzo y dedicación que le diste a mi proyecto trabajando como si fuera tu propio proyecto, gracias.

Muchas gracias a **Lalo** no solo por el esfuerzo y tiempo brindado en campo, sino también por ser un buen compañero y amigo, por brindarme las herramientas y materiales que necesite en el laboratorio para culminar este proyecto, Muchas gracias.

Gracias a los guías que nos estuvieron acompañando en algunas salidas, muchas gracias al **Sr. Agustín Juárez** y al **Sr. Agustín Matus**, muchas gracias por compartir su tiempo y conocimiento de la localidad.

Muchas gracias al comité del Posgrado en biología experimental y al jurado evaluador este proyecto, muchas gracias por sus comentarios y correcciones, no solo hacia el proyecto si no también hacia mí, contribuyendo a mi formación académica.

Muchas gracias al laboratorio del Dr. Antonio Peña en el instituto de fisiología celular en la UNAM en especial a la **QFB Norma Sanchez S**; por proporcionarme reactivos indispensables para la conclusión de este proyecto.

Muchas gracias al **Laboratorio de fisiología celular** del Depto. de ciencias de la salud, UAM-I, por proporcionarme las herramientas y recursos necesarios para la realización de este proyecto, en especial quisiera agradecer al **Dr. Luis**, muchas gracias por su tiempo y por compartir todo ese conocimiento, muchas gracias sus acertadas opiniones durante la realización de este proyecto.

Muchas gracias a la **Familia Cortes Panameño**, por todas sus atenciones que han tenido conmigo, por todo esas palabras de aliento que me han brindado, en especial quisiera agradecer a **Paula, Jorge, Lucia y Santiago**, por la confianza, apoyo y el cariño que me han brindado, me han hecho sentir desde el primer día como parte de la familia. Muchas gracias por apoyar mi relación con Andrea.

Muchas gracias a mis compañeros de la maestría: **Sandra Li, Valderrábano, Nacho, Carlos, Blanquita, Alex, Angelitos, Alejandra, Norma, Jesermi, Rebe, Abril y Paola** por haber compartido conmigo esta etapa de mi vida, por sus consejos y palabras de aliento, quiero agradecer también por haber compartido su tiempo y conocimiento conmigo, de verdad muchas gracias.

Quiero agradecer también a mis amigos: **Miguel coyote, Gaby Mendieta, Vaitiare, David, Betty, Genaro, Víctor, Brandon, Fernando, Adolfo, Roberto, Leonardo, Chucho Lalo, Toño, Marielita, Tania y Alan** por todos los momentos vividos a su lado, me han forjado lo que soy y forman parte de mi ahora. En especial quiero agradecerte **Raúl** por los buenos momentos que hemos vivido juntos desde hace 12 años, gracias por comprenderme y entender que esto de la investigación es muy demandante y requiere sacrificios, perdón por no haber estado contigo cuando más lo necesitabas.

Por ultimo quisiera agradecer a la persona más importante en mi vida, todos estos años me has impulsado a ser mejor, has compartido mis triunfos y fracasos, momentos de tristeza y alegría, has soportado mis enojos, tener que acompañarme al laboratorio en fin de semana, incluso también quedarte hasta tarde conmigo a terminar algún experimento, gracias por tus consejos y recordarme que todo tiene solución

Gracias por caminar este sendero juntos, te agradezco infinitamente por nunca haberte arrepentido de nada y haber confiado en mí. Muchas gracias **Andrea**, te amo con todo mi corazón.

Resumen

El envejecimiento es un proceso natural de todos los seres vivos, que involucra aspectos deletéreos, y es un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades entre las que destacan: diabetes e hipertensión, así como otras de tipo neurodegenerativo. A pesar de los grandes esfuerzos por comprender el mecanismo del envejecimiento y contrarrestar sus efectos negativos, aún no se ha logrado entenderlo en su totalidad. Diversos grupos de investigadores utilizando modelos biológicos de experimentación en laboratorio, han evaluado la respuesta antioxidante como una manera de evitar los posibles daños causados por el envejecimiento; inclusive, en algunos casos se ha modulado la respuesta antioxidante, pero sin mucho éxito. Por otra parte, actualmente se ha puesto atención a la investigación utilizando otros modelos animales, por ejemplo, especies silvestres para reconocer aspectos particulares enfocados a lograr un envejecimiento con menos alteraciones o incluso retardar este mismo proceso. El modelo de murciélago implica nuevas perspectivas, considerando que son organismos en general más longevos que cualquier otro mamífero de su misma talla, y se especula que ellos podrían presentar la clave de una longevidad mayor.

Desmodus rotundus a pesar de presentar una longevidad mayor en general, presenta mayor daño a nivel del ADN y en algunos casos mayores niveles de carbonilación de proteínas, esto puede deberse a que presentan una mayor resistencia a dosis letales de peróxido de hidrógeno comparación con *Diphylla ecaudata*, dando como resultado supervivencia (resistencia) pero acumulación de daño. En cuanto a la defensa antioxidante *Diphylla ecaudata* en algunos casos presenta una mayor actividad de enzimas antioxidantes y tiene una mayor resistencia a inhibidores de la cadena de transporte de electrones, por lo tanto el estrés oxidante no es papel fundamental al modular la longevidad en estas dos especies de murciélago vampiro.

Abstract

Aging is a natural process of all living beings, involving deleterious aspects, and is a risk factor for the development of various diseases among which are: diabetes and hypertension, as well as other neurodegenerative diseases. Despite great efforts to understand the mechanism of aging and counteract its negative effects, it has not yet been fully understood. Several groups of researchers using biological models of laboratory experimentation have evaluated the antioxidant response as a way to avoid the possible damage caused by aging; In some cases, the antioxidant response has been modulated, but without much success. On the other hand, attention has now been paid to research using other animal models, for example, wild species to recognize particular aspects aimed at achieving aging with less alterations or even slowing down this same process. The bat model implies new perspectives, considering that they are generally more long-lived organisms than any other mammal of the same size, and it is speculated that they could present the key to greater longevity.

Desmodus rotundus despite having a longer longevity in general, has greater damage at the DNA level and in some cases higher levels of protein carbonylation, this may be due to their greater resistance to lethal doses of hydrogen peroxide compared to *Diphylla ecaudata* , resulting in survival (resistance) but accumulation of damage. As for the antioxidant defense *Diphylla ecaudata*, in some cases it has a greater activity of antioxidant enzymes and has a greater resistance to inhibitors of the electron transport chain, therefore oxidative stress is not a fundamental role in modulating the longevity in these two vampire bat species

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El envejecimiento	1
1.2 Teoría del envejecimiento por radicales libres	2
1.3 Enzimas antioxidantes y radicales libres	2
1.4 Esperanza de vida	8
1.5 Modelo de murciélago	11
1.5.1 <i>Desmodus rotundus</i>, Geffroy, 1810	12
1.5.2 <i>Diphylla ecaudata</i> Spix, 1823	13
2. ANTECEDENTES.	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	16
3.1. JUSTIFICACIÓN	16
3.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
3.3. Objetivo General del proyecto	18
3.4. Objetivos particulares del proyecto	18
4. HIPÓTESIS	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1 Trabajo en campo.	19
5.1.1. Criterios de clasificación de edad.	20

5.2 Trabajo en el laboratorio.	24
5.2.1 Daño al ADN (Cuantificación del aducto 8-OH dG)	24
5.2.2 Daño a proteínas (Carbonilación de proteínas).	27
5.2.3 Estado redox (Cociente de glutatión reducido/oxidado)	28
5.2.4. Actividad enzimática de superóxido dismutasa.	29
5.2.5 Actividad enzimática de Catalasa	30
5.2.6. Actividad enzimática de Glutatión peroxidasa	31
5.2.7 Establecimiento del Cultivo primario de fibroblastos	33
5.2.8 Experimento de viabilidad y supervivencia	34
5.2.9. Análisis estadístico.	35
6. Resultados.	35
6.1 Daño al ADN	35
6.2 Carbonilación de Proteínas	37
6.3 Estado Redox (cociente GSH/GSSG)	38
6.4 Actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa	39
6.5 Actividad enzimática de Catalasa	40
6.6 Actividad enzimática de Glutatión peroxidasa	40
6.7 Establecimiento del cultivo primario de fibroblastos	42
6.8 Experimento de supervivencia y Viabilidad.	43
7. Discusión	44

8. Conclusiones	46
9. Perspectivas	47
10. Bibliografía	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El envejecimiento

Se ha estimado que durante el periodo del 2015 al 2050, la proporción de la población mundial de personas adultas mayores, con más de 60 años de edad, pasará de 900 a 2000 millones, lo que representa un aumento del 12 al 22%. Este cambio demográfico será más rápido e intenso en los países de ingresos bajos y medianos en comparación con los países desarrollados, Por ejemplo, en países como Francia tuvieron que transcurrir 100 años para que el número de adultos mayores se duplicara de 7% a un 14%. Por el contrario, en países como Brasil y China un incremento de la misma proporción ocurrió en menos de 25 años (OMS, 2015).

En México, en el año 2015, las personas de 60 años o más representaban el 7.2% de la población total del país y se espera que en el 2050 ésta sea del 21.5% (INEGI, 2015; CONAPO 2015).

Uno de los principales problemas asociados al envejecimiento es el deterioro del organismo, lo que lo convierte en un factor de riesgo para el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo, diabetes, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, y neurodegenerativas (Venkataraman, 2013)

Se reconoce que el envejecimiento produce cambios a todos los niveles de la organización de los seres vivos (Harman, 2003), y está relacionado con un estado físico inadecuado y con un decremento en la supervivencia celular (Alper et al., 2015), en gran medida, debido a los efectos producidos por especies reactivas de oxígeno (ERO).

1.2 Teoría del envejecimiento por radicales libres

Una teoría para explicar el envejecimiento es la propuesta por Harman en los años 60s, en donde se sugiere que el envejecimiento se produce por la acumulación de daños en las biomoléculas causados en gran medida por radicales libres, producidos de forma elevada por una disminución en los mecanismos antioxidantes, que desencadena estrés oxidante y consecuentemente daño celular, aunque actualmente esta teoría está se ha reformulado y se piensa que longevidad depende más de los mecanismos de respuesta y reparación que del mismo daño (Jones, 2015) y que los cambios en el estado redox son moduladores importantes de diversas vías de señalización

1.3 Enzimas antioxidantes y radicales libres

Las ERO son una familia de moléculas que contienen oxígeno, son altamente oxidantes, y son generados de manera endógena y exógena. De manera exógena

pueden ser generados por luz UV, radiación, drogas y citotóxicos entre otros. De manera endógena pueden ser generados por enzimas como la xantina oxidasa, el citocromo p-450, los peroxisomas y las NAPH oxidasas, pero la mayor producción de ERO provienen de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Venkataraman, 2013; Halliwell, 2006).

Entre las ERO más importantes se encuentra el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en presencia de metales de transición como Fe y Cu, puede generar el radical hidroxilo ($\bullet OH$) en lo que se conoce como la reacción de Fenton (Bae, 1997).

La mitocondria es el organelo celular encargado de generar ATP a través de fosforilación oxidativa, la cual se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial gracias a la función de cinco complejos enzimáticos inter membranales: 1.- Complejo I (NADH oxidoreductasa); 2.- Complejo II (Succinato deshidrogenasa); 3.- Complejo III (citocromo bc_1); 4.- Complejo IV (citocromo c oxidasa); 5.- Complejo V (ATP sintasa); y dos moléculas acarreadoras de electrones: la coenzima Q (ubiquinona) y el citocromo c.

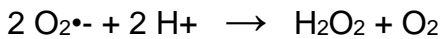
En la cadena respiratoria se produce una fuga de electrones, cuando un electrón es secuestrado por un O_2 en lugar de pasar al siguiente aceptor dentro de la cadena. Los

sitios con mayor producción de ERO son el complejo I y el complejo III por lo que durante la generación de ATP vía fosforilación oxidativa es inevitable la producción de ERO (Martin, 2010).

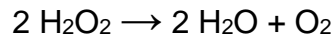
De manera artificial también se puede generar la fuga de electrones y en consecuencia incrementar la producción de ERO, mediante el uso de tóxicos que bloquean los complejos de la cadena de transporte de electrones. Entre estos compuestos se encuentra la Rotenona, la cual puede inhibir irreversiblemente al complejo I, lo cual no solo genera ERO, si no también expone a la célula a un déficit de energía ya que se reduce la cantidad de ATP producida. Otro tóxico es la antimicina, la cual bloquea el complejo III. Este complejo es el eje donde converge la energía proveniente tanto del complejo I como del complejo II, si se inhibe por completo la célula puede entrar en apoptosis debido al déficit de energía.

Existen diferentes moléculas que le ayudan a las células y los tejidos a lidiar contra de los efectos nocivos de las ERO y en conjunto, forman parte del sistema antioxidante. Como parte del sistema antioxidante de los organismos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa (CAT), entre otras. Mientras que los sistemas no enzimáticos involucran las vitaminas C y E, carotenoides (vitamina A), flavonoides y el glutatión (GSH) (Lilley, et al., 2014).

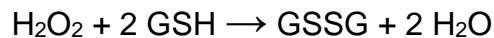
Las enzimas antioxidantes son proteínas que regulan la concentración de ERO. Como se mencionó antes, entre las principales enzimas las SOD, tiene como propósito dismutar dos moléculas $O_2^{\bullet-}$ y reducirlas a peróxido de hidrógeno H_2O_2 .



La CAT se encarga de transformar dos moléculas de H_2O_2 a agua.



Y por último la GPx también se encarga de reducir al H_2O_2 a agua, pero utilizando como cofactor al glutatión (GSH), el cual es un antioxidante no enzimático muy abundante en la célula.



Se sabe que a pesar de que la CAT y la GPx catalizan la misma reacción, su actividad depende de la concentración de H_2O_2 en el célula, ya que en condiciones donde el H_2O_2 se encuentre en mayor concentración, la CAT tendrá mayor actividad que la GPx, por el contrario, cuando el H_2O_2 se encuentre en bajas concentraciones, la enzima con mayor actividad será la GPx. (Lilley, 2014, Venkataraman, 2013).

En condiciones normales, los niveles de ERO se encuentran regulados por los antioxidantes, manteniéndose así, el estado redox en la célula y la homeostasis de los organismos. Cuando ocurre un desbalance significativo, por una elevada producción de ERO o una deficiente activación de antioxidantes, el organismo se encuentra en un ambiente pro oxidante y las ERO pueden generar daño a biomoléculas (las proteínas, los ácidos grasos y el ADN), a esto se le llama estrés oxidante. (Linnane, 2006 y Dalton, 1999)

Se ha sugerido que tanto el estrés oxidante como otros tipos de estrés, son condiciones que propician la adaptación de los organismos, ya que el estrés en general reta a los organismos a desarrollar mecanismos para soportar y compensar dicho estrés, en este caso el estrés oxidante producto de un metabolismo aeróbico (Liochev, 2013)

Entre las biomoléculas que se pueden dañar de una manera importante se encuentra el ADN, en donde puede haber rompimiento de cadena sencilla, rompimiento de cadena doble y modificaciones químicas en grupos funcionales de las bases nucleotídicas generando lo que se conoce como aductos. Entre los aductos más estudiados se encuentra el 8-hidroxi-2 desoxiguanosina (8-OHdG), que además de

ser uno de los que se encuentra en mayor proporción, es de los más estables, por lo que se considera como un buen biomarcador de daño al ADN (Halliwell, 1999).

Dentro de los tejidos del organismo que se ven afectados por daño oxidante asociado a la edad se encuentra el hígado como uno de los órganos que puede ser mayormente afectado a lo largo de la vida, debido a la producción fisiológica de ERO durante la respiración mitocondrial y por la activación de enzimas como la NADPH oxidasa, citocromo P450 y la xantina oxidasa. Además está expuesto a fármacos y xenobióticos que generan ERO que se producen por procesos inflamatorios del mismo sistema inmune. (Czaja, 2007).

Otro de los órganos más propensos a daños asociado al envejecimiento es el cerebro, debido al elevado consumo de oxígeno, el gran número de mitocondrias y un nivel bajo de enzimas antioxidantes que posee, creando un ambiente pro oxidante y por consiguiente una acumulación de daño oxidante a lo largo de vida. (Venkataraman, et al., 2013)

Por otro lado, a nivel celular, los fibroblastos se encuentran presentes en cualquier órgano que presente gran cantidad de tejido conectivo. Son células que cumplen funciones de sostén y soporte para otros tipos celulares, y al igual que cualquier otra

célula, pueden generar ERO debido al consumo de oxígeno (Alper, et al., 2015), por lo que se han empleado como modelo de estudio de los efectos y respuestas celulares ante el estrés oxidante en relación al proceso de envejecimiento, en distintas especies de mamíferos.

1.4 Esperanza de vida

La esperanza de vida es la cantidad de años que puede vivir un organismo de una especie en particular, en condiciones naturales, y una mayor esperanza de vida puede deberse a la resistencia celular o a un mejor manejo del estrés oxidante, que puede aminorar los daños producidos por el proceso de envejecimiento y lograr que el organismo curse su vida completa alcanzando el tiempo establecido para su esperanza de vida (Pickering, et al., 2014). Si bien se ha sugerido que los mecanismos que conducen el proceso de envejecimiento pudieran ser altamente conservados entre las diferentes especies (Alper, et al., 2015), entre los mamíferos existe una gran variación en la esperanza de vida (Salmon, et al., 2009).

Se ha reportado que los fibroblastos derivados de especies de vida larga generalmente son más resistentes a los efectos letales de diversos agentes citotóxicos como rayos UV y rayos gama, peróxido de hidrogeno, paraquat, cadmio, algunos inhibidores de la cadena de transporte de electrones como la rotenona y la antimicina, así como

condiciones del cultivo en medios hipo- e hipercalóricos, etc. (Alper, et al., 2015). Además se piensa que la presión a la que se vio sometido cada tipo celular a lo largo de la evolución del organismo, fue la misma para cada célula, orillando a que éstas desarrollaran mecanismos para soportar y compensar el estrés y, es probable que ciertos tipos celulares del cerebro e hígado presenten mecanismos similares para lograr compensar el estrés. Por eso es interesante estudiarlos en estos contextos: estrés oxidante y envejecimiento.

Sin embargo, en experimentos con ratones y ratas, en los cuales se moduló la defensa antioxidante, incrementando la expresión de genes de enzimas antioxidantes, así como de reparación de daño, no se observó un incremento en la esperanza de vida, entre los grupos controles y los organismos con defensa antioxidante incrementada (Pickering, et al., 2014).

Los estudios del envejecimiento realizados en animales tienen el inconveniente de que la mayoría de investigaciones se han restringido a pocas especies, como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* y algunos múridos. Estos modelos se han mantenido en las mismas condiciones artificiales, siendo imposible saber realmente qué mecanismos presentan de manera natural, evitando el daño por envejecimiento o si sólo es una cuestión artificial producto de los cuidados en

cautiverio. Es por ello que actualmente algunos estudios se han dedicado a descifrar que mecanismos de forma natural, presentan las especies longevas para evitar los efectos negativos del envejecimiento (Alper, et al., 2015).

Entre los modelos más empleados en la actualidad para el estudio de la longevidad se encuentra el ratopin rasurado (*Heterocephalus glaber*), por ser el roedor más longevo conocido, pues llega a vivir hasta 31 años, su gran longevidad se ha relacionado con una eficaz respuesta antioxidante (Seluanov, 2008). Otros vertebrados que han sido considerados, incluyen diferentes especies de aves y de murciélagos, organismos que tienen en común el ser voladores, y se sabe que el modo de locomoción por vuelo exige una gran cantidad de energía y consumo de oxígeno, a pesar de ello, especies de colibríes, pájaros carpinteros y avestruces llegan a tener esperanzas de vida mayores de 30 años (Harper, et al., 2011). Cabe resaltar el modelo de murciélago, ya que son los únicos mamíferos voladores, además se ha reportado anteriormente ser más longevos en relación con otros mamíferos con talla semejante, llegando a vivir en promedio 27 años a diferencia de ratas y ratones que solo viven 2 a 3 años aproximadamente (Pickering, et al., 2014).

Para comparar las respuestas ante el estrés en este tipo de especies se ha popularizado el uso de cultivos primarios, en particular de fibroblastos. Este modelo

permite evaluar la respuesta celular de diferentes organismos, así como también de diferentes especies, independientemente de las condiciones particulares de cada una de ellas, incluyendo hábitos alimenticios, ciclos biológicos, hábitats y cualquier otra condición en que se encuentren (Harper, et al., 2011).

1.5 Modelo de murciélago

Los murciélagos son actualmente el centro de atención en cuanto al estrés oxidante y reparación de daño debido a su mayor longevidad comparada con mamíferos de su misma talla. Estos organismos viven en promedio 3.5 veces (alrededor de 27 años) más que otros mamíferos, se asume que todos tuvieran la misma talla. El record de longevidad lo tiene la especie *Myotis brandtii* con 41 años en vida libre (Lilley, et al., 2014). Los murciélagos presentan un metabolismo muy elevado en comparación con otros mamíferos, llegando a requerir el doble de energía a lo largo de su ciclo de vida (Munshi, 2010). En reposo los murciélagos llegan a tener 500 latidos por minuto, pero durante el vuelo los latidos se duplican llegando a una frecuencia cardiaca de 1000 latidos por minuto, al mismo tiempo que elevan el consumo de oxígeno y el requerimiento de energía, siendo que el consumo de oxígeno en la mitocondria está relacionado con la producción de ERO. El vuelo puede ser la actividad que más energía demanda y en consecuencia genera desgaste en los murciélagos (Wilhelm et

2007). Su capacidad de volar y su gran longevidad sugiere una mayor evolución en comparación con otros mamíferos (Salmon, et al., 2009). Se piensa que la gran resistencia que tienen los murciélagos al deterioro asociado a la edad se debe a su respuesta antioxidante efectiva, ya que producen una gran cantidad de ERO debido a su elevado metabolismo (Lilley, et al., 2014).

Especies estudiadas en este proyecto.

1.5.1 *Desmodus rotundus*, Geffroy, 1810

El "vampiro común" es el más conocido de los murciélagos hematófagos debido a su abundancia y distribución, llegan a vivir hasta 30 años (Conde-Pérezprina, et al., 2012). Estos animales son de tamaño pequeño a mediano, y su color puede variar del café gris al café rojizo. Tienen pulgares bastante desarrollados y presentan dos almohadillas debajo de cada metacarpo. Sus hábitos son gregarios y habitan lugares silvestres de regiones cálidas y semicálidas. Se encuentran en una diversidad de refugios, tales como huecos de árboles, grutas, túneles, minas, ruinas arqueológicas o casas abandonadas, que utilizan como refugios temporales diurnos que pueden cambiar en función a la movilidad que se presenta en el ganado, que es su principal fuente de alimento (Greenhall, et al., 1983).

Los murciélagos *D. rotundus* tienen como principal fuente de alimento la sangre de animales domésticos, grandes mamíferos nativos y rara vez humanos. Esta especie es de importancia económico-sanitaria ya que puede transmitir enfermedades como rabia paralítica y tripanosomiasis (Barquez, et al., 1999). Las hembras son poliéstricas. El crecimiento es rápido, se completa aproximadamente a los cinco meses y alcanzan las características somáticas del adulto.

Estos murciélagos son altamente sociables, prueba de ello es que se acicalan mutuamente. Su grupo social está formado por un macho dominante en un grupo de hembras y algunos machos juveniles, formando un sistema de harem. El macho dominante tiene privilegios sexuales sobre las hembras y se encuentra en constante conflicto con los murciélagos machos satélite que pudieran llegar al harem.

En la colonia, cuando un individuo no puede asegurar su comida, los otros regurgitan la sangre consumida para que éste se alimente, mostrando un comportamiento altruista. Sin su alimento no es capaz de sobrevivir mucho tiempo y puede morir después de unas 30 horas (Lord, 1988).

1.5.2 *Diphylla ecaudata* Spix, 1823

El "vampiro de patas peludas", como es llamado comúnmente, es la especie más pequeña de los tres murciélagos hematófagos existentes y parece ocupar el segundo lugar en abundancia, pero a diferencia de *Desmodus rotundus*, éstos llegan a vivir un poco menos de 8 años (Martino, et al., 2006). Su pelaje es de color café oscuro, entre

los detalles que lo caracterizan de los otros hematófagos, es que presentan las orejas ligeramente más pequeñas y redondeadas, sus ojos son considerablemente más grandes; el pulgar es corto, grueso en la base y sin callosidades. Presentan un pelaje denso que cubre a casi todo el animal, siendo la zona del uropatagio extremadamente densa (Greenhall, et al., 1996).

Este murciélago se encuentra principalmente en zonas cálidas subhúmedas. Percha principalmente en cuevas, túneles, minas y troncos huecos, como individuos separados o en grupos pequeños de menos de cien individuos, difiriendo del vampiro común en sus hábitos gregarios (Siles, et al., 2003). Se alimenta de la sangre de aves de corral, otra diferencia importante con el vampiro común. Estos murciélagos pueden reproducirse en cualquier temporada del año, teniendo una cría anualmente (Green Hall, et al., 1996).

2. ANTECEDENTES.

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo (Conde-Pérezprina, et al., 2012), se reportó que *Desmodus rotundus* presentaba mecanismos de adaptación para contender con el estrés oxidante que funcionaban mejor que los de otra especie comparada, *Myotis velifer*. Destacando la actividad de enzimas antioxidantes como CAT que estaba aumentada 20% en cerebro en los grupos de jóvenes y adultos, y

50% en cerebro e hígado en el grupo de viejos; la SOD con una actividad incrementada de aproximadamente 20% en todos los casos y GPX incrementado 50% en hígado en todos los grupos de edad. Además *D. rotundus* presentó un menor daño por microsatélites en el ADN del grupo de animales viejos con respecto a los adultos, donde el hígado de organismos adultos presentaba 20% mayor daño con respecto a los jóvenes, pero los organismos viejos presentaban la misma cantidad de daño que los organismos jóvenes. Caso contrario ocurrido en la especie de *Myotis velifer* donde el daño se incrementaba con respecto a la edad independientemente del órgano. Aunque el daño al ADN por microsatélites no necesariamente es un daño específico por estrés oxidante ya que este tipo de daño se pueden generar por mutaciones puntuales.

En otro estudio realizado por Scneeberg (2013), se relacionó el estrés oxidante y los antioxidantes con el tipo de alimento consumido por los murciélagos. Él estudió reportó que las especies frugívoras presentan mayor cantidad de antioxidantes en plasma, así como una menor presencia de biomoléculas oxidadas, en comparación con organismos con otros hábitos alimenticios, entre ellos el hematófago *D. rotundus*. Sin embargo, en ese trabajo no se consideró la longevidad de los organismos, así que las respuestas registradas pudieron estar más asociadas con la edad, además no se

especificó el tipo de antioxidantes evaluados, es probable que la mayor proporción de antioxidantes que se presentaba en suero hayan sido de tipo no enzimáticos propios de la dieta y no enzimas generadas por mismo organismo.

Por último, trabajos de Harper, et al., 2007 y Pickering, et al., 2014, en los que evaluaron la resistencia y el daño a proteínas en fibroblastos aislados de algunas especies de mamíferos con diferente longevidad, frente a agentes estresores como cadmio, paraquat, peróxido de hidrógeno, y otros, reportaron que las especies más longevas presentan menor daño a proteínas en relación con la esperanza de vida. En general las células provenientes de las especies más longevas eran más resistentes a daño por agentes citotóxicos y a concentraciones que son mortales para fibroblastos de especies de vida corta. Sin embargo, este estudio no incluyó a los vampiros *D. rotundus* ni *D. ecaudata*,

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

3.1. JUSTIFICACIÓN

En los próximos años se espera que en México el número de adultos mayores se incremente hasta representar el 21.5% de la población. Esto trae consigo un gran problema, puesto que se incrementará el número de personas que padecerán enfermedades asociadas al envejecimiento.

Se ha observado que la respuesta celular ante el estrés oxidante confiere protección al organismo, ya sea por la activación de vías de respuesta antioxidante o por medio de enzimas. Esta protección se relaciona con la teoría del envejecimiento de la siguiente manera, al reducirse la cantidad de daño se piensa que podría alargarse la vida de los organismos. Si bien diversos estudios que incluyen la manipulación de organismos de laboratorio, así como el uso de dietas y fármacos con la finalidad de incrementar la esperanza de vida, no han tenido mucho éxito o bien generan resultados contradictorios.

El modelo de murciélago es un modelo que presenta características muy particulares, lo que hace que sobresalga del resto de los mamíferos al ser muy eficiente y exitoso en diversos ambientes. Los murciélagos son los únicos mamíferos voladores, lo que trae consigo un mayor gasto energético. Esta demanda de energía sugiere que estos animales podrían ser más propensos a estar en estrés oxidante. Sin embargo, evolutivamente han logrado compensar ese estrés, llegando a vivir hasta 3 veces más que cualquier otro organismo de su misma talla.

El esclarecimiento de los mecanismos por los cuales algunos tipos de murciélagos viven más que otras especies, incluso de su mismo grupo, contribuirá a entender mejor

el proceso de envejecimiento, no solo a nivel particular de estas especies, sino también del envejecimiento de otras especies de mamíferos en general.

3.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué factores de la defensa antioxidantes presentes en *Desmodus rotundus* están confiriendo protección ante el daño y en consecuencia otorgan una mayor longevidad en comparación con *Dyphylla ecaudata*?

3.3. Objetivo General del proyecto

Determinar si los factores de la defensa antioxidante presentes en *Desmodus rotundus* se asocian con la mayor esperanza de vida observada en esta especie en comparación con *Dyphylla ecaudata*

3.4. Objetivos particulares del proyecto

- Evaluar el daño en ADN en cada uno de los órganos seleccionados de ambas especies para identificar cuál de ellas acumula mayor daño a lo largo de la vida
- Determinar el coeficiente de GSH-GSSG como indicador del estado redox de cada especie y órgano
- Determinar la actividad de enzimas antioxidantes identificando que especie es más susceptible a daño

- Determinar la viabilidad y la supervivencia como una medida de la respuesta de los fibroblastos ante daño por agentes citotóxicos

4. HIPÓTESIS

Desmodus rotundus, por ser un organismos más longevo tiene una mayor actividad de enzimas antioxidantes, un estado redox menos oxidado, un menor daño al ADN y una mayor resistencia celular a agentes citotóxicos que *Diphylla ecaudata*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Trabajo en campo.

Se utilizaron ejemplares de dos especies de murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata*) capturados en colonias de vida libre ubicadas en la localidad de Chalahuico, Municipio de Tetela de Ocampo, Puebla, particularmente de una cueva natural. Para la captura de los organismos se contó con la autorización de la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT, otorgada al Dr. Miguel Ángel León Galván, mediante el oficio SGPA/DGVS/08104/14. Las capturas se realizaron al interior de la cueva (antes de que los animales salieran de ella) mediante el uso de una red de golpe, así como con una red de niebla colocada en la entrada. Cada animal capturado fue mantenido individualmente en un saco de manta de algodón hasta terminar la sesión de captura. Las visitas a la localidad se realizaron periódicamente

hasta completar el tamaño de muestra establecido para el estudio. En cada visita a la cueva, una vez realizada la captura, se revisaron los ejemplares y se seleccionaron para cada especie de estudio, individuos cuyas características correspondían a los siguientes grupos por especie: I- Machos, II- Hembras, y los subgrupos por edad (a) juveniles y (b) adultos, de acuerdo con los criterios establecidos por Conde-Pérez Prina y colaboradores (2012). Para la identificación de las especies se utilizaron las claves de Medellín y colaboradores (2008), considerando sus principales medidas somáticas (longitud de antebrazo en mm y peso corporal en gr). El tamaño de muestra de individuos seleccionados para su estudio en laboratorio fue de 5 por cada subgrupo (especie-sexo-edad), por lo que en total se emplearon para el presente estudio 20 murciélagos *Desmodus rotundus* y 20 *Diphylla ecaudata*.

5.1.1. Criterios de clasificación de edad.

Desgaste dentario: Los cráneos de los murciélagos se observaron bajo el microscopio estereoscópico para determinar el grado de desgaste dental. Para *Desmodus rotundus* la clasificación se realizó con base en los estudios previos de Conde-Pérez Prina et al. (2012). Para *Diphylla ecaudata* no existe un reporte de categorización dental, por lo que se creó uno con base al conocimiento previo y la cercanía de las dos especies. Se analizaron los caninos, premolares y molares como variables a considerar para su categorización.

Características fenotípicas: se utilizaron como parámetros fenotípicos la textura del pelaje, su lubricación, el brillo y el color, ya que en el caso de *Desmodus rotundus* los organismos juveniles presentan un pelaje brillante, color rojizo y conforme llegan a la etapa adulta se vuelve oscura. En el caso de la especie *Diphylla ecaudata* los organismos juveniles presentan un pelaje negro brillante, y conforme se desarrollan, el pelaje se vuelve pardo opaco. Además, ya que son organismos con mal temperamento, presentan múltiples heridas en la cara y las alas lo que permite distinguir un organismo juvenil de uno adulto (Martin, 2001).

Características alométricas: se obtuvo el peso de los organismos expresado en g, utilizando una balanza portátil electrónica Ohaus, con un error de ± 0.1 g. además se obtuvo el largo de antebrazo como otro parámetro de talla, se utilizó para ello un calibrador Vernier tomando en cuenta un error de ± 0.1 mm.

Estos datos fueron comparados posteriormente con los reportes de (Conde-Pérez Prina, 2012; Greenhall, 1983; Greenhall, 1984).

Características reproductivas: para el caso de los machos se tomó en cuenta el tamaño y la ubicación del testículo; para el caso de las hembras se tomó en cuenta el desarrollo de las glándulas mamarias o si éstas presentaban algún indicio de una gestación previa.

Para el caso de *Desmodus rotundus* se clasifico a los organismos en:

Juveniles, (mayores de 4 meses hasta 12 meses) aquellos que no presentaban desgaste dentario, incluso que presentaban el par extra de dientes en forma de

ganchos. Todos ellos fueron organismos delgados y de poca talla (peso corporal: 21-31 g y longitud de antebrazo 51-60 mm), no presentaron daños en la piel, y si mostraron un pelaje brillante y de color rojizo. Los machos no presentaron testículos escrotados y en las hembras, las glándulas mamarias eran incóspicuas (carentes).

Adultos, (mayores al año y menores a 15 años) aquellos que presentaron poco desgaste dentario, todos ellos eran organismos más robustos y de talla mayor (peso corporal: 32- 40 g y longitud de antebrazo: 61-64 mm), presentaron algunos daños en la piel, incluso en la cara, su pelaje no era brillante sino color grisáceo, incluso parte color blanco. Los machos presentaban testículos escrotados de tamaño mediano o grande, y las hembras presentaban glándulas mamarias pequeñas o grandes, dependiendo de la etapa de la gestación y aquellas que eran post-lactantes, presentaron un pezón color oscuro.

Para el caso de la especie *Diphylla ecaudata* se clasifico a los organismos en:

Juveniles: (mayores de 4 meses y menores a 11 meses) son organismos que no presentaban desgaste dentario, incluso tampoco contaban con los dientes en forma de gancho para sujetarse del pezón de la madre. Todos ellos eran organismos delgados y de baja talla (peso corporal: 17-26 g y longitud de antebrazo: 49-54 mm), no presentaban daño en la piel y su pelaje era brillante y color negro u oscuro. Los machos aun no presentaban testículos escrotados y las hembras presentaban mamas incóspicuas.

Adultos: (mayores de 11 meses hasta 6 años) todos los organismos de este grupo ya presentaban desgaste dentario, eran más robustos que los juveniles y de mayor talla

(peso corporal: 26-31 g y longitud de antebrazo: 55-58 mm), presentaban daños en la piel y su pelaje era opaco y de color café oscuro, algunos ya presentaban coloración canosa. Los machos presentaban testículos escrotados de tamaño mediano o grande, las hembras presentaban mamas visibles dependiendo de la etapa de gestación en que se encontraban, las hembras pos lactantes también presentaban un pezón de color oscuro.

Los organismos seleccionados fueron llevados a un campamento cercano al sitio de captura, donde se procedió a la obtención de las muestras biológicas, que a su vez se conservaron en hielo seco para su traslado al laboratorio en la UAM-I. Todos los animales que se capturaron pero que no fueron incluidos en este estudio fueron liberados vivos en su mismo refugio. Para el manejo de los organismos desde su captura hasta la obtención del material biológico específico de estudio se tomaron en cuenta las especificaciones descritas en la “Guía de la Sociedad Americana de Mastozoólogos para el uso de mamíferos silvestres en investigación” (Sikes et al 2011).

Los ejemplares seleccionados para el estudio fueron sacrificados por decapitación en un lapso no mayor de 8 horas después de su captura. A los organismos se les extrajo el cerebro, el hígado y el intestino, que fueron conservados en criotubos de polipropileno, etiquetados para su reconocimiento individual y congelados inmediatamente con hielo seco para su preservación y traslado al laboratorio en la

Universidad para su posterior procesamiento y análisis, conservándolos a -80°C en ultracongelador.

5.2 Trabajo en el laboratorio.

5.2.1 Daño al ADN (Cuantificación del aducto 8-OH dG)

El ADN se aisló de los tejidos utilizando el método caotrópico de Nal (Wang, et al., 1994 y Matos, et al, 2001). Los tejidos se lavaron y después se homogenizaron en 1 ml de solución A (0.32 M sacarosa, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Tritón X-100, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl y 0.1 mM desferroxamina, pH 7.5). Posteriormente el tejido homogenizado se centrifugó a 1500g durante 10 min; se recuperaron los pellets y se resuspendieron nuevamente en la solución A para volver a centrifugar a 1500g durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de solución B (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 10% p/v SDS y 0.15 mM desferroxamina a pH 8.0). Posteriormente se adicionaron 30 µL de RNasa A (10 mg/mL) y 20 µL de RNasa T1 (1000 U/mL). Ambas enzimas previamente diluidas en una solución de 10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA y 2.5 mM de desferroxamina a pH 7.4. Los tubos se incubaron durante 1 h a 37°C.

Se adicionaron 100 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se volvieron a incubar 1h a 37 °C. Después se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min a 4°C; la fase líquida se

colectó y se adicionaron 2.1 mL de la solución de yoduro de sodio (7.6 M NaI, 40 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA-Na₂ y 0.3 mM de desferroxamina a pH 8.0), junto con 4 mL de isopropanol. El contenido del tubo se mezcló por inversión y se refrigeró a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min a 4°C y el precipitado formado se lavó con 1 mL de isopropanol al 60% (v/v); posteriormente se realizó un segundo lavado con 1 mL de etanol al 70% (v/v), después se centrifugaron a 5000 x g durante 15 min. Por último el pellet de DNA se disolvió en 150 uL de desferroxamina a 1 mM.

La concentración de ADN se determinó espectrofotométricamente a 260 nm y su pureza se evaluó de acuerdo con el cociente A₂₆₀/A₂₈₀. Las muestras >1.75 fueron desechadas debido a su poca pureza. También se corrieron las muestras en geles de agarosa a 1.5% para observar su integridad y que el ADN no presentara daño por la manipulación durante el procesamiento o la extracción.

Para hidrolizar el ADN obtenido, a cada 100 µg de ADN se le agregó 2µL de acetato de sodio 1 M (pH 5.0) y 2.5 µL de Nucleasa P1 (solución madre de 0.4 U/µL) y el agua necesaria para completar 100 µL incluyendo todas las enzimas de hidrólisis. Se

dejaron incubar a 37°C por 30 min. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 4 µL de Tris-HCl 1.0 M, (pH 7.4), y 13.5 µL de fosfatasa alcalina (solución de 0.22 U/µL) disuelta en amortiguador de fosfatasa (glicerol 50%, MgCl₂ 50 mM, ZnCl₂ 0.1 mM, pH 7.5), y se incubaron a la misma temperatura por 1 h más. Inmediatamente después se inyectó el ADN hidrolizado a un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cuantificación del aducto 8-OHdG se realizó utilizando un equipo de (HPLC) según la técnica de Matos et al., (2001) modificada por Gavia et al., (2015). Se utilizó una bomba binaria 1525 Waters, acoplada a un Detector UV/visible 2489 calibrado a 254 nm y detector electroquímico 2465 ajustado a 290 mV. Para la separación de la muestra se utilizó una cromatografía isocrática de fase reversa con una columna LC18 Suppelco de 25 cm x 4.6 mm y 5µM. La fase móvil consistió en 92% v/v de amortiguador de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 50 mM a pH 5.5 y 8% v/v de metanol. El flujo fue isocrático a 1 ml/min. Se inyectaron 100 µg de ADN hidrolizados en un volumen de 100 µL

La cuantificación de la concentración se realizó integrando el área bajo la curva de los picos de las desoxiguanosinas oxidadas (8-OHdG), que se detectan únicamente con el detector electroquímico, dividiendo este valor entre las desoxiguanosinas totales

(dG) que se detectan en el UV-VIS. El resultado es un cociente que se reporta de la siguiente manera: 8-OHdG residuos/ 10^6 dG. Para la curva patrón del 8-OHdG se usaron estándares 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (Sigma). Se inyectaron concentraciones conocidas del estándar desde 2 nM hasta 32 nM. Para la curva de dG se utilizó 2'-desoxiguanosina (Sigma) a concentraciones crecientes de 25 a 300 nM.

5.2.2 Daño a proteínas (Carbonilación de proteínas).

Para la cuantificación de carbonilos se utilizó el método descrito por Mesquita, 2014. Brevemente, se homogenizaron 100 mg de los tejidos en 500 μ L de la solución para extraer proteína (100 μ L de DTT 1M, 100 μ L de PSMF 0.1M y 1 pastilla de mini complete (Roche), suspendidos en 10 ml de buffer T-Per (Sigma)). Se centrifugaron las muestras a 5000 x g durante 15 minutos a 4° C y se recuperaron los sobrenadantes. En una placa de 96 pozos se agregaron 20 μ L de muestra y se adicionaron 20 μ L de DNPH (10 mM disuelto en H_3PO_4 0.5 M), se mezclaron y se dejaron incubar en obscuridad 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionan 10 μ L de hidróxido de sodio 6 M y se dejó incubar 10 min más en obscuridad, por último se leyó la placa a 450 nm en un lector de microplacas Hreader 1 Elisa reader de la marca HLAB.

Para calcular la cantidad de carbonilos presentes en las muestras se multiplicó el valor de la absorbancia por el factor de extinción (46.1) y este resultado se normalizó dividiendo entre la concentración de proteínas por muestra.

5.2.3 Estado redox (Cociente de glutatión reducido/oxidado)

El contenido de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) se determinó por HPLC siguiendo el protocolo reportado en la literatura (Farriss, 1987; Gómez-Quiroz, 2008), con algunas modificaciones.

Se homogenizaron 200 mg de tejidos en 800 μ L de ácido clorhídrico/BPDS (HCL 10%/BPDS 1mM), posteriormente la suspensión se centrifugó a 5000 x g por 5 min a 4°C. Enseguida se recuperó el sobrenadante, después se tomaron 100 μ L de cada muestra y se inyectaron al sistema de HPLC. Se utilizó una bomba binaria 1525 Waters, acoplada a un Detector UV/visible 2489 calibrado a 210 nm, la fase estacionaria consistió en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4.6 x 250 mm y 5 μ M de partícula y como fase móvil se usó 1% de acetonitrilo y 99% de un buffer de fosfato de potasio monobásico (20 mM de KH_2PO_4) a pH 2.7. Se utilizó un flujo isocrático de 1 ml/min. Las muestras fueron analizadas por detección ultravioleta a 210 nm. El área bajo la curva se determinó mediante el uso de estándares de GSH y GSSG, partiendo de diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 200 y 400 μ M).

5.2.4. Actividad enzimática de superóxido dismutasa.

La actividad de la SOD se evaluó a través del sistema xantina/xantina oxidasa, basado en los protocolos de Paoletti et al. (1986) y Stirpe y Della Corte (1969).

El anión superóxido formado a través de este sistema reacciona con nitro azul de tetrazolio (NBT) que genera un colorante de formazan que se puede medir espectrofotométricamente a 560 nm.

En este ensayo se consideró como la cantidad de SOD necesaria para inhibir el 50% de la reacción de superóxido con NBT.

Se homogenizaron 100 mg de los tejidos en 500 μ L de la solución para extraer proteína (100 μ L de DTT 1M, 100 μ L de PSMF 0.1M y 1 pastilla de mini complete (Roche), resuspendidos en 10 ml de buffer T-Per (Sigma)). Se centrifugaron las muestras a 5000 x g durante 15 min a 4° C y se recuperaron los sobrenadantes.

Se calibró el espectrofotómetro con agua desionizada en celdas de plástico a 560 nm.

Se mezcló en una celda de plástico 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 μ L de la solución de xantina oxidasa (0.1 U de XO en ml

de sulfato de amonio 2 M), 25 μ L de solución para homogenizar para la celda blanco o 25 μ L de muestra (determinación de la actividad por muestra).

Se registró la absorbancia a 560 nm cada 30 seg durante 5 min y se calculó el cambio en la absorbancia por minuto (ΔA_{560}).

Para la absorbancia de la solución de xantina si el ΔA_{560} era ≥ 0.015 , se diluyó la solución de xantina oxidasa en sulfato de amonio.

5.2.5 Actividad enzimática de Catalasa

La actividad de CAT se cuantificó usando el protocolo establecido por Aebi (1984), analizando una cinética enzimática que evalúa la disminución H_2O_2 a 240 nm utilizando un espectrofotómetro. Una unidad de actividad de catalasa (UCAT) se considera como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la degradación de 1 mol de H_2O_2 por minuto.

Para ello se homogenizaron 100 mg de los tejidos en 500 μ L de la solución para extraer proteína (100 μ L de DTT 1M, 100 μ L de PSMF 0.1M y 1 pastilla de mini complete (Roche), resuspendidos en 10 ml de buffer T-Per (Sigma)). Se centrifugaron las muestras a 5000 x g durante 15 min a 4° C y se recuperaron los sobrenadantes.

Se mantuvo la solución de trabajo a temperatura ambiente y las muestras en hielo.

Se calibró el espectrofotómetro con agua destilada en una celda de cuarzo a 240 nm como blanco y en otra una celda de cuarzo se agregaron 1 mL de la solución de trabajo. Se leyó la absorbancia de la solución de trabajo a 240 nm y se calculó la concentración de H₂O₂ siguiendo la ecuación:

$$21.81 \times A_{240} - 0.36 = 10 \pm 0.5 \text{ mM/L}$$

Se mezcló en una celda de cuarzo: 1.5 mL de la solución de trabajo y 5 µL de muestra.

Se analizaron las muestras por duplicado y se registró la absorbancia a 240 nm cada 15 seg durante 3 min.

5.2.6. Actividad enzimática de Glutación peroxidasa

La actividad de la GPx se analizó por una cinética enzimática utilizando un espectrofotómetro calibrado a 340 nm a través de un protocolo descrito por Hodnick y colaboradores (1998). Una unidad de actividad de GPx indica la cantidad de enzima requerida para transformar el H₂O₂ utilizando NADPH (Flohe y Günzler 1984).

Se homogenizaron 100 mg de los tejidos en 500 µL de la solución para extraer proteína (100 µL de DTT 1M, 100 µL de PSMF 0.1M y 1 pastilla de mini complete (Roche), resuspendidos en 10 ml de buffer T-Per (Sigma)). Se centrifugaron las muestras a 5000 x g durante 15 minutos a 4° C y se recuperaron los sobrenadantes.

Se mantuvieron las soluciones y las muestras en hielo. Se mantuvo la solución amortiguadora de fosfatos 500 mM a temperatura ambiente. Se calibró el espectrofotómetro con agua destilada en una celda de cuarzo a 340 nm. Las muestras se analizaron por duplicado.

El blanco experimental se preparó de la siguiente manera: en una celda de cuarzo se añadió 100 µL de la solución amortiguadora de fosfatos 500 mM, 10 µL de la solución de EDTA a 60 mM, 100 µL de la solución de azida de sodio 20 mM, 100 µL de la solución de Glutación reductasa a 15 U/ml, 100 µL de la solución de NADPH 1.5 mM, 500 µL de agua desionizada fría.

Al blanco experimental se le agregó 20 µL de la solución de GSH y 50 µL de muestra para preparar el primer blanco. Se registró el cambio en la absorbancia a 340 nm cada 3 seg durante 40 seg.

Posteriormente se le agregó al primer blanco 20 µL de la solución de H₂O₂ para correr el análisis por muestra. Se registró el cambio en la absorbancia a 340 nm cada 3 seg durante 40 seg.

5.2.7 Establecimiento del Cultivo primario de fibroblastos

Se realizaron cultivos primarios de fibroblastos de pulmón de machos jóvenes en las dos especies para evaluar la viabilidad y supervivencia ante agentes citotóxicos como son el peróxido de hidrogeno, la rotenona y la antimicina, se empleó la técnica reportada por Maciel-Barón y col., 2016 para el aislamiento de fibroblastos.

Primero se preparó colagenasa 3 mg/ml en PBS y se filtró con filtro de pirinola de 0.22µm, posteriormente se procedió a sacrificar a los animales por decapitación. Se colocaron los pulmones en tubos con 5 ml de PBS y 2% de antibiótico-antimicótico (AB-AM), se llevaron los tubos dentro de la campana para continuar con el aislamiento, se colocaron los pulmones en cajas Petri y se lavaron los pulmones 3 veces con 2 ml de PBS, se retiró el PBS y se trituraron los tejidos hasta tener trocitos de 1 mm, se añadió 2 ml de colagenasa y se dejaron incubando 45 min a 36°C, se recolectó la suspensión en un tubo Falcón y se centrifugó a 1500 x g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 10 ml de Medio de cultivo (MEM, 10% FBS y 2% AB AM). Se sembró colando la suspensión por un sardinel para cultivo de 0.22 µM. Las células se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂, se cambiaron los medios cada tercer día y una vez llegadas a confluencia se dividieron y se congelaron para mantener los cultivos

5.2.8 Experimento de viabilidad y supervivencia

Se sembraron 12000 células en placas de 96 pozos y se determinó la C50% para conocer la concentración adecuada que mataba al 50 % de las células en cultivo. Se realizó una curva dosis respuesta utilizando concentraciones de 75, 100 150 y 200 mM de H₂O₂. Según los reporte de Pickering et al., (2014), quienes determinaron que la dosis ideal o letal era 100 mM. En el caso de rotenona también se realizó una curva dosis respuesta con concentraciones de 25, 50, 75 y 100 mM según los reportes de Harper y colaboradores, (2007) donde determinaron que la dosis ideal era 50 nm. Se determinó la viabilidad y la supervivencia de las células por el kit de CCK8 (Cell Counting Kit 8, Dojingo Laboratories), donde la reducción de WST 8 es cuantificable a 450 nm y se pudo determinar el número de células y la viabilidad de éstas.

El material biológico utilizado en laboratorio fue procesado, conservado y, por último desechado, esto último cuando terminaron los ensayos establecidos, en apego a las consideraciones establecidas en los “Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud” de la UAM-Iztapalapa, vigentes en la actualidad.

5.2.9. Análisis estadístico.

Se graficaron las medias, así como también cada uno de los datos individualmente para los experimentos de daño a ADN, carbonilación de proteínas, estado redox y actividad de enzimas antioxidantes, se realizó un análisis estadístico utilizando una prueba no paramétrica (U de Mann Whitney) con una $p < 0.05$. Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0, tanto para graficar como para correr los análisis estadísticos.

6. Resultados.

6.1 Daño al ADN

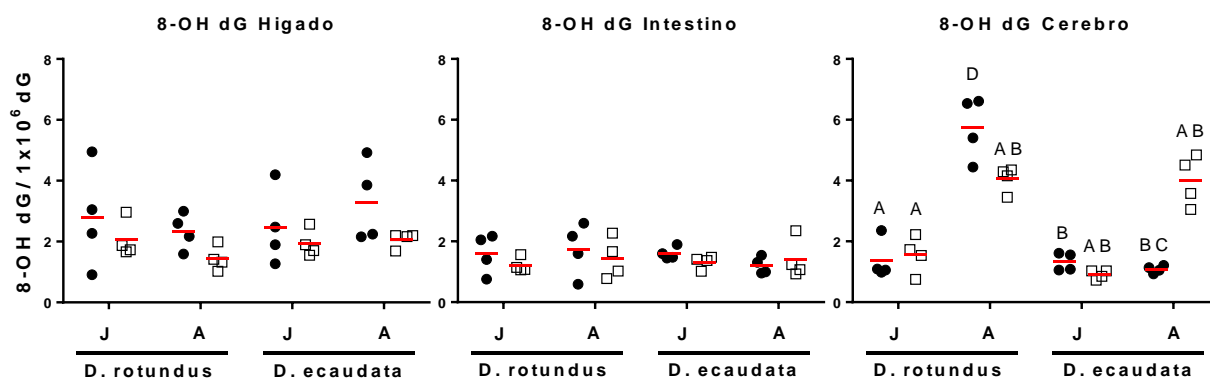


Fig. 1 Valores de media y valores individuales del cociente del aducto 8-OH dG entre un millón de dG como indicador de daño al ADN en hígado, intestino y cerebro de las dos especies de estudio diferenciando también por sexo.

Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con:

A para diferencia por edad, **B** para diferencia por sexo, **C** para diferencia por especie y **D** incluye todas las diferencias

(U de Mann Whitney, $P < 0.05$ $n = 4$)

● = Machos □ = Hembras

En la **figura 1** se muestran los resultados del análisis de aductos 8-OH dG en cada uno de los diferentes grupos. Se grafica el daño en cada uno de los órganos, la letra J corresponde a organismos jóvenes y la A corresponde a organismos adultos, los círculos negros representan los datos de los machos y los cuadrados blancos representan los datos de las hembras.

Para el caso de daño a hígado e intestino, no se encontraron diferencias significativas entre ellos, incluso presentan menor daño con respecto al cerebro; esto puede deberse a la baja tasa de proliferación de las células en el cerebro en comparación con órganos como son el hígado y el intestino (Venkataraman, 2013). En el caso particular del cerebro, los machos adultos de la especie de *Desmodus rotundus* son el grupo con mayor daño, incluso con respecto a la otra especie, esto sugiere que los machos adultos de *Desmodus rotundus*, podrían estar en mayor estrés debido a las continuas peleas por dominar el harem (Lord, 1988). Así mismo se observa un aumento del daño con respecto a la edad en el caso de los machos y hembras de *D. rotundus* y las hembras de *Diphylla ecaudata*. Esto corresponde con el daño al ADN acumulado a lo largo de la edad (López-Diazguerrero, 2005).

Es interesante notar que se observa una mayor dispersión en los datos en el caso de los machos en ambas especies en comparación con las hembras en donde los valores son menos dispersos, además de que esta heterogeneidad se pierde ya en la etapa adulta. Ello posiblemente se deba a que los organismos jóvenes que no están adaptados y presentan mayor daño, mueran en esta etapa, esto se correlaciona con la tasa de mortalidad tan elevada de los machos en los primeros años de vida, aunque no tenemos manera de probarlo para el presente estudio, los datos sugieren que

aquellos organismos que sobrevivieron es porque pudieron soportar los daños o aminorarlos.

6.2 Carbonilación de Proteínas

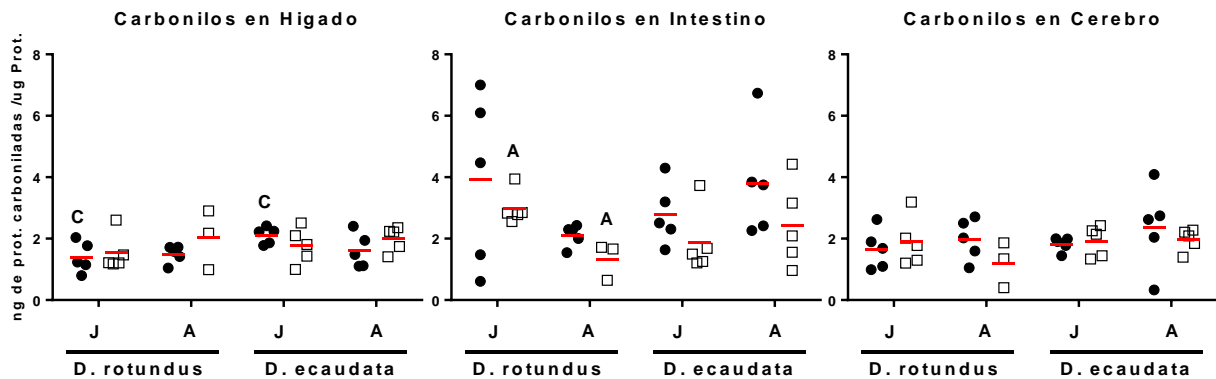


Fig. 2 Valores de media y valores individuales del cociente de ng de proteína carbonilada/ ug de proteína en hígado, intestino y cerebro de las dos especies de estudio diferenciando también por sexo.

Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con:

A para diferencia por edad, **B** para diferencia por sexo, **C** para diferencia por especie y **D** incluye todas las diferencias

(U de Mann Whitney, $P < 0.05$, $n = 5$ excepto Hembras *D. rotundus* adultas= 3) ● = Machos □ = Hembras

Al evaluar la concentración de carbonilos (daño a proteínas) solo se encontraron diferencias significativas por especie en el caso del hígado de los organismos jóvenes machos de la especie *D. rotundus* con respecto a *Diphylla ecaudata*, siendo ésta última la que presenta mayor daño. De la misma manera se observa mayor daño en las hembras jóvenes de la especie *Desmodus rotundus* con respecto a las adultas de la misma especie.

Ya que las proteínas oxidadas son más fáciles de eliminar que otras biomoléculas dañadas, es probable que estos organismos no tengan mecanismos de eliminación de proteínas oxidadas tan eficientes. En el caso de daño a proteínas en intestino se aprecia un patrón donde los organismos más jóvenes presentan mayor daño y es más marcado ese daño en el caso de los machos, esto se puede deber al cambio de dieta,

se sabe que *D. rotundus* llega a desarrollarse rápidamente y en 9 meses es el destete de los organismos juveniles (Greenhall et al; 1983), al cambiar de dieta, donde la sangre tiene un gran contenido de hierro, y este puede generar radicales libres mediante reacción de Fenton, puede ser la razón de este daño a proteínas en intestino, de igual manera se encontró diferencia significativa entre los machos jóvenes de las dos especies, teniendo mayor daño *Diphylla ecaudata*, pudiendo ser diferencia en la dieta ya que el Hígado es un órgano implicado en el sistema digestivo, puede ser que la dieta de *Diphylla ecaudata* aporte menos nutrientes, o sea más pro-oxidante en comparación con una dieta en base a sangre de mamíferos.

6.3 Estado Redox (cociente GSH/GSSG)

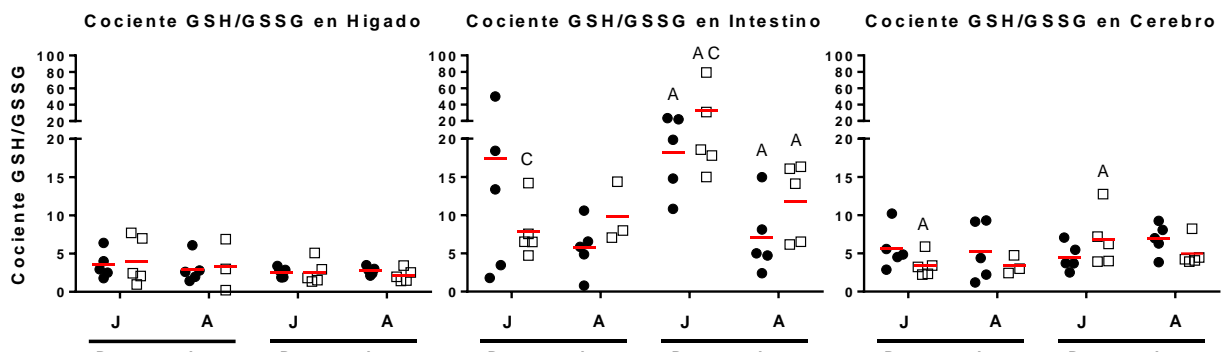


Fig. 3 Valores de media y valores individuales del cociente de glutatión reducido/ oxidado normalizado por mg de proteína en hígado, intestino y cerebro de las dos especies de estudio diferenciando también por sexo.

Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con:

A para diferencia por edad, **B** para diferencia por sexo, **C** para diferencia por especie y **D** incluye todas las diferencias

(U de Mann Whitney, $P < 0.05$, $n = 5$ excepto Hembras *D. rotundus* adultas= 3) ● = Machos □ = Hembras

Al evaluar el estado redox del hígado no se encontró diferencia significativa entre los grupos. Al compararlo con respecto al resto de órganos se encuentra en un estado redox más oxidado. Al evaluar el intestino se observa que las hembras jóvenes de la especie *D. ecaudata* presentan un estado redox menos oxidado con respecto a *D. rotundus* y con respecto a los machos de su misma especie, esto se relaciona con el

carácter y la agresividad de estas dos especies, las hembras de *D. ecaudata* son las más tranquilas y en este caso son las que presentan un estado redox más reducido, pensando que la pelea y el estrés estén relacionados con la modulación del estado redox; en el caso de la especie *D. ecaudata* los organismos jóvenes presentan un estado redox más oxidado con respecto a los adultos, lo cual se correlaciona con el daño a proteínas que presentaban en la etapa juvenil.

6.4 Actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa

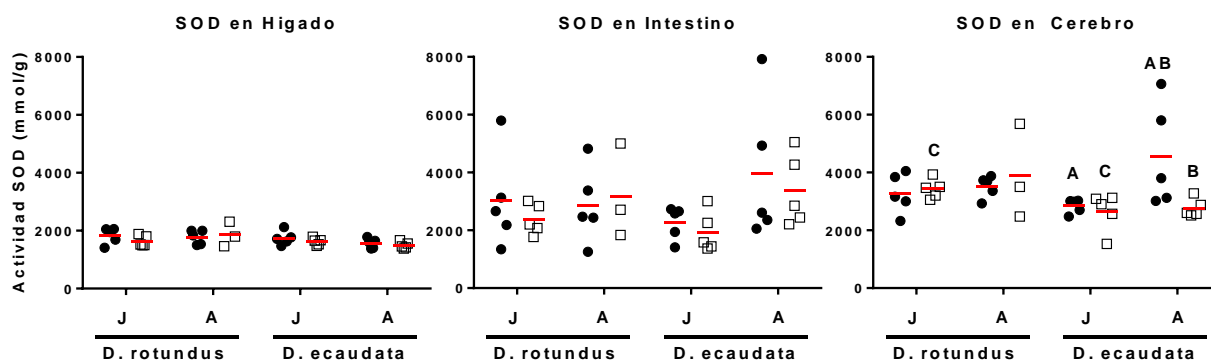


Fig. 4 Valores de media y valores individuales de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa normalizada con mg de proteína en hígado, intestino y cerebro de las dos especies de estudio diferenciando también por sexo.

Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con:

A para diferencia por edad, **B** para diferencia por sexo, **C** para diferencia por especie y **D** incluye todas las diferencias

(U de Mann Whitney, $P < 0.05$, $n = 5$ excepto Hembras *D. rotundus* adultas = 3)

● = Machos □ = Hembras

Al evaluar la actividad de la enzima superóxido dismutasa no se registraron diferencias significativas en el hígado y el intestino, sin embargo, para el cerebro si presentaron diferencias. Los machos adultos de la especie *D. ecaudata* presentaron mayor actividad de la SOD con respecto a los organismos jóvenes de su misma especie y con respecto a la hembras. Esto se correlaciona con los bajos niveles de daño a ADN encontrados, ya que la SOD es la primera línea de defensa contra las ERO, es posible que en este caso esté disminuyendo el daño a biomoléculas en el cerebro. Cabe

desatacar que el hígado es el órgano que presenta menor actividad de la enzima SOD, pensando que debido a esto pueda ser que el hígado presente un estado redox mas oxidado en comparación con los demás órganos, siendo SOD una de las primeras líneas de defensa en contra de la producción ERO.

6.5 Actividad enzimática de Catalasa

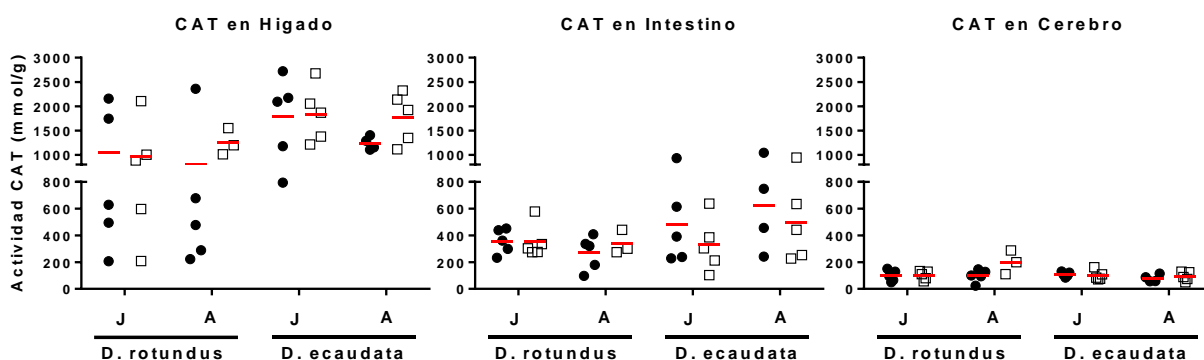


Fig. 5 Valores de media y valores individuales de la actividad de la enzima Catalasa normalizada con mg de proteína en hígado, intestino y cerebro de las dos especies de estudio diferenciando también por sexo. Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con: **A** para diferencia por edad, **B** para diferencia por sexo, **C** para diferencia por especie y **D** incluye todas las diferencias (U de Mann Whitney, $P < 0.05$, $n = 5$ excepto H. Dr A= 3 y M. De J = 4) ● = Machos □ = Hembras

En el caso de la actividad de la enzima CAT no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio en ninguno de los órganos analizados, aunque si se aprecian diferencias por órgano, siendo el cerebro el que tiene menor actividad y el hígado el órgano con mayor actividad, esto corresponde con lo ya reportado por Venkataraman et al. 2013, donde el resultado de la baja actividad de enzimas antioxidantes resulta en daño en este mismo.

La baja actividad de CAT sugiere que existe una baja concentración de peróxidos y que quien realmente se esté encargando de eliminarlos sea una peroxidasa, entre ellas la glutatión peroxidasa.

6.6 Actividad enzimática de Glutación peroxidasa

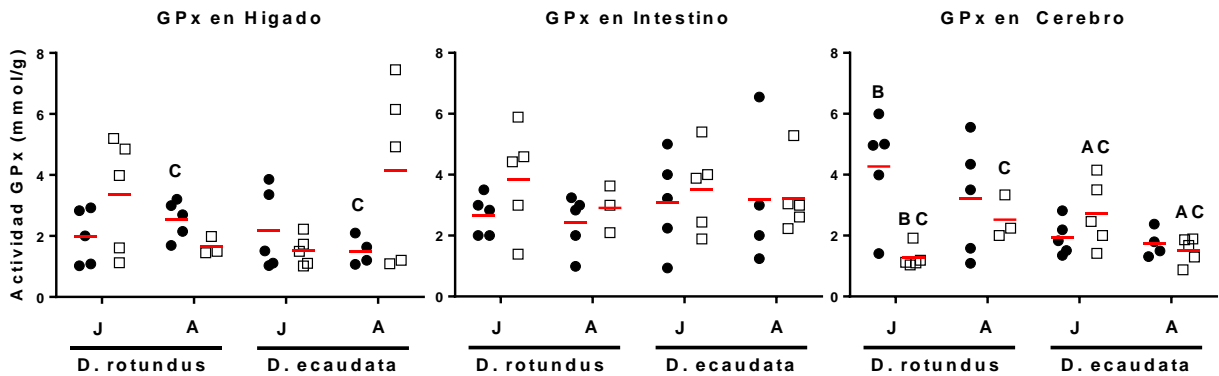


Fig. 6 Valores de media y valores individuales de la actividad de la enzima Glutación peroxidasa normalizada con mg de proteína en hígado, intestino y cerebro de las dos especies de estudio diferenciando también por sexo.

Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con:

A para diferencia por edad, **B** para diferencia por sexo, **C** para diferencia por especie y **D** incluye todas las diferencias

(U de Mann Whitney, $P < 0.05$, $n = 5$ excepto H. Dr A= 3 y M. De J = 4) ● = Machos □ = Hembras

Al evaluar la actividad de la GPX se encontró una mayor actividad en el caso de los machos adultos de *D. rotundus* con respecto a *D. ecaudata*, esto se puede relacionar con la menor cantidad de carbonilos en el caso de *D. rotundus* en hígado. En el cerebro, *D. ecaudata* presenta mayor actividad en el caso de las hembras jóvenes con respecto a *D. rotundus*, además esto se relaciona con el cociente de GSH/GSSG ya que ese mismo grupo presentó un estado redox menos oxidado con respecto a la otra especie, además se observa como esta actividad se va disminuyendo con respecto a la edad, en el caso de cerebro, al igual que el daño al ADN este se va acumulando.

6.7 Establecimiento del cultivo primario de fibroblastos

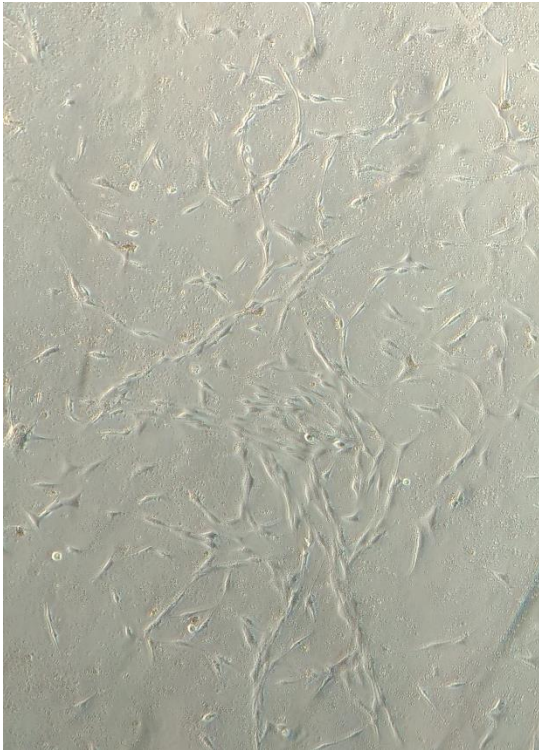


Imagen 1 cultivo primario de fibroblastos provenientes de pulmones de *Desmodus rotundus*, observados al microscopio a 100x. Los fibroblasto presentan la forma alargada característica, fusiforme con prolongaciones, un nucleo relativamente grande.

determinó que su tiempo de duplicación era aproximadamente de 36 horas, caso contrario en los fibroblastos de *Diphylla ecaudata*, en los que la tasa de duplicación era más lenta; se calculó que el tiempo necesario para lograr duplicar la población era de 41 horas aproximadamente, 16% mayor que en *Desmodus*.

Otra parte del proyecto fue la obtención de los fibroblastos en cultivo, se obtuvieron los fibroblastos de pulmón de ambas especies (Imagen 1 y 2).

En la imagen 1 se puede apreciar un cultivo primario de fibroblastos proveniente de pulmón de *Desmodus rotundus*. Se

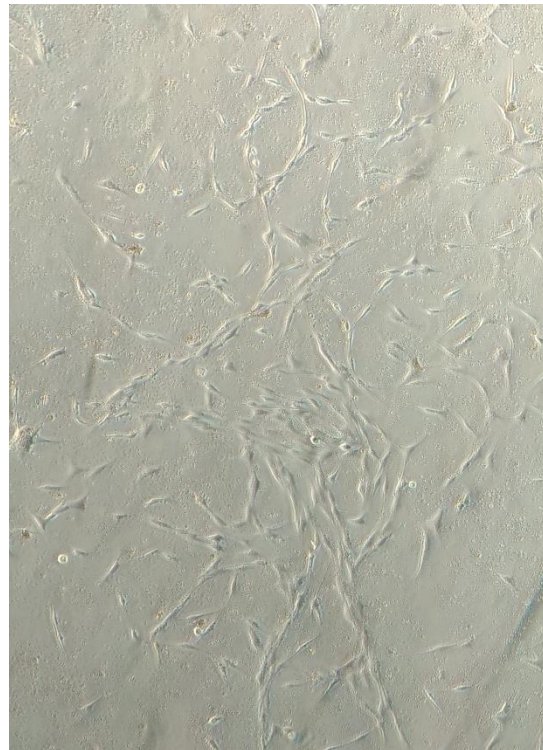


Imagen 2 cultivo primario de fibroblastos provenientes de pulmones de *Diphylla ecaudata* observados al microscopio a 100x , al igual que cualquier otro fibroblasto de humano o raton presentan una forma alargada, fusiforme con prolongaciones y un nucleo relativamente grande.

Los fibroblastos de *Diphylla ecaudata* se muestran en la imagen 2. Es importante mencionar que a partir del quinto día en cultivo ya se encontró una diferencia significativa en el número de duplicaciones entre las dos especies (Figura 7).

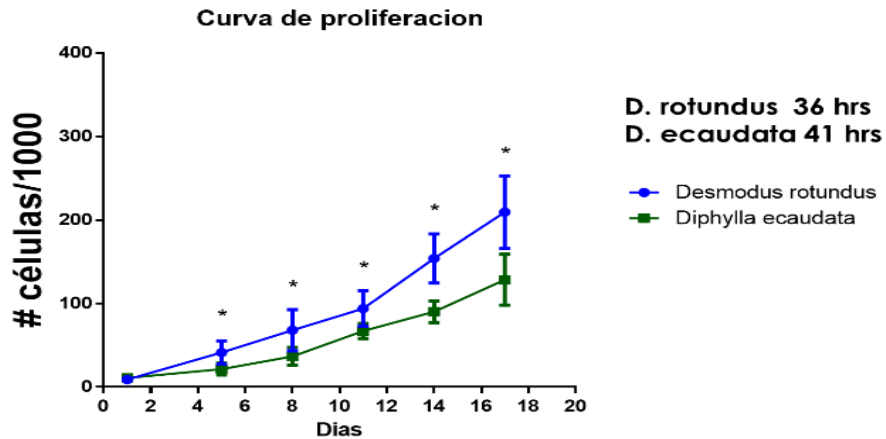


Fig. 7 Se muestran las curvas de proliferación de fibroblastos proveniente de pulmón de murciélago de las dos especies. Se grafica la media muestral y el error estándar (U de Mann Whitney, $P < 0.05$ $n = 6$ por triplicado).

6.8 Experimento de supervivencia y Viabilidad.

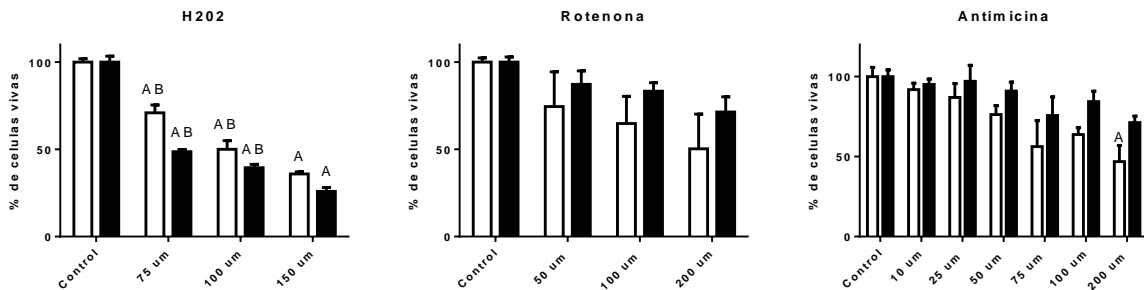


Fig. 8 Valores de media y Error estándar de las curvas de peróxido, rotenona y antimicina buscando la dosis letal 50.

Las diferencias estadísticas significativas con una $P < 0.05$ fueron marcadas con:

A diferencia con respecto al control, **B** para diferencia con respecto a la otra especie.

(U de Mann Whitney, $P < 0.05$ $n = 6$ por triplicado).

□ D. rotundus
 ■ D. ecaudata

La figura 8 muestra la curva dosis respuesta realizada para determinar la concentración a la cual los fibroblastos de cada especie llegaban a la dosis letal 50. Se observa que

la especie *D. ecaudata* es mas susceptible a daño por estrés oxidante, puesto que a partir de concentraciones de 75 μM de peróxido ya se llega a la dosis letal 50, mientras que para *D. rotundus* es necesario emplear una dosis de 100 μM para llegar a ese punto.

Para los inhibidores de la cadena de transporte de electrones la especie de *D. rotundus* resultó ser mas susceptible, ya que a concentraciones mas bajas las células mueren en mayor proporción que las correspondientes para *D. ecaudata*. Esto es interesante si se compara con el trabajo de Buffenstein (Lewis, 2013), quien comparó la respuesta de fibroblastos provenientes de ratopines razurados, de rata y de ratón, frente a diferentes concentraciones de fármacos y agentes citotóxicos, observando que los fibroblastos de los ratopines razurados morían a bajas concentraciones de los tóxicos, pero si se dejaba recuperar el mismo cultivo a lo largo del tiempo, rápidamente se recuperaba el número de células, por lo que propusieron que éstas células primero evaluaban el daño interno, si era mucho morían en lugar de emplear recursos en repararlo y solo proliferaban aquellas células que se encontraban en buenas condiciones, protegiendo así al tejido. Una respuesta similar podría sugerirse para las células de *D. rotundus*, que tiene mayor longevidad.

7. Discusión

A pesar de que *Diphyllo ecaudata* está estrechamente emparentado con *Desmodus rotundus*, difiere en su longevidad; siendo *D. rotundus* 3 veces más longevo. Esto es sorprendente ya que *D. rotundus* es una especie donde los machos están en constante

pelea para defender su harem y su oportunidad de aparearse, la longevidad podríamos atribuirle a que *D. rotundus* tiene un área de distribución mayor, sus refugios no están restringidos solo al uso de cuevas y sus poblaciones son mayores en número de individuos llegando en promedio a más de cien individuos por colonia en comparación con *Diphylla ecaudata*. Es de resaltar que ambas especies se alimentan de una dieta completamente hematófaga, que se considera oxidante por contener una gran cantidad de hierro y que podría estar generando radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton.

En cuanto a los resultados, *Desmodus rotundus* presentó mayor daño en el ADN, mayor nivel de carbonilación de proteínas y un estado redox más oxidado, dando más pruebas, para comprobar que la teoría de Harman definitivamente no está operando para la modulación del envejecimiento en estas dos especies, o en otro caso, como este hay muchos trabajos que han demostrado que la teoría de envejecimiento por radicales libres de Harman requiere ser replanteada. Ya que esta es la especie más longeva. Estos resultados apoyan lo publicado por otros investigadores como Pérez et al. (2009) y Alper et al. (2015) donde se menciona que el envejecimiento no depende tanto del daño sino de cómo responde o se contiene contra el estrés. En el presente estudio, *Desmodus rotundus* presentó actividad de la enzima SOD más elevada en comparación de *Diphylla ecaudata*, además de presentar una mayor resistencia al peróxido, probablemente debido a que los organismos seleccionados para el establecimiento del cultivo fueron machos jóvenes). El resultado más significativo para

Desmodus rotundus fue la mayor actividad de GPx, ya que probablemente sea la enzima que se encuentra detoxificando a los fibroblastos de los peróxidos.

En el caso de los experimentos con los inhibidores de la cadena de transporte de electrones, se sabe que estos compuestos, aún a dosis bajas, son capaces de matar a las células, por lo que se propone que en *Desmodus rotundus*, las células tienen una mejor capacidad para censar que se encuentran en un déficit de nutrientes y mueren rápidamente; por el contrario, en *Diphylla ecaudata* parecería que las células son más resistentes a los inhibidores de la cadena respiratoria, pero podríamos especular que los fibroblastos de *Diphylla ecaudata* tratan de modular la respuesta y reparar el daño, siendo que este daño es irreparable, la célula se encuentra comprometida, y no entran en apoptosis, agravando el deterioro del tejido a largo plazo. Caso contrario puede estar en los fibroblastos de la especie *D. rotundus*, donde las células, reconocen el daño irreparable y deciden entrar mejor en apoptosis. Aunque estos datos no podemos tomarlos como certeros, ya hemos tomado la decisión de repetirlos, pero por falta de espacio para trabajar han sido aplazados para el siguiente año.

8. Conclusiones

Desmodus rotundus a pesar de ser el murciélago vampiro más longevo, presenta mayor daño al ADN, mayor carbonilación de proteínas y un estado redox más oxidado.

Los fibroblastos de *Desmodus rotundus* presentan una mayor resistencia a ERO como el peróxido y posiblemente logran compensar este efecto con las enzimas antioxidantes, principalmente la SOD y la GPx.

Aún no está del todo claro que mecanismo presenta *Desmodus rotundus* que le permite alcanzar una longevidad mayor que *Diphylloides ecaudata*, sin embargo deben ser otros mecanismos ajenos a la respuesta antioxidante.

Los inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial aparentemente afectan más a los fibroblastos de *Desmodus rotundus*, pero no se puede concluir por el momento cual es el mecanismo para ello.

9. Perspectivas

Para estudiar los mecanismos moleculares asociados a las respuestas encontradas, se sugiere seguir trabajando ambas especies para determinar lo siguiente:

- Evaluar los mecanismos de eliminación de proteínas dañadas y oxidadas (Actividad de Proteosoma)
- Evaluar la activación de vías de señalización para supervivencia y proliferación (NFkB), así como de respuesta antioxidante (Nrf2) ante diferentes retos estresores.
- Evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno, en los cultivos sometidos a rotenona y antimicina.
- Evaluar el consumo de oxígeno en los cultivos sometidos a rotenona y antimicina para determinar el consumo de oxígeno a pesar su inhibición.
- Realizar western blot para determinar la cantidad de (CAT, SOD, GPx) y relacionarlo con su actividad.

- Evaluar la capacidad antioxidante del contenido estomacal por especie, para determinar si alguna dieta protege ante el estrés oxidante.

10. Bibliografía

- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Alper S.J., Bronikowski A.M., Harper J.M. (2015). Comparative cellular biogerontology: Where do we stand? *Experimental gerontology*, 71, 109-117.
- Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B., Rhee, S. G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 217-221.
- Barquez R.M, Mares M.A., Braun JK. (1999) The bats of Argentina. *Special Publications, Museum of Texas Tech University*; 42: 1-275.
- Conde-Pérezprina J.C., Luna-López A., González-Puertos, V.Y., Zenteno-Savín, T., León-Galván, M.Á., Königsberg, M. (2012). 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*, 34(6), 1473-1492.

- CONAPO, Denisse-González K. (2015), Envejecimiento demográfico en México: análisis comparativo entre entidades federativas, La situación demográfica de México 2015, 113-128.
- Czaja, M.J. (2007). Cell signaling in oxidative stress-induced liver injury. In *Seminars in liver disease* 27 (4), 378-389.
- Dalton, T. P., Shertzer, H.G., & Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 67-101.
- Fariss M.W, Reed D.J. (1987) High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol.* 143, 101-109.
- Flohé L. Günzler W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 105, 114-120.
- Gavia-García G., González-Martínez H., Miliar-García Á., Bonilla-González E., de los Ángeles Rosas-Trejo M., Königsberg M., Luna-López A., González-Torres M. C. (2015). Oxidative damage and antioxidant defense in thymus of malnourished lactating rats. *Nutrition*, 31(11), 1408-1415.
- Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. (2008) Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox

homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 283(21):14581-14589.

- Greenhall A.M, Joermann G, Schmidt U. (1983) *Desmodus rotundus*. *Mammalian Species*; 202:1-6.
- Greenhall A.M, Schmidt U, Joermann G. (1996) *Diphylla ecaudata*. *Mammalian Species*; 227, 1-3
- Harman, D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(5), 557-561.
- Harper J.M., Salmon A.B., Leiser S.F., Galecki A.T. Miller, R.A. (2007). Skin-derived fibroblasts from long-lived species are resistant to some, but not all, lethal stresses and to the mitochondrial inhibitor rotenone. *Aging cell*, 6(1), 1-13.
- Harper J.M., Wang M., Galecki A.T., Ro J., Williams J.B., Miller R.A. (2011). Fibroblasts from long-lived bird species are resistant to multiple forms of stress. *Journal of Experimental Biology*, 214(11), 1902-1910.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., (1999), *Free radicals in biology and medicine* Oxford University Press.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658. Munshi-South, J., &

Wilkinson, G. S. (2010). Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates. *Ageing research reviews*, 9(1), 12-19.

- Hodnick W.F., Ahmad S., Pardini, R.S. (1998). Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. In *Flavonoids in the Living System* 131-150.
- INEGI (2015). Encuesta intercensal 2015, principales resultados.
- Lewis, K. N., Andziak, B., Yang, T., & Buffenstein, R. (2013). The naked mole-rat response to oxidative stress: just deal with it. *Antioxidants & redox signaling*, 19(12), 1388-1399.
- Lilley T.M., Stauffer J., Kanerva M., Eeva, T. (2014). Interspecific variation in redox status regulation and immune defence in five bat species: the role of ectoparasites. *Oecologia*, 175(3), 811-823.
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1-4.
- Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (Presentados al Consejo Divisional de CBS en la Sesión 8.10 del 18 de mayo de 2010). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

- Linnane, A. W., Eastwood, H. (2006). Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1), 47-55.
- López-Diazguerrero, N. E., Luna-López, A., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Zentella, A., Königsberg, M. (2005). Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice. *Life sciences*, 77(22), 2840-2854.
- Lord R.D. (1988) Control of vampire bats. *Natural history of vampire bats*. Florida: CRC Press; 215-226.
- Maciel-Barón L.A., Morales-Rosales, S.L., Aquino-Cruz, A.A., Triana-Martínez, F., Galván-Arzate, S., Luna-López, A. Königsberg, M. (2016). Senescence associated secretory phenotype profile from primary lung mice fibroblasts depends on the senescence induction stimuli. *AGE*, 38(1), 1-14.
- Martino A.M., Aranguren J., Arends, A. (2006). New longevity records in South American microchiropterans, 70(1-2), 166-167.

- Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MH. (2001) Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitriloacetate. Arch Biochem Biophys 396, 171–177.
- Medellín R.A., Arita H.T., Sánchez O.H. (2008). Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. 2a Ed. Instituto de Ecología, UNAM. México. 78 P.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2, 4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. Analytical biochemistry, 458, 69-71.
- Munshi-South, J., & Wilkinson, G. S. (2010). Bats and birds: exceptional longevity despite high metabolic rates. Ageing research reviews, 9(1), 12-19.
- OMS (2015). Envejecimiento y ciclo. Datos y cifras. Sacado de http://www.who.int/features/factfiles/ageing/ageing_facts/es/ consultado el 16/06/2015
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. Analytical biochemistry, 154(2), 536-541

- Pérez, V. I., Bokov, A., Van Remmen, H., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead?. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(10), 1005-1014.
- Pickering A.M., Lehr, M., Kohler W.J., Han M.L., Miller R.A. (2014). Fibroblasts from longer-lived species of primates, rodents, bats, carnivores, and birds resist protein damage. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(7), 791-799.
- Salmon A.B., Leonard, S., Masamsetti V., Pierce A., Podlutzky A.J., Podlutzkaya N., Chaudhuri A.R. (2009). The long lifespan of two bat species is correlated with resistance to protein oxidation and enhanced protein homeostasis. *The FASEB Journal*, 23(7), 2317-2326.
- Schneeberger K., Voigt C.C., Czirják G.A. (2014), Frugivory is associated with low measures of plasma oxidative stress and high antioxidant concentration in free-ranging bats, *Naturwissenschaften* 101. 285-290
- Seluanov A., Hine C., Bozzella M., Hall A., Sasahara T.H., Ribeiro A.A, Gorbunova V. (2008). Distinct tumor suppressor mechanisms evolve in rodent species that differ in size and lifespan. *Aging cell*, 7(6), 813-823.

- Siles L., Muñoz A., Aguirre L.F. (2003). Nuevos reportes del vampiro de patas peludas *Diphylla ecaudata* (Chiroptera: Desmodontinae) para los departamentos de Cochabamba y Santa Cruz. *Ecología en Bolivia*, 38(2), 161-166.
- Sikes R.S., Gannon W.L. The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92(1):235-253.
- 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). *Journal of Biological Chemistry*, 244(14), 3855-3863.
- Venkataraman K., Khurana S., Tai T.C. (2013). Oxidative stress in aging-matters of the heart and mind. *International journal of molecular sciences* 14(9), 17897-17925.
- Wang L., Hirayasu K., Ishisawa M., Kobayash Y. (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids* 22, 1774–1775.

- Wilhelm Filho, D., Althoff, S. L., Dafré, A. L., Boveris, A. (2007).
Antioxidant defenses, longevity and ecophysiology of South American bats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1), 214-220.
- Wittig, I., Beckhaus, T., Wumaier, Z., Karas, M., Schägger, H. (2010).
Mass Estimation of Native Proteins by Blue Native Electrophoresis
PRINCIPLES AND PRACTICAL HINTS. *Molecular & Cellular Proteomics*,
9(10), 2149-2161.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00181

Matrícula: 2153803931

ESTRÉS OXIDANTE EN DOS ESPECIES DE MURCIÉLAGOS VAMPIROS: *Desmodus rotundus* y *Diphylla ecaudata* COMO MODELOS PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:30 horas del día 23 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ
DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES
DRA. VERONICA SOUZA ARROYO
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: RAFAEL TOLEDO PEREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



RAFAEL TOLEDO PEREZ
ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

SECRETARIA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS MARTINEZ

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DRA. MARIA CRISTINA GONZALEZ TORRES

VOCAL

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

SECRETARIO

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ