



LOS MURCIÉLAGOS COMO POSIBLES BIOINDICADORES DE GENOTÓXICOS MEDIOAMBIENTALES MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Núñez-Figueroa Lidia Josefina^a; Ramos-Ibarra María Luisa^a; Zalapa Hernández Silvia Socorro^b; Guerrero Vázquez Sergio²; Zavala-Cerna María Guadalupe^c; Torres-Bugarín Olivia^c.

^aDepto. Salud Pública, Div. Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara (UDG).

^bCentro de Estudios en Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara (UDG).

^cFacultad de Medicina, Universidad Autónoma de Guadalajara.

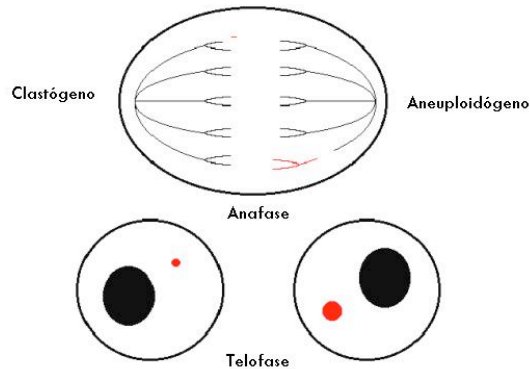
1. RESUMEN

Debido al acelerado crecimiento de la población y sus actividades antropogénicas, los organismos han quedado expuestos a sustancias que pueden provocar daño genotóxico. La prueba de micronúcleos en sangre periférica es una forma sencilla y económica para evaluar la genotoxicidad de ciertas sustancias en organismos conocidos como bioindicadores. Sin embargo, son pocas las especies que se han considerado como tales. Por tanto, en el presente estudio se realizó un muestreo de dos especies de Murciélagos procedentes de la zona de Conservación Ecológica Estero El Salado; Puerto Vallarta, Jalisco. Se formaron dos grupos, G1) *Artibeus lituratus* (20 organismos) y G2) *A. jamaicensis* (20 organismos), a cada animal se les extrajo una gota de sangre y se realizaron dos frotis, que fueron fijados en etanol y posteriormente teñidos con naranja de acridina y observados en microscopia de fluorescencia. Se determinó intra e interespecífica la frecuencia de EMN (eritrocitos micronucleados), EPCMN (eritrocitos policromáticos-micronucleados) y EPC (eritrocitos policromáticos). Se aplicó prueba estadística U de Mann Whitney con valor $P \leq 0.05$.

Los resultados obtenidos para los murciélagos *Artibeus lituratus* fueron de EMN 6.60 ± 3.28 , EPCMN 1.10 ± 1.09 y EPC 36.37 ± 10.62 y para *A. jamaicensis* EMN 4.86 ± 2.83 , EPCMN 1.07 ± 0.97 y EPC 44.49 ± 23.44 , lo que nos indica que independientemente de la especie o sexo, ambos murciélagos pueden ser considerados como posibles bioindicadores de genotóxicos ambientales mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica.

2. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de una sociedad moderna basada en el uso y generación de sustancias nocivas, ha expuesto a los organismos a elementos físicos, químicos y biológicos que pueden llegar a alterar su material genético y provocarles un daño silente como mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad. Por ello, es trascendente determinar un nivel aceptable de daño genético en una población determinada, sin embargo, los métodos para evaluarlo son costosos, complicados e invasivos. Por lo que desde 1975 hasta la fecha se ha realizado la técnica de micronúcleos (MN) en diversos tejidos para determinar el daño cromosómico *in vivo* ocasionado tanto por agentes clastogénicos como aneuploidogénicos, pero con el empleo de algunos tejidos era necesario sacrificar al animal de estudio. Actualmente en diversas investigaciones se ha efectuado dicha prueba en sangre periférica (SP), la cuál es una forma rápida, sencilla, confiable y económica, ya que no se requiere el sacrificio del organismo ni el cultivo celular. Los MN son biomarcadores de efecto que se forman en metafase-anafase, son cromosomas completos rezagados por daño al huso mitótico o fragmentos de cromosomas sin centrómero que no lograron incorporarse al núcleo de la célula hija (Fig.1).



Derechos reservados, Laboratorio de Mutagénesis, Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente, IMSS.

Fig. 1. Formación de Micronúcleos (MN).

Un buen bioindicador de genotóxicos mediante la prueba de micronucleos en SP, es aquel con eritrocitos abundantes sin núcleo o con núcleo sin lóbulos y buena relación citoplasma-núcleo, eritrocitos policromáticos en SP y aquellos cuyo bazo es no-sinusoidal (no filtra eritrocitos viejos, anómalos o con inclusiones como los MN), lo que se refleja a contabilizar alrededor de 6 EMN en 10,000 eritrocitos totales (ET). Los chiropteros poseen estas características, además de ser homeotermos, mas longevos que otros mamíferos, habitar la mayoría de los ecosistemas, presentar variedad de hábitos alimentarios, algunas especies son de fácil captura mediante el método de redes de niebla y tienen un papel fundamental dentro de los ecosistemas; por lo que pueden ser considerados como potenciales candidatos para la prueba de MN en SP.

3. OBJETIVO

Evaluar mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica a los murciélagos *Artibeus lituratus* y *A. jamaicensis* de la Zona de Conservación Ecológica Estero El Salado para considerarlos como posibles bioindicadores de genotóxicos ambientales.

4. MATERIAL Y MÉTODO

Conforme a lo establecido por Gannon y cols., 2007, se capturaron 40 murciélagos adultos, de apariencia sana; que se dividieron en dos grupos G1) 20 *Artibeus lituratus* (10 machos y 10 hembras) y G2) 20 *A. jamaicensis* (10 machos y 10 hembras) procedentes de la Zona de Conservación Ecológica Estero El Salado (ZCEEES).

Se colocaron 10 redes de niebla en línea recta (seguida una de otra) de 12 metros de largo por 3 metros de altura, que se activaron a partir del ocaso (19:00-20:00 horas, dependiendo del huso horario) y permanecieron abiertas durante 5 horas, haciendo revisiones cada 30 minutos. Los murciélagos capturados fueron liberados de las redes con guantes de carmaza y colocados en bolsas de manta para ser trasladados al área de campo. A cada organismo se le tomaron los datos convencionales: peso, mediante pesolas de 100 gr (ejemplar dentro de la bolsa de manta), medida del antebrazo derecho con ayuda de un vernier, sexo y estado reproductivo (inactivo, testículos escrotados, lactante, post-lactante, preñada), edad aproximada con la observación de la osificación de las epifisis, y finalmente con ello se determino la especie. Posteriormente se tomo una muestra de sangre de la vena radial (izquierda o derecha) con una lanceta estéril, y con tan solo una gota, se realizaron dos frotis delgados, que se secaron al aire libre.



En el laboratorio, las muestras se fijaron en etanol absoluto por 10 minutos y se tiñeron con naranja de acridina (colorante específico para ácidos nucleicos), luego se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Zeiss, con objetivo 100X y se realizó un conteo de la frecuencia de EMN/10,000 ET, EPCMN/1,000 EPC y EPC/1,000 ET intra e interespecífica.

Para el análisis estadístico de los resultados se realizó estadística descriptiva, promedio \pm desviación estándar para cada grupo (por especie y sexo) y luego un análisis comparativo intra e interespecífico mediante la prueba *U de Mann Whitney*, con un valor de significancia de $P \leq 0.05$.

5. RESULTADOS

Los murciélagos *Artibeus lituratus* presentaron una frecuencia de EMN 6.60 ± 3.28 mientras los *A. jamaicensis* 4.86 ± 2.83 . El promedio y desviación estándar de los valores de EMN, EPCMN Y EPC por especie y sexo se muestran en los cuadros 1 y 2.

Los resultados obtenidos mediante la prueba *U de Mann Whitney* ($P \leq 0.05$) muestran que no hubo diferencia estadísticamente significativa intra e interespecífica (sexo y especie) entre *Artibeus jamaicensis* y *A. lituratus*.

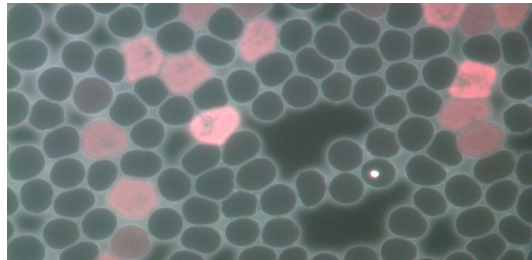


Fig.2. La figura muestra un Eritrocito normocromático Micronucleado (EMN) en frotis de sangre periférica de murciélago. Nótese al MN como un pequeño círculo brillante dentro de la célula.

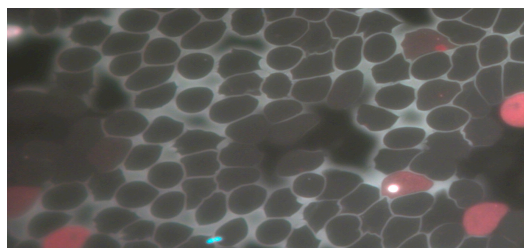


Fig.3. Se observan Eritrocitos Policromáticos (color rojo) y un eritrocito Policromático Micronucleado (EMN) en frotis de sangre periférica de murciélago.



Cuadro 1. Frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN)/10,000 eritrocitos totales (ET); eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y eritrocitos policromáticos (EPC) en Murciélagos *Artibeus lituratus*.

Valores de micronúcleos	<i>Artibeus lituratus</i> (machos y hembras) (n=35)	Valores por sexo de <i>A. lituratus</i> (hembras) (n=23)	Valores por sexo de <i>A. lituratus</i> (machos) (n= 12)	Zona muestreo
EMN	6.60 ± 3.28	7.02 ± 2.13	6.18 ± 4.21	Estero El Salado
EPCMN	1.10 ± 1.09	1.23 ± 1.18	0.97 ± 1.03	Estero El Salado
EPC	36.37 ± 10.62	38.94 ± 9.82	33.80 ± 11.28	Estero El Salado

Valores promedio ± desviación estándar de los valores de EMN, EPCMN y EPC; n = tamaños de muestra. Se aplico prueba *U* de Mann-Whitney con valor de $P \leq 0.05$.

Cuadro 2. Frecuencia de eritrocitos micronucleados (EMN)/10,000 eritrocitos totales (ET); eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) y eritrocitos policromáticos (EPC) en Murciélagos *Artibeus jamaicensis*.

Valores de micronúcleos	<i>Artibeus Jamaicensis</i> (machos y hembras) (n= 28)	Valores por sexo de <i>A. jamaicensis</i> (hembras) (n=10)	Valores por sexo de <i>A. jamaicensis</i> (machos) (n= 18)	Zona muestreo
EMN	4.86 ± 2.83	4.45 ± 2.59	5.27 ± 3.13	Estero El Salado
EPCMN	1.07 ± 0.97	0.97 ± 1.13	1.17 ± 0.82	Estero El Salado
EPC	44.49 ± 23.44	43.81 ± 18.78	45.18 ± 28.39	Estero El Salado

Valores promedio ± desviación estándar de los valores de EMN, EPCMN y EPC; n = tamaños de muestra. Se aplico prueba *U* de Mann-Whitney con valor de $P \leq 0.05$.

6. CONCLUSIONES

Al presentar una frecuencia promedio de alrededor de 6 EMN, los murciélagos *Artibeus lituratus* y *A. jamaicensis* independientemente del sexo pueden ser considerados como posibles bioindicadores de genotóxicos ambientales mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica. Sin embargo, es importante resaltar que la especie *Artibeus lituratus* al presentar ligeramente un incremento en la frecuencia de EMN, así como una mayor abundancia pueden ser una mejor opción.



7. BIBLIOGRAFIA

1. Barnard, S. Bats in captivity. The United States of America: Logos press. 2009.
2. Gannon, W., Sikes, R. & The animal care and use committee of the American Society of Mammalogists. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. Journal of Mammalogy. Vol. 88, 3, 2007, pp. 809-823.
3. Mojica de León, C. Determinación de potencial teratogénico de toxina botulínica (botox y xeomen) en eritrocitos de sangre periférica de ratones, mediante la prueba de micronúcleos. Tesis de posgrado de especialidad en cirugía plástica y reconstructiva. Universidad de Guadalajara. Jalisco. 2013
4. Ramos-Ibarra, M. Implementación de un modelo *in vivo* para estudios de toxicología genética mediante el conteo de eritrocitos micronucleados en sangre periférica de la ardilla gris (*Sciurus aureogaster*). Tesis de grado, Maestría en Farmacología. Universidad de Guadalajara. Jalisco. 2002
5. Schmid, W. The micronucleus test. Mutation research. Vol. 31, 1975, pp. 9-15.
6. Zúñiga-González, G. Selección de animales para ser utilizados como indicadores de agentes genotóxicos mediante el conteo de micronucleos. Tesis de Doctorado. Universidad de Guadalajara. Jalisco. 1996.
7. Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B., Ventura-Aguilar, A., Ramos-Ibarra, M., Ramos-Mora, A., Ortiz, G. & Gallegos-Arreola, M. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal especies (mammals, reptiles and birds): part two. Mutation Research. 467, 2000, pp. 99-103.
8. Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Zamora-Pérez, C., Gómez-Meda, B., Ramos-Ibarra, M., Martínez-González, S., González-Rodríguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D. & Gallegos-Arreola, M. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among Young and adult animals including humans spontaneous micronuclei in 43 species. Mutation Research. 494, 2001, pp. 161-166.