

GENERACIÓN 1998B – 2003A

CÓDIGO 395372139

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

División de Ciencias Biológicas y Ambientales



***Callithrix jacchus*: UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE  
GENOTÓXICOS MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN  
SANGRE PERIFÉRICA**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

**Erika Janet Hernández Sánchez**

Zapopan, Jalisco, Mayo 2004



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. ERIKA JANET HERNÁNDEZ SÁNCHEZ  
PRESENTE.

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de TESIS E INFORMES opción Tesis con el título: "*Callithrix jacchus*: UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE GENOTÓXICOS MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA ", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la M.C. BELINDA CLAUDIA GÓMEZ MEDA y como asesor/a el/la M.C. ANA LOURDES ZAMORA PÉREZ y DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 6 de febrero del 2004



DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN  
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

*Leticia Hernández López*  
M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. M.C. BELINDA CLAUDIA GÓMEZ MEDA.-Director del Trabajo  
c.c.p. M.C. ANA LOURDES ZAMORA PÉREZ.-Asesor del Trabajo  
c.c.p. DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA.-Asesor del Trabajo  
c.c.p. Archivo

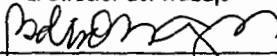
MERL/LHL/mam


C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN  
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E

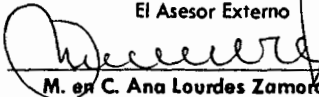
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación modalidad de Tesis e Informes opción Tesis con el título: *Callithrix jacchus*: UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE GENOTÓXICOS MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE PERIFÉRICA, que realizó la pasante: Erika Janet Hernández Sánchez, con el número de código 395372139 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
Las Aguas, Zapopan, Jal., 9 de Marzo del 2004

El Director del Trabajo  
  
M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda  
Nombre y Firma

El Asesor Interno  
  
Dr. en C. Carlos Álvarez Moya  
Nombre y Firma

El Asesor Externo  
  
M. en C. Ana Lourdes Zamora Pérez  
Nombre y Firma



Sinodales

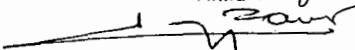
1.- Dra. en C. GALINA PETROVNA ZAITSEVA  
Nombre Completo

  
Firma

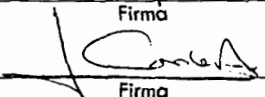
2.- M. en C. SILVIA JOSEFINA LÓPEZ PÉREZ  
Nombre Completo

  
Firma

3.- M.V.Z. ALBERTO RAMOS MORA  
Nombre Completo

  
Firma

(Suplente) Dr. en C. CARLOS ÁLVAREZ MOYA  
Nombre Completo

  
Firma

***Callithrix jacchus*: UNA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE  
GENOTÓXICOS MEDIANTE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS  
EN SANGRE PERIFÉRICA**

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta:

*Erika Janet Hernández Sánchez*

Dirección de Tesis:

M. en C. Belinda Claudia Gómez Meda

Asesoría de Tesis:

M. en C. Ana Lourdes Zamora Perez

Dr. en C. Carlos Álvarez Moya

Este trabajo se realizó en el  
LABORATORIO DE MUTAGÉNESIS  
Centro de investigación Biomédica de Occidente  
Instituto Mexicano del Seguro Social

Colaboradores:

Biol. Cecilia M. Batista González

M. en C. María Luisa Ramos Ibarra

Dr. en C. Guillermo Zúñiga González

El secreto de la felicidad  
no es hacer siempre lo que se quiere,  
sino querer siempre lo que se hace.

León Tolstoi

### AGRADECIMIENTOS:

A **Dios**, por dejarme vivir, por poder cerrar una etapa mas en mi vida, para empezar otro y esperando poderlo terminar.

A mis **papás** Yolanda y José, porque hicieron su mayor esfuerzo para que saliera adelante en la vida, trayendo en mi corazón su educación y valores a seguir, y sobre todo su cariño y apoyo, para que yo tenga bajo el brazo mi carta de presentación en la vida.

A mis **hermanos** José, Mónica, Myrna, por siempre estar al pendiente de mi, y estando presente en cada paso de mi vida.

A mi **novio** Arturo, por apoyarme, y ayudarme en los momentos difíciles de la vida, por estar conmigo, por amarme.

Al laboratorio de Mutagénesis: a **Memo**, por ser tan sencillo, por aceptarme en su laboratorio, y confiar en mí; a **Belinda**, por ayudarme a terminar este trabajo, orientarme y aconsejarme para mi formación profesional en la vida; a **Anita**, por contagiarme de optimismo y alegría, y escuchándome en los momentos difíciles; a **Cecy**, por su amistad, confianza, y apoyo dentro y fuera del laboratorio; a **María Luisa** por ayudarme a integrar mi formación profesional y llevarlo a cabo dentro de un laboratorio. A todos gracias por brindarme su cariño y amistad.

Al M.V.Z. Alberto Ramos, por sus consejos y apoyo, porque aparte de ser un buen profesor, es un buen amigo.

Esta tesis se la dedico en memoria de mi papá: José Hernández Vizuett, que sé que siempre estará conmigo y estaría orgulloso de mí, porque gracias a el pude terminar un sueño de dos.

Te quiero y te extraño papá.....

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	2
◦ Pruebas de genotoxicidad	2
◦ Micronúcleos	3
◦ Prueba de micronúcleos	4
◦ Agentes micronucleogénicos	4
◦ Ciclofosfamida	6
◦ Eritrocitos	6
◦ Sistema reticuloendotelial	9
◦ Bioensayos	11
◦ Primates	13
◦ Primates en la investigación	13
◦ Taxonomía en primates	14
◦ Marmoseta común	17
◦ Características generales	17
◦ Enfermedades	18
<b>HIPÓTESIS</b>	22
<b>OBJETIVOS</b>	23
◦ General	23
◦ Específicos	23
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	24
◦ Sede	24
◦ Selección de organismos	24
◦ Manejo de animales	24
◦ Grupos de trabajo e Inducción de células micronucleadas	26
◦ Preparación y análisis de las muestras	27
◦ Variables	29
◦ Criterios	29
◦ Consideraciones éticas	29
◦ Diseño	29
◦ Análisis estadístico	29
◦ Diagrama de flujo	31
<b>RESULTADOS</b>	32
<b>DISCUSIÓN</b>	34
<b>CONCLUSIONES</b>	41
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	42

<b>GLOSARIO</b>	50
<b>ANEXO A</b>	51
° Mecanismos de adquisición y posesión de los especímenes	51
° Inscripción o actualización en el padrón de colecciones científicas museográficas públicas o privadas de especímenes silvestres.	51
° Formato de solicitud	55
° Instructivo para llenar la solicitud	57
° Permiso de Colección Científica otorgado por SEMARNAT	58
<b>FIGURAS</b>	
° 1: Formación de micronúcleos	3
° 2: Células micronucleadas en diferentes tejidos	5
° 3: Eritrocitos en diferentes especies	8
° 4: EPC de sangre periférica con diferentes tinciones	9
° 5: Árbol de EMN en especies de primates	16
° 6: Marmoseta común o de orejas blancas ( <i>Callithrix jacchus</i> )	18
° 7: Hábitat, tipos de nido y alimentación	25
° 8: Administración de dosis	27
<b>CUADROS</b>	
° I: Análisis de los grupos de estudio	32
<b>GRÁFICAS</b>	
° 1: Análisis de los grupos de estudio	33



## RESUMEN.



INSTITUTO CIENTÍFICO CENTRAL

El objetivo del presente es demostrar que el primate de la especie *Callithrix jacchus* puede ser un modelo para estudios de genotoxicidad de nuevos fármacos mediante la prueba de micronúcleos en sangre periférica, de manera sencilla y rápida, ya que sólo se requiere una gota de sangre, portaobjetos y colorantes; además, esta especie está filogenéticamente clasificada en el mismo orden que el humano, con tamaño y peso menor al de una rata, fácil manejo y reproducción en cautiverio, lo cual da ventajas adicionales para su mantención en un bioterio.

Para la demostración del modelo, se trabajaron 2 grupos con 5 animales cada uno, en los que se probaron un grupo control y un grupo experimental, al que se le administró un compuesto de conocida micronucleogenicidad. El grupo 1 recibió 200  $\mu$ l de agua y el grupo 2 recibió ciclofosfamida a dosis de 5 mg/Kg en 200  $\mu$ l de agua; la administración fue cada 24 horas por 2 días seguidos. Las muestras se tomaron a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas por corte de una garra para obtener una gota de sangre. Se contaron los eritrocitos policromáticos (EPC) en 1,000 eritrocitos totales (ET), eritrocitos micronucleados (EMN) en 10,000 ET y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en 2,000 EPC. Los resultados mostraron incremento de EMN en el grupo de ciclofosfamida, con significancia en los EPCMN ( $P < 0.03$ ), mientras el control de agua se mantuvo sin cambios. Con lo anterior se concluye que los incrementos obtenidos en los resultados de los monos del grupo tratado, aún y cuando se utilizaron dosis muy bajas de ciclofosfamida, que esta especie puede ser un adecuado bioindicador en la evaluación de la genotoxicidad de compuestos o nuevos fármacos. Asimismo, se muestran las condiciones requeridas para la mantención y manejo de los especímenes en el laboratorio.

## ANTECEDENTES.

Todos los organismos vivos están expuestos constantemente a elementos que por sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas, al ser ingeridos, inhalados, aplicados tópicamente o inyectados, son capaces de provocar alteraciones orgánicas, funcionales y aún la muerte <sup>1,2</sup>. Tal exposición puede ser inadvertida, accidental o incluso inevitable o intencional. Algunos de estos elementos son "inocuos", pero una parte de ellos pueden provocar reacciones biológicas de naturaleza farmacológica o tóxica. A menudo estas reacciones dependen de la conversión de las sustancias absorbidas en un metabolito activo, que puede provocar con ello fenómenos de mutagenicidad, teratogenicidad o carcinogenicidad <sup>3-6</sup>.

### Pruebas de genotoxicidad.

Las pruebas para la detección de agentes que dañan al ADN son de gran importancia, ya que los compuestos genotóxicos tienen la capacidad de alterar el material genético en los organismos, incluido el hombre <sup>7</sup>, además pueden tener efectos teratogénicos <sup>8</sup>, causar mutaciones en células germinales <sup>7</sup>, inducir enfermedades cardíacas <sup>7,9</sup>, influir en procesos de envejecimiento <sup>7</sup>, e inducir mutaciones en células somáticas que pueden contribuir al desarrollo del cáncer <sup>10-12</sup>.

Algunas de las pruebas utilizadas para detectar daño genético son: el cariotipo, el estudio del índice mitótico (IM), el intercambio de cromátides hermanas (ICH), el ensayo cometa, el estudio de la inducción de apoptosis, la prueba de Ames y la prueba de micronúcleos (MN) <sup>13</sup>.

La prueba de MN se realiza en tejidos con rápida proliferación celular <sup>14,15</sup>, sin embargo, la manera más sencilla es utilizar una gota de sangre, cuando esto es factible.

La prueba de eritrocitos micronucleados (EMN) en sangre periférica <sup>13,16,17</sup> ofrece resultados claros y contundentes, con la posibilidad de trabajarla *in vivo* y la necesidad

de sólo una gota de sangre para el estudio, lo que la hace una prueba sencilla, rápida y económica.

### Micronúcleos.

Los MN son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedan fuera del núcleo en mitosis <sup>16,18</sup>. En hematología, los MN se conocen como cuerpos de Howell-Jolly cuya forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 1/20 a 1/5 (0.4 a 1.6  $\mu$ ) del tamaño normal de un eritrocito (6 a 8  $\mu$  de diámetro) <sup>16,19</sup>. Éstos se presentan de manera espontánea en sangre periférica en algunas especies <sup>20-22</sup> e incrementan cuando el organismo se expone a genotóxicos <sup>23,24</sup>. Su formación se basa en que en anafase, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo, por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático, situación que sucederá también en los cromosomas completos en los que el huso mitótico se dañe. Después de la telofase, los cromosomas normales darán origen a los núcleos de las células hijas. Los elementos rezagados quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas y una proporción de éstos es transformada en uno o varios núcleos secundarios, mucho más pequeños que el núcleo principal, por lo que son llamados MN (Figura 1) <sup>18</sup>.

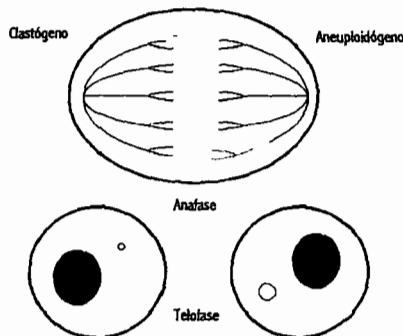


Figura 1. Formación de Micronúcleos (MN en color rojo)

### **Agentes micronucleogénicos.**

Los agentes micronucleogénicos se clasifican en dos tipos, con base en su mecanismo de acción, los cuales pueden ser:

- o Aneuploidógenos: Agentes que bloquean la formación del huso mitótico, con lo que se origina rezago de cromosomas completos, que no serán incluidos en los núcleos de las células hijas <sup>25-27</sup>, como por ejemplo la colchicina, taxol, vincristina y vinblastina.
- o Clastógenos: Agentes que rompen las hebras de ADN. Pueden ser análogos de base y actuar por intercalarse en el ADN, con lo cual se inhibe su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlaces, que termina por producir fracturas cromosómicas <sup>28</sup>, como por ejemplo las radiaciones y medicamentos antineoplásicos como la ciclofosfamida, arabinosa-c y metotrexate, entre otros.

### **Prueba de MN.**

La prueba de MN *in vivo* permite detectar agentes con acción tanto clastogénica, que rompen cromosomas, como agentes aneuploidogénicos, que dañan el huso mitótico, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados, que al quedar fuera del núcleo forman éstas estructuras. Ambos efectos se diferencian por el tamaño de los MN <sup>18,18,25,29,30</sup>.

Dentro de las ventajas de la prueba de MN se incluyen la facilidad y rapidez del estudio, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular, la posibilidad de probar un solo químico sin otros compuestos, y el hecho de que los MN formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase <sup>18,18,31</sup>.

La prueba de MN se puede realizar en un gran número de especies, ya que la condición esencial es que el tejido se divida. Esta prueba es posible aplicarla en humanos <sup>26</sup>, animales de laboratorio y fauna silvestre <sup>18,21,32-34</sup> y en gran variedad de

tejidos, como eritrocitos policromáticos (EPC) de médula ósea, eritrocitos de sangre periférica <sup>16,21,34,35</sup>, linfocitos <sup>30,36</sup>, hepatocitos <sup>14</sup>, células germinales <sup>37</sup> y en células epiteliales de mucosa bucal <sup>38</sup> o incluso en células de la muda del *Ambystoma* (Figura 2). En cuanto a animales de laboratorio, los más comunes son rata <sup>39</sup>, ratón <sup>30,40</sup> y hámster <sup>18</sup>, y otros no tan comunes como el gato <sup>23</sup> y algunos primates <sup>32</sup>. Por lo tanto, utilizar organismos bioindicadores, que de manera natural puedan dar información, es una alternativa muy económica y de gran provecho para la salud humana.

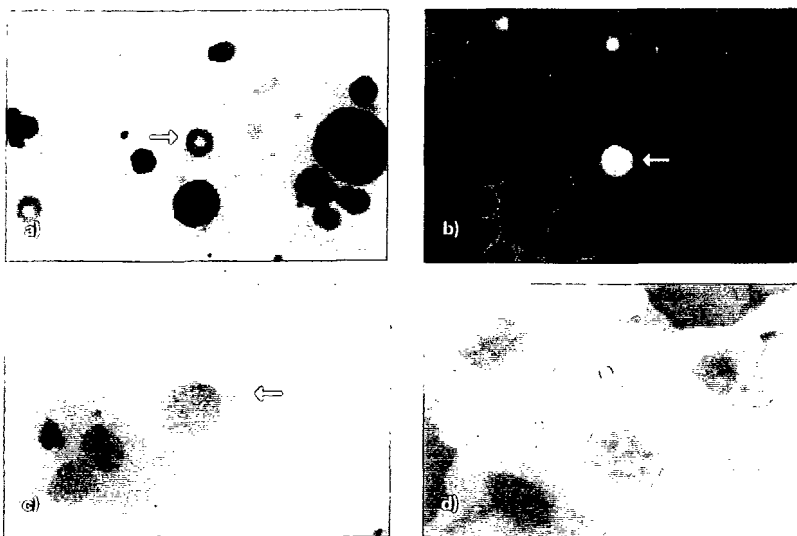


Figura 2. Células Micronucleadas en Diferentes Tejidos. a) Médula ósea de ratón; b) Sangre periférica de delfín; c) Mucosa bucal de humano; d) Muda de *Ambystoma*.

Dado que la presencia de MN se traduce en el ámbito celular como pérdida de ADN, esta técnica es entonces una alternativa muy eficaz para el monitoreo de genotóxicos de manera fácil, sencilla, rápida y con resultados contundentes. Además, la prueba de MN no deja duda del daño en el ADN, ya que es claro que los MN incrementan cuando los organismos son expuestos a genotóxicos con acción micronucleogénica

### **Ciclofosfamida.**

La ciclofosfamida es un tipo especial de alquilante clastógeno químicamente relacionada con la mostaza nitrogenada; está considerada como carcinogénica, mutagénica y teratogénica, además la ciclofosfamida es un conocido agente micronucleogénico, por lo que es utilizada como control positivo en pruebas de genotoxicidad <sup>27,42-51</sup>.

Es una droga que requiere activación hepática inicial por el sistema de las oxidasas del citocromo P450 para adquirir propiedades citotóxicas. Su actividad antitumoral depende de su biotransformación en mostaza fosforamida y acroleína. Estas formas activas alquilan o se unen con diversas estructuras intracelulares, como los ácidos nucleicos. Aún cuando no se conocen detalles del proceso, su acción citotóxica final depende de la formación de enlaces cruzados con las cadenas de ADN y ARN, y de la inhibición de la síntesis de proteínas. Esto produce un desequilibrio en el crecimiento intracelular, lo que conduce a la muerte celular. Su acción es inespecífica sobre el ciclo celular, y su efecto se manifiesta cuando la célula entra en fase G2 (premitótica). En combinación con otras drogas es utilizada ampliamente en tratamientos contra el cáncer, además, tiene propiedades inmunosupresoras muy importantes; esta acción tiene aplicación clínica y es útil al inhibir el rechazo de órganos después del trasplante y en el tratamiento de padecimientos no neoplásicos asociados a trastornos inmunológicos. Un porcentaje de la ciclofosfamida se elimina sin cambios (25%) o en forma de metabolitos por la orina. La vida media plasmática varía de 4 a 6 ½ horas <sup>49,51</sup>.

### **Eritrocitos.**

Los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes) son un elemento de la sangre periférica de los organismos <sup>52</sup>. En el hombre, la forma madura del eritrocito adulto normal es un disco bicóncavo, con diámetro promedio de 8  $\mu$ , espesor de 2  $\mu$  y volumen de 90

$\mu^3$ . En frotis teñidos, se observan como corpúsculos circulares con borde neto y liso <sup>53-</sup>

<sup>56</sup>

El glóbulo rojo está formado de 60 a 70% por agua, una matriz de sustancias orgánicas e inorgánicas (hasta 5% del volumen del eritrocito), y aproximadamente 33% de su volumen consiste en hemoglobina, la cual realiza la función de transporte de gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ). El eritrocito normal tiene una longevidad limitada en la circulación, de  $120 \pm 20$  días <sup>53-55</sup>.

El eritrocito de los mamíferos carece de núcleo; los demás vertebrados tienen glóbulos rojos nucleados. Las formas de los eritrocitos, dependen de la especie y se pueden observar desde bicóncavos hasta elípticos <sup>53</sup> (Figura 3). Es normal encontrar variaciones en el tamaño de los eritrocitos ya que los más jóvenes son un poco más grandes y disminuyen ligeramente con su edad. El eritrocito policromático (EPC) o eritrocito con basofilia difusa recién ha perdido el núcleo, pero aún mantiene un tinte azulado con la tinción de giemsa y wright, y es ligeramente mayor que el eritrocito maduro. Cuando se tiñen con un colorante supravital como el azul de cresil, revelan un retículo granulofilamentoso (polisomas y retículo endoplásmico), por lo que se llaman reticulocitos

<sup>19</sup>

Por otro lado, para determinar citotoxicidad se utiliza como parámetro la cantidad de EPC presentes en la circulación sanguínea, ya que ésta proporción de células es constante pero suele alterarse si el individuo recibe compuestos citotóxicos (valor que puede disminuir hasta quedar en cero), lo que indica mielodepresión en la médula ósea.

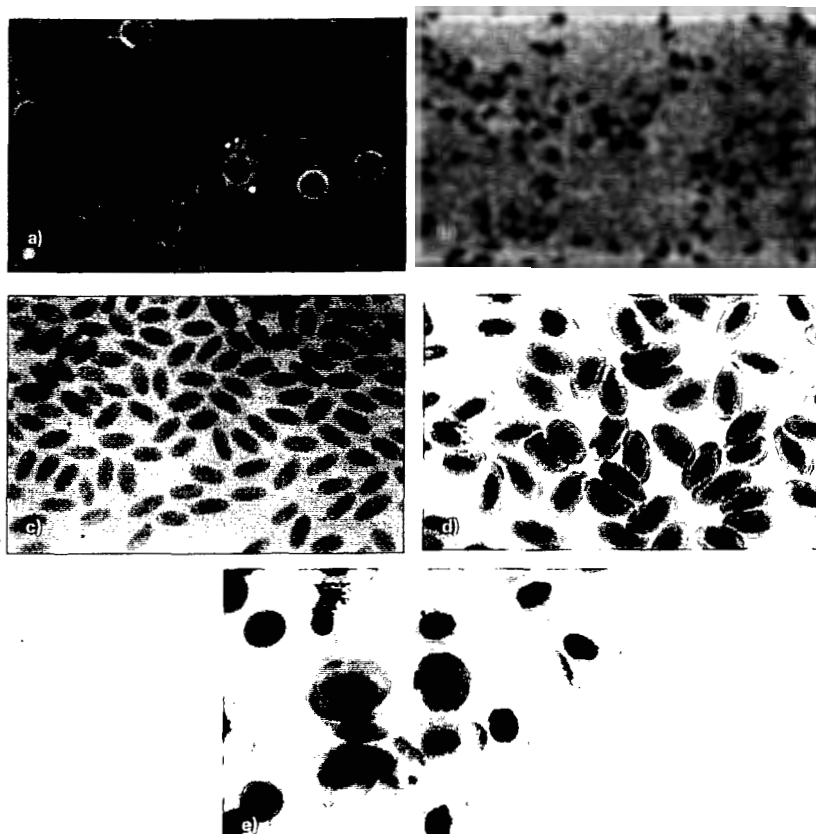


Figura 3. Eritrocitos en diferentes especies. a) Delfín; b) Venado; c) Llama; d) Tórtola; e) Sapo.

Es importante tomar en cuenta que debido a que los EPC no pierden los ribosomas por aproximadamente 24 horas después de la enucleación, estos se tiñen de color azul-gris con el colorante de giemsa <sup>17</sup> o de color rojo o naranja con el colorante anaranjado de acridina, debido a su gran contenido de ARN <sup>32,40,56</sup> (Figura 4), lo que facilita su identificación cuando se pretende contarlos en pruebas de períodos cortos de exposición, ya que estos eritrocitos después de 24 horas se transforman en eritrocitos normocromáticos (ENC) por lo que una de las maneras de utilizar la prueba de MN es



mediante el conteo de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) ya que estos reflejan el daño producido pocas horas antes por un compuesto <sup>18,22</sup>.

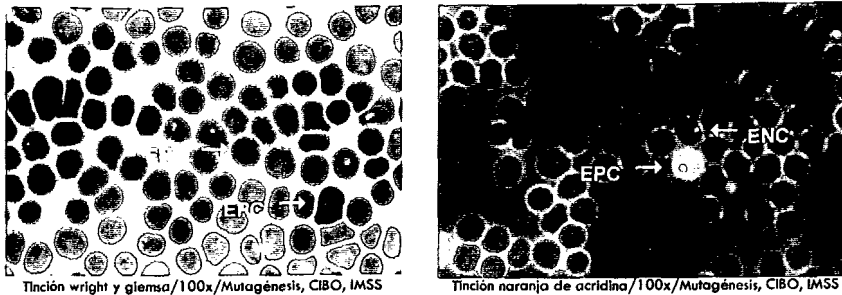


Figura 4. EPC de sangre periférica con diferentes tinciones.

En la formación del eritrocito, después de que el eritroblasto expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito (en mamíferos, aproximadamente cinco horas después de completar la última mitosis), por razones no conocidas los MN permanecen en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y es entonces cuando es posible visualizarlos <sup>18,19</sup>.

#### Sistema Reticuloendotelial.

El sistema reticuloendotelial es el encargado de retirar a los eritrocitos con alteraciones, incluidos los eritrocitos micronucleados (EMN), entre otras anomalías presentes <sup>20</sup>. El bazo, como parte del sistema reticuloendotelial, filtra la sangre, elimina partículas extrañas mediante células fagocíticas, y destruye o elimina a los eritrocitos viejos o sus fragmentos. Cuando los eritrocitos envejecen, ocurren ciertos cambios que reducen su flexibilidad, esto dificulta su paso por la microcirculación y en algún momento se produce lisis celular o fagocitosis y eliminación por el sistema reticuloendotelial. Aunque todas las células reticuloendoteliales participan en la destrucción de los eritrocitos viejos, las del bazo están situadas anatómicamente, de tal modo que son los detectores más sensibles de cualquier anomalía eritrocítica <sup>54,57</sup>. En este sentido, existen especies que tienen alta eficiencia de su sistema reticuloendotelial para retirar los eritrocitos anormales,

lo que hace que no se puedan observar EMN en sangre periférica, mientras que en otras se pueden observar estas estructuras en cualquier momento de su vida.

En el humano, el número de EMN es prácticamente nulo, pero los podemos observar cuando la persona tiene un mal funcionamiento del bazo <sup>16,19,58,59</sup>, o cuando ha sido esplenectomizado <sup>3,60</sup>. Esta última condición es como se pueden tener los datos precisos cuando se quiere conocer la genotoxicidad de los fármacos administrados a los pacientes <sup>60,61</sup>. Sin embargo, cuando el requerimiento es el de probar un nuevo fármaco, razones éticas obvias descartan esta posibilidad y es entonces cuando los bioensayos nos dan la oportunidad de probar dichos compuestos.

Por otro lado, se ha descrito que la variabilidad en el número de EMN está influenciada por la edad; pacientes esplenectomizados adultos y niños, mostraron diferencias en el número de EMN en sangre periférica, siendo mayor en adultos con respecto a niños <sup>60,61</sup>. Estudios en roedores apoyan lo anterior, pues se ha encontrado que la frecuencia de espermátides micronucleadas es más alta en ratones y hámsters viejos cuando se comparan con controles jóvenes <sup>62,63</sup>. En este sentido, además han sido descritas diferencias en el número de EMN espontáneos debidas a la inmadurez del sistema reticuloendotelial en etapas juveniles, por lo que son entonces incapaces de retirar de la circulación estas estructuras y conforme el organismo madura se va haciendo más eficiente, tal que puede removerlos de la circulación hasta ser casi imperceptibles en su etapa adulta, como es el caso del humano y la rata <sup>60</sup>. Por otro lado, hay especies que de manera espontánea presentan EMN en gran cantidad en todas las etapas de su vida, lo cual nos permite emplearlos como modelos experimentales para probar genotóxicos, debido a que al presentar EMN de manera natural, querrá decir que su sistema reticuloendotelial no es muy eficiente en remover estas estructuras y por tanto, al ser expuestos a genotóxicos micronucleogénicos estos valores se incrementarán por acumulación, permitiéndonos tener una apreciación más clara del efecto del compuesto, lo cual no sucedería con especies que presenten valores muy bajos de EMN. En éstos, se ha probado que aún con la inducción de MN

por la administración de un compuesto, el incremento no sería evidente, ya que los EMN formados son rápida y efectivamente capturados y destruidos por el bazo, sin permitirnos observarlos en sangre periférica <sup>69</sup>, por lo que, para evaluar compuestos optamos por utilizar organismos que presenten de manera espontánea valores de EMN mayores a 6 en 10,000 ET.

Asimismo, en la literatura se ha descrito que la sensibilidad para la inducción de MN respecto al sexo, puede ser atribuible a diferencias enzimáticas y/o hormonales encontradas entre machos y hembras <sup>64,65</sup>.

### **Bioensayos.**

Los bioensayos ofrecen la ventaja de que un organismo vivo puede transformar un compuesto cualquiera a metabolitos que podrían ser aun más tóxicos que el compuesto original <sup>66</sup>. Es importante mencionar que muchas sustancias mutagénicas u oncogénicas deben su acción a un producto posterior a su metabolismo en el hígado <sup>67</sup>. Numerosos químicos medioambientales e industriales, así como la administración de fármacos, producen daño genético en animales experimentales con resultados consistentes, este potencial para efectos similares en el humano es obvio <sup>18</sup>, por lo que realizar estudios acerca de los efectos genotóxicos de los compuestos en animales es una herramienta de gran utilidad.

Existen diversos organismos en los que se realiza la prueba de MN, los más utilizados son los roedores <sup>18,30,31,68,69</sup> y particularmente el ratón <sup>2,31,69</sup>, el cual ha sido históricamente la especie con la que más se ha trabajado.

Con base en estudios previos nos hemos dado a la tarea de identificar a las especies con más EMN espontáneos, con la finalidad de proponerlas como biomonitores para evaluar efectos genotóxicos de los compuestos, sobre todo si estos serán de uso humano. A este respecto, en el transcurso de las investigaciones que hemos realizado, se han establecido algunos puntos:

- o Se conoce que el humano presenta un número basal de EMN en sangre periférica cercano a cero y que aún cuando reciba drogas genotóxicas antineoplásicas de conocida micronucleogenicidad, este valor no se eleva de manera importante debido a la eficiencia del bazo <sup>19,60,68</sup>.
- o Algo similar se observa en el conejo, que desde un valor basal bajo, no incrementa sus EMN con inductores micronucleogénicos, ni con la esplenectomía e inductores <sup>20</sup>.
- o Se han estudiado algunas aves, reptiles y anfibios con números bajos de EMN, los cuales nunca incrementaron sus EMN cuando fueron inducidos con micronucleogénicos conocidos <sup>34</sup>.
- o El gato con 8.4 y la ardilla gris con 9.1 EMN, responden al estímulo con genotóxicos, con lo cual se incrementa su número de EMN periféricos <sup>23,24</sup>.
- o El ratón presenta 21.4 EMN/10,000 eritrocitos y ha sido utilizado como un biomonitor de genotóxicos mediante el conteo de eritrocitos policromáticos (EPC) y reticulocitos en pruebas de exposición aguda <sup>31</sup>.

Asimismo, observamos que en los organismos con mayor número de EMN espontáneos, el sistema reticuloendotelial (encargado de retirar a los EMN) tiene un menor control sobre éstos y podemos observar variaciones como resultado de su acumulación, por lo cual hemos continuado con la identificación de dichas especies, ya que éstos, como se dijo antes, son los que tienen más posibilidad de ser futuros bioindicadores de genotóxicos micronucleogénicos <sup>20-22,24,34,70</sup>.

Como se mencionó, para la prueba de MN, la especie que ha sido utilizada por su efectividad, costo, facilidad para el manejo y accesibilidad, es el ratón. Sin embargo, existen especies más cercanas al hombre como aquellas que se encuentran dentro del Orden de los Primates, al cual pertenecemos, lo que da opciones adicionales para el estudio de fármacos con modelos experimentales.

## **Primates.**

El orden de los Primates es de particular interés para el hombre, porque sus especies son filogenéticamente más cercanas al humano y porque sus miembros exhiben una fantástica variedad de adaptaciones estructurales y conductuales a sus ambientes <sup>71</sup>. Éstos, como animales de laboratorio, son muy costosos, tanto para adquirirlos como para su manutención y reproducción en cautiverio <sup>72</sup>. Aun así, durante los pasados 20 años se han estado empleando como un potencial modelo en estudios de diversos campos, como biomédicos, comportamiento, neurofisiología, nutrición y reproducción <sup>32,73-74</sup>.

## **Primates en la investigación.**

El uso de primates como modelos de experimentación es una realidad y cada vez es mayor el número de especies útiles para estos fines <sup>73,77-79</sup>. Esto conlleva a conocer más sobre sus hábitos <sup>74</sup>, procesos fisiológicos <sup>80</sup>, padecimientos más comunes <sup>81,82</sup> y su biología, con la intención de poder suministrarles las condiciones más adecuadas durante su estancia dentro del laboratorio <sup>75,78,83-86</sup>.

En este sentido, una vez que se considere trabajar con primates en el laboratorio, hay tres aspectos importantes que se deben tomar en cuenta para el uso de primates en la investigación, que son:

1. No utilizar un primate cuando se tiene opción de otro animal y de ser así, seleccionar un primate adecuado para el trabajo.
2. Utilizar a los primates solamente en la última fase de la investigación, después de que las pruebas se hayan hecho utilizando otros animales de laboratorio y como estudio preliminar de la fase clínica.
3. Brindar a todos los primates condiciones adecuadas durante el periodo de experimentación y mantenerlos en jaulas de laboratorio solamente en tiempos de experimentación.

Tomando en consideración estos puntos, al valorar el potencial de la información que se pueda obtener de experimentar con primates, se han realizado diversos trabajos con diferentes enfoques y finalidades, aunque en el campo de la genotoxicidad, mediante la prueba de MN, los estudios se han mantenido estacionarios, aunque se puede encontrar una publicación de MN en linfocitos de médula ósea de macacos <sup>32</sup> y hasta hace poco tiempo fue que nuestro grupo describió especies de primates que presentan de manera espontánea EMN en sangre periférica <sup>22,70</sup>, lo que facilita los ensayos, ya que se pueden realizar sin necesidad de tantos requerimientos, como sería para la prueba con linfocitos o con médula ósea, además de que los primates sugeridos para estos estudios suelen ser de más fácil manutención y menor costo en todos sentidos, lo que hace factible trabajar con ellos la prueba de EMN y emplearlos como animales de laboratorio.

#### **Taxonomía en primates.**

A pesar de las pruebas fósiles, la interpretación sobre taxonomía y filogenia de los primates sigue siendo objeto de debate y cada nuevo descubrimiento en esta área genera más preguntas. La importancia de estudiar este Orden resulta obvia ya que las especies aquí clasificadas son las más cercanas al humano. Las pruebas del estrecho parentesco entre orangutanes, gorilas, chimpancés y ser humano son abundantes. Los análisis de las secuencias de ADN indican que probablemente los chimpancés sean los organismos vivos con más similitud al humano <sup>86</sup>.

Es indudable que las características intelectuales de los primates los separen mucho del resto de los mamíferos, sobre todo si nos referimos a los monos y al hombre; por otro lado, sus características morfológicas los colocan muy cerca del Orden de los Insectívoros, que son mamíferos muy primitivos, esta relación tan cercana se hace patente ya que la familia Tupidae, (grupo de posición incierta) tiene gran importancia como índice de relaciones filogenéticas entre los grupos <sup>87</sup>. Las semejanzas hacen

suponer que a partir de un grupo de los Insectívoros, similar a los tupáidos, ocurrió en el Paleoceno una primera radiación de los primates, representada por tres ramas evolutivas principales: lémures de Madagascar, lémures o loris de Asia y de África y por último los Tarseros. Durante el Eoceno y períodos subsiguientes se efectuó la segunda radiación de los primates (a partir de los grupos anteriores), que dio origen a los monos y al hombre, esta rama pronto se bifurcó en dos líneas, la de los monos del Viejo Mundo y el hombre <sup>71,89,87</sup>.

Por otra parte, el Orden de los Primates se ha dividido en dos semiórdenes <sup>86</sup> o subórdenes <sup>88</sup>. Los Strepsirhini, que incluye lémures, gálagos y loris, y el de los Haplorhini con los tarseros y antropoides (monos, simios y ser humano). Este esquema de clasificación indica que los tarseros comparten un ancestro común más reciente con los antropoides que con los lémures <sup>86,88,89</sup>.

Respecto a los Haplorhini, taxonómicamente están claramente diferenciados los Monos del Nuevo Mundo (Platirinos de América del Sur y Central) y los Monos del Viejo Mundo (Catarrinos de África, Asia y Europa), aunque ambos grupos evolucionaron por separado <sup>84,86,88,89</sup>.

Desde 1996 hemos trabajado en la identificación de especies que presenten EMN espontáneos <sup>20</sup>, con la finalidad de seleccionarlas para proponerlas como especies que son potenciales bioindicadores de genotóxicos ambientales micronucleogénicos <sup>23,24</sup>. Actualmente, en el laboratorio de Mutagénesis, hemos estudiado más de 150 especies <sup>20-22,70</sup> y de estas tenemos seleccionadas 20 con un buen número de EMN <sup>70</sup>. De entre las especies muestreadas hemos captado 64 muestras de 15 especies de primates, 7 del Nuevo Mundo y 8 del Viejo Mundo (incluido el humano), de las que hemos obtenido sus valores de EMN espontáneos <sup>20-22,70</sup> y hemos determinado que los primates del Nuevo Mundo presentan EMN espontáneos (Figura 5), lo cual los hace candidatos a ser monitores naturales de genotóxicos por medio de la prueba de MN <sup>22,70</sup>; esto resulta de importancia, ya que hasta hoy el ratón ha sido la especie que

por excelencia se utiliza para la prueba de micronúcleos en estudios de genotoxicidad de nuevas drogas de uso humano. El ratón se encuentra menos emparentado con el hombre y los hallazgos obtenidos en el curso de nuestras investigaciones plantean la posibilidad de utilizar algunas de las especies de primates con EMN espontáneos para realizar la última prueba de genotoxicidad que debe hacerse, antes de pasar a los estudios en humanos, con la ventaja de que se puede realizar de una manera muy sencilla.

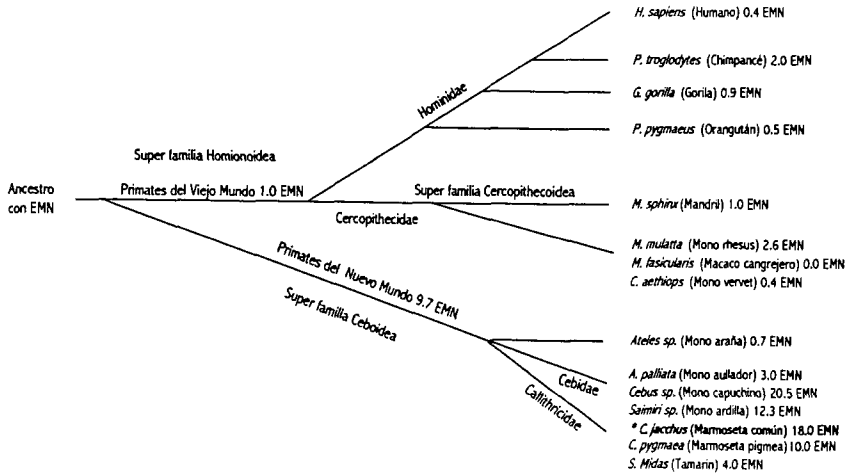


Figura 5. Árbol de EMN en especies de primates (\* n=1) 20-22,70.

Dentro de la selección de organismos con EMN espontáneos de primates del Nuevo Mundo identificamos a la Marmoseta común (*Callithrix jacchus*)<sup>70</sup> como un potencial bioindicador de agentes micronucleogénicos, la cual por sus características pueden resultar adecuados para su manutención en el laboratorio.

La Clase de los mamíferos eúterios (placentarios) se divide en Órdenes, los ratones se encuentran en el de los Roedores, mientras que la marmoseta pertenece al de los Primates, mismo en el que se encuentra el hombre, por tanto, desde un punto de



vista filogenético, la marmoseta es una de las especies descritas más cercanas al humano, con posibilidades de ser utilizadas como modelo bioindicador de agentes genotóxicos para la prueba de MN en sangre periférica.

#### **Marmoseta común (*Callithrix jacchus*).**

La especie *Callithrix jacchus* pertenece a la familia Callitrichidae <sup>72,88,90</sup>. Sus miembros son animales sociales que viven típicamente en grupos familiares <sup>71,84,90</sup>, son monos del Nuevo Mundo, pequeños, adaptables, de hábitos arborícolas diurnos, sin temporada de crianza y comúnmente llegan a tener de 2 a 3 crías con un rango de 1 a 4, el ciclo de ovulación es de 28 días aproximadamente y el periodo de gestación es de alrededor de 144 días. La marmoseta puede llegar a criar toda su vida (16 años), pero reduce su actividad a partir de los 10 años. Los adultos pueden llegar a pesar entre 386-493 g en los machos y las hembras no preñadas entre 382-600 g, mientras que el peso de las crías es de 25-35 g. Llegan a su madurez sexual entre los 18 y 24 meses, pero las hembras pueden parir a partir de los 14 meses, aunque el riesgo de aborto es muy alto. Las pérdidas neonatales son frecuentes en las tres primeras semanas de vida <sup>72,88,91</sup>.

A este tipo de monos, así como a otros monos pequeños de la Familia Callitrichidae (marmosetas, tamarines y monos Goeldi), en general se les conoce común y erróneamente como monos tití, aunque en realidad los verdaderos monos tití son los del género *Callicebus*, pertenecientes a la Familia Cebidae <sup>88,92</sup>.

#### **Características generales.**

La marmoseta común o de orejas blancas (*Callithrix jacchus*) presenta grandes mechones blancos vistosos que adornan sus orejas, mismos por los que recibe su nombre (Figura 6a,b); son plantígrados, pentadáctilos y unguiculados <sup>87</sup>, poseen sólo 32 dientes, presentan incisivos medios en forma de escoplo, faltándoles la última muela de cada serie. Tienen los dedos armados de garras salvo el primero del pie, que es muy

pequeño y lleva una uña plana (la mano se parece a la de una ardilla) <sup>90</sup> (Figura 6c), su cola con franjas blancuzcas y oscuras (Figura 6d) no es prensil, Tienen vista muy aguzada, buen oído y buen olfato, son muy vocales, viven en pequeños grupos semipromiscuos y se alimentan de frutos, insectos y exudados vegetales. Su ubicación geográfica es del este de Brasil <sup>84,92</sup>.



Figura 6. Marmoseta común o de orejas blancas (*Callithrix jacchus*)

a) marmoseta, b) mechones blancos, c) manos armadas con garras, d) cola con franjas.

#### Enfermedades.

Particularmente los primates, por su cercanía filogenética con el humano puede compartir algunas enfermedades, por lo que los cuidados y el manejo que requieren son especiales y más específicos que los que podrían requerir otras especies. Al respecto, las enfermedades más comunes que se pueden presentar en este tipo de animales son:

- **Osteodistrofia:** los animales muestran predisposición a padecer infecciones secundarias, la Osteodistrofia suele atribuirse a deficiencia prolongada de calcio o de vitamina D o a elevada proporción de fósforo en la dieta con relación al calcio necesario.
- **Diarrea:** los primates sometidos a estrés o los que siguen una dieta incorrecta pueden presentar heces líquidas.
- **Protozoos:** los primates del Nuevo Mundo son especialmente sensibles a la toxoplasmosis, por lo que no deben alimentarse con carne cruda.
- **Colitis crónica:** se desconoce la causa de la diarrea persistente asociada con inflamación del colon, aunque se observa con frecuencia en los monos títi y los tamarines.
- **Tuberculosis:** Enfermedad más común en Monos del Viejo Mundo que en los del Nuevo Mundo, ya que los primates del Nuevo Mundo son menos sensibles.
- **Rabia:** Enfermedad que puede desarrollarse en cualquier mamífero, pero que es poco común.
- ***Herpesvirus tamarinus* (Platyrrhinae):** esta enfermedad existe subclínicamente en monos ardilla y otros monos de Nuevo Mundo, pero puede ser mortal en el títi o monos lechuza.
- ***Herpesvirus hominis* o *simplex*:** las lesiones orales (herpes labiales) pueden desarrollarse en las personas, pero los monos títi, los monos lechuza y los simios pueden desarrollar una enfermedad más grave y presentan úlceras cutáneas, conjuntivitis y encefalitis.
- **Sarampión:** es común en la mayoría de los primates, pero puede ser asintomático, la mortalidad es mas frecuente en monos del Nuevo Mundo.
- **Síndrome debilitante de los títi (WMS, por sus siglas en inglés):** los monos títi pueden perder peso por muchas razones, pero existe un síndrome caracterizado por pérdida de peso, debilidad, letargia y con frecuencia, anemia e hipoalbuminemia. Los animales presentan una elevada incidencia de cuerpos de Heinz en sus eritrocitos <sup>93</sup>.

En este sentido, específicamente en la especie *Callithrix jacchus*, existe el problema del raquitismo, debido a que las marmosetas tienen sólo un sexto de receptores de 1 alfa,25-dihidroxicolecalciferol (deficiencia de calcio o de la vitamina D), comparados con el mono rhesus, por lo que en marmosetas mantenidas en cautiverio el raquitismo es una enfermedad común, pero que puede llevar a la muerte del mono si no es atendido a tiempo <sup>49,51,82,94</sup>. Este se puede presentar acompañado de infecciones secundarias, así como de diversas complicaciones. El mono puede presentar hipoactividad, hiporeactividad, anorexia, dolor, incapacidad para saltar, lesiones vertebrales, deformidad facial y mandíbula flexible, combadura y deformación de los huesos sometidos a fuerza muscular. El trastorno es causado por deficiencias dietéticas, deficiencia de vitamina D y carencia de exposición a la luz solar (períodos prolongados a la sombra) <sup>49,52,81,93,95</sup>, pero con tratamiento de suplementos vitamínicos y exposición al sol es posible revertir la enfermedad <sup>96</sup>.

La gran cantidad de compuestos farmacéuticos que a diario son lanzados al mercado obliga a la búsqueda de nuevos métodos o modelos para su estudio <sup>3,97</sup>. Existe gran cantidad de pruebas para determinar la toxicidad de los compuestos, sin embargo, debido a que en toxicología genética se requiere de más de una prueba para determinar el potencial genotóxico de un compuesto, poder contar con diversas alternativas es vital <sup>97</sup>. La prueba de MN tiene la ventaja de ser rápida, sencilla y económica, además de que la interpretación de sus resultados no deja lugar a duda del daño producido <sup>13</sup>, asimismo, es ampliamente utilizada en la evaluación de la genotoxicidad de nuevos medicamentos. Esta prueba permite hacer estudios *in vivo* y con esto el compuesto es metabolizado, lo que da la oportunidad de observar el efecto de sus metabolitos. Esta prueba ha adoptado para su realización la sangre periférica del ratón, por sus hasta ahora inmejorables características <sup>69</sup>. Sin embargo, como se mencionó esta especie no es la más cercana al humano y en cambio un primate se encuentra dentro del mismo Orden. La importancia por tanto, radica en la

posibilidad de tener un nuevo modelo, el cual sería más cercano al hombre filogenéticamente, con lo que los estudios de MN en sangre periférica en monos sería la prueba con animales más confiable y con la ventaja de utilizar sólo una gota de sangre.

La marmoseta común *Callithrix jacchus* es el primate más pequeño que se ha empleado en investigación biomédica pues se ha utilizado en experimentación como modelo de enfermedades humanas, o estudios referentes básicamente a comportamiento, fisiología, metabolismo de drogas, toxicología, biología de la reproducción y enfermedades específicas <sup>73-75,79,82,96</sup>, pero no se ha evaluado como bioindicador de agentes genotóxicos por medio de la prueba de MN en eritrocitos de su sangre, por lo que la propuesta del presente es conocer su potencial para proponerlo como modelo en la evaluación de fármacos que serán destinados al uso humano, con la ventaja de que la prueba es sencilla, económica y rápida y que sólo requiere una gota de sangre del mono.

Por lo anterior, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿La marmoseta (*Callithrix jacchus*) incrementará el número de EMN cuando sea expuesto a un genotóxico conocido, para poder proponerlo como una opción en el estudio de pruebas de micronúcleos?

## HIPÓTESIS.

La marmoseta (*Callithrix jacchus*) incrementa el número de EMN cuando se expone a ciclofosfamida, por lo que es otra opción para estudios de genotóxicos.

## OBJETIVOS.

Valorar a la marmoseta (*Callithrix jacchus*) como posible especie adecuada para estudios de genotoxicidad mediante la prueba de MN.

### Específicos.

- Establecer las condiciones que se requieren para el mantenimiento de la especie en el laboratorio.
- Confirmar que la especie *Callithrix jacchus* presenta EMN espontáneos.
- Determinar los valores de EMN en la marmoseta (*Callithrix jacchus*) después de la administración de un genotóxico (ciclofosfamida).

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **Sede.**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Mutagénesis, División de Medicina Molecular del Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

### **Selección de Organismos.**

Se utilizaron 10 marmosetas (*Callithrix jacchus*) de sexo indistinto y diferentes edades, adquiridos en el criadero "Exóticos la Puerta", Zapopan, Jalisco y mantenidos en el Laboratorio con los permisos correspondientes otorgados por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)<sup>99</sup> (Anexo A).

### **Manejo de animales.**

A su llegada al laboratorio a todos los especímenes se les tomaron datos como sexo, edad y peso para un registro inicial del experimento, posteriormente fueron sometidos a un periodo de 10 días para su adaptación. Para tal fin, se establecieron las condiciones para su manejo y manutención en el laboratorio, por tanto, los animales se colocaron, de acuerdo al sexo, en grupos de 3 o 4 animales en jaulas de acero inoxidable de 87 x 60 x 60 cm, la cual fue adaptada para que las marmosetas tuvieran un entorno adecuado y estimulante (Figura 7), para lo cual fueron colocados palos de diferentes tamaños y grosor, así como cuerdas, con la intención de que pudieran trepar, saltar, colgarse o caminar y tuvieran fácil acceso a todos los espacios de la jaula. También se reguló la temperatura del sitio con un radiador para procurar que fuera cálida (entre 22 a 32°C), y se les adaptó un nido de pájaros o un guaje (aproximadamente 25 cm de diámetro) como casa, en la que pudieran descansar y estuvieran cómodos (Figura 7). Las cerraduras de la jaula se aseguraron y se revisaron continuamente para evitar



escapes. Además, se aseaban las jaulas diariamente y semanalmente se hacia limpieza general de las áreas de jaulas.

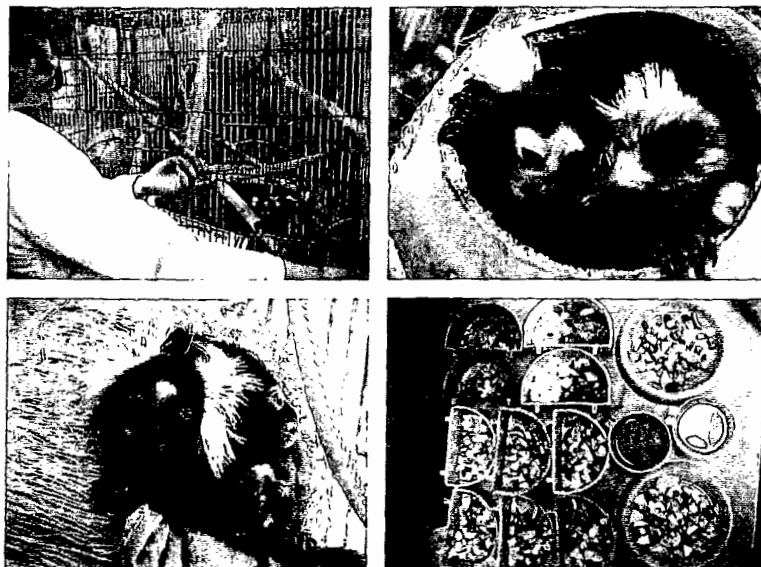


Figura 7. Hábitat, tipos de nido y alimentación.

Asimismo, los animales eran sacados de sus jaulas periódicamente a fin de que se acostumbraran al manejo y a las personas encargadas de su cuidado, para lo cual se utilizaron guantes de camaza suaves. Además, se les vitaminaba al término de los experimentos con jarabe multivitamínico de uso pediátrico y se les exponía a la luz directa del sol por períodos de aproximadamente 15 minutos al menos 4 veces por semana, a fin de prevenir el raquitismo. A este respecto, en el laboratorio se colocaron lámparas fluorescentes Vita-Lite®, ya que estas lámparas asemejan más el color total del espectro ultravioleta benéfico de la luz solar.

Diariamente se les proporcionó agua y alimento *ad libitum* (Figura 7) que consistió en una dieta variada, sugerida por el criador, de frutas y verduras desinfectadas y en crudo, como manzana, plátano, pera, uva, mango, durazno, melón, ejote, chícharo, zanahoria, calabacita, huevo cocido, panela, arroz cocido, croqueta especial para monos

(Monkey chow PURINA®), larva de escarabajo (*Tenebrio monitor*) con un poco de salvado natural, miel y leche condensada. Asimismo, por indicaciones del criador se omite alimentarlos con piña o sandía pues por su experiencia estas frutas les puede ocasionar la muerte. La fruta, verdura, huevo y panela era partida en cuadrillos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> para que fuera fácil manejar el alimento por los animales, y era posteriormente distribuido en varios recipientes de plástico, además, en trastes por separado eran colocados los tenebrios y en otro el arroz cocido y la croqueta con miel o leche condensada. Específicamente, en el caso de la croqueta, ya que su presentación es en pellet de aproximadamente 5 x 2 cm y es de consistencia dura, ésta era machacada, para que fuera manejable por las marmosetas.

Todos los datos de manejo y del experimento fueron registrados diariamente en una bitácora, a fin de llevar un control de su manejo.

#### **Grupos de trabajo e Inducción de Células Micronucleadas.**

Después del periodo de adaptación, las 10 marmosetas se dividieron en dos grupos para la inducción de células micronucleadas en sangre periférica, de la siguiente manera:

- o El grupo I (control) estuvo conformado por 5 animales: 4 machos, 3 jóvenes de entre 4 a 8 meses de edad (de un peso promedio de 144gr) y 1 adulto de aproximadamente 6 años (de un peso de 305gr), así como una hebra joven de 6 meses de edad (de un peso de 185gr). Al grupo I se le mantuvo con las mismas condiciones que el grupo experimental y sólo se le administró 0.2 ml de agua inyectable una vez al día durante 2 días, con la finalidad de manejar la variable del estrés en el experimento.
- o El grupo II (experimental) estuvo conformado por 5 animales: 4 machos, 2 jóvenes de entre 4 a 8 meses de edad (de un peso promedio de 140.5gr) y 2 adultos de entre 3 a 6 años (de un peso promedio de 245gr), así como una hebra joven de 6 meses de edad (con un peso de 186gr). Al grupo II se le administró un

genotóxico conocido (ciclofosfamida), una vez al día, durante 2 días a dosis de 5 mg/kg. La dosis fue considerada de acuerdo a las dosis pediátricas utilizadas en humanos <sup>49</sup>,

Las administraciones se realizaron por vía intravenosa (i.v.) en la vena femoral (Figura 8), a un volumen total de 0.2 ml por dosis, en ambos grupos.



Figura 8. Administración de dosis por vía i.v.

#### **Preparación y análisis de las muestras.**

La toma de muestra de sangre periférica se realizó mediante el corte de uña de la pata diariamente durante 6 días a partir de la primera administración, se elaboraron frotis por duplicados en portaobjetos limpios y marcados, se dejaron secar al aire, se fijaron en etanol absoluto por 10 minutos y posteriormente se tiñeron con naranja de acridina <sup>41</sup>, para su posterior análisis mediante microscopio de fluorescencia (Olympus CX31) con el objetivo de 100x para el conteo de EMN/10,000 eritrocitos totales (ET), eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN)/2,000 EPC, y la proporción de EPC/1,000 ET.

#### **Tinción con naranja de acridina:**

La tinción de las laminillas se realizó con naranja de acridina, colorante específico para ácidos nucleicos. El naranja de acridina emite fluorescencia y dado que el núcleo y los

MN están formados de ADN, ésta propiedad es aprovechada para la visualización de MN, los cuales, al igual que el núcleo de la célula, aparecen de color amarillo o verde brillante, mientras que el ARN se tiñe de rojo o naranja cuando son observados con microscopia de fluorescencia, mientras que el citoplasma se tiñe de verde opaco semitransparente.

Se debe tomar en consideración que el naranja de acridina es un compuesto que se intercala entre las bases del ADN y por lo tanto, es necesario contar con medidas de seguridad tales como uso de guantes, bata y cubreboca para evitar contacto y aspiración durante su manejo.

#### Lectura de las laminillas:

Para la lectura de las laminillas, se toma una de la caja tapada, se le agregan una gotas del buffer que se separó en una jeringa, se cubre la laminilla con un cubreobjetos, se eliminan excesos de buffer con presión suave por ambos lados con una gasa y se coloca la laminilla en la platina del microscopio para su lectura con lámpara de fluorescencia, mediante observación con el objetivo 100X para contar los EMN en un total de 10,000 células.

Se recomienda leer las laminillas en un plazo no mayor a 5 semanas posterior a la tinción ya que la fluorescencia se pierde con el tiempo.

#### Criterios considerados para el análisis de las muestras:

Las características tomadas en cuenta para considerar a una célula como normal fueron que presentara citoplasma intacto y relativamente homogéneo, poco o ningún empalme con células adyacentes; mientras que en el caso de los EMN se tomó en cuenta que tuvieran las características de la célula normal, además de que el MN tuviera una forma redonda o almendrada, con un tamaño menor a un quinto del eritrocito, que presentaran un perímetro liso y redondo que sugiriera membrana, así como intensidad de tinción, textura y plano focal similar al del núcleo de un leucocito.

### **Variables.**

- Independientes: administración del inductor micronucleogénico (ciclofosfamida).
- Dependientes: Número de células micronucleadas.

### **Criterios.**

- Inclusión: Animales sanos de la especie *Callithrix jacchus*, de sexo y edad indistinta.
- Exclusión: Animales que enfermen durante el tratamiento, frotis de sangre gruesos, contaminados y/o muestras mal teñidas.

### **Ética.**

Los animales fueron tratados de acuerdo con los Requerimientos y Normas Institucionales gubernamentales de México e Instituciones de Salud de los Estados Unidos del Norte América <sup>72,93,98</sup>.

### **Diseño.**

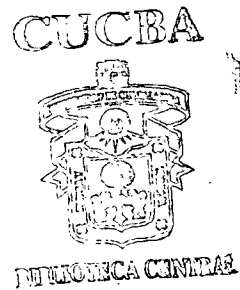
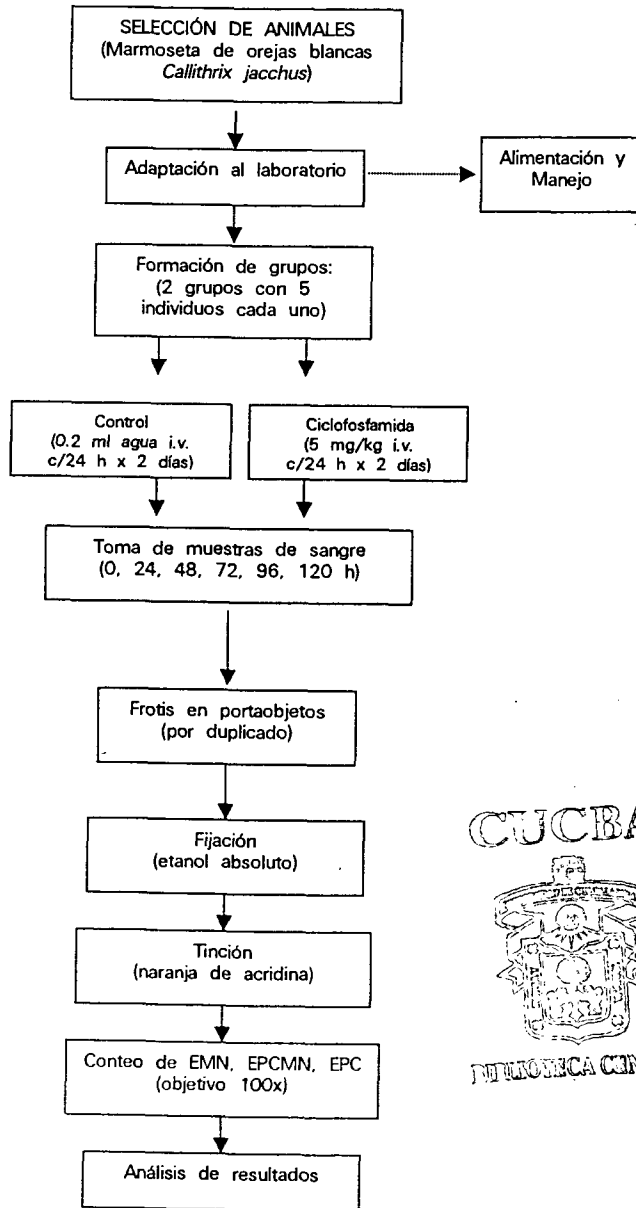
- Tipo de estudio: *experimental*
- Por el tipo de captación de la información: *longitudinal*
- Por la medición de fenómeno en el tiempo: *prospectivo*
- Por la presencia de un grupo control: *comparativo*

### **Análisis estadístico.**

Las comparaciones se realizaron en cada grupo entre el valor basal o tiempo 0 h con los valores obtenidos en los siguientes muestreos (24, 48, 72, 96 y 120 h) para cada parámetro analizado (EMN, EPCMN, EPC).

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar y se evaluaron mediante la prueba  $t$  de Student, considerándose estadísticamente diferentes cuando el valor de  $p$  fue menor a 0.05.

DIAGRAMA DE FLUJO.



## RESULTADOS.

Los promedios, desviaciones estándar y la significancia de las frecuencias de los EMN/10,000 ET, EPCMN/2,000 EPC y EPC/1,000 ET de los diferentes grupos se muestran en el Cuadro I.

Al analizar los diferentes parámetros comparando el tiempo basal o tiempo 0 con los siguientes tiempos en cada grupo, se observó incremento significativo en los EPCMN ( $P < 0.03$ ), asimismo, se observó ligero incremento de EMN en el grupo de ciclofosfamida, aunque no fue significativo, mientras el control de agua se mantuvo sin cambios.

CUADRO I. Análisis de los grupos de estudio.

Promedio  $\pm$  Desviación estándar de EMN/10,000 ET, EPCMN/2,000 EPC y EPC/1,000 ET de los grupos de estudio en los diferentes tiempos.

Tiempo	Control n=5			Experimental n=5		
	EMN	EPCMN	EPC	EMN	EPCMN	EPC
0 h	19.0 $\pm$ 3.74	4.6 $\pm$ 1.95	48.6 $\pm$ 32.19	10.0 $\pm$ 3.67	3.0 $\pm$ 2.12	62.0 $\pm$ 49.98
24 h	17.4 $\pm$ 2.88 NS	3.4 $\pm$ 2.79 NS	38.2 $\pm$ 27.45 NS	10.0 $\pm$ 6.04 NS	3.6 $\pm$ 2.19 NS	48.8 $\pm$ 39.47 NS
48 h	17.4 $\pm$ 3.85 NS	6.0 $\pm$ 3.39 NS	43.2 $\pm$ 24.27 NS	12.2 $\pm$ 8.29 NS	9.6 $\pm$ 5.18 *P < 0.02	58.4 $\pm$ 49.22 NS
72 h	15.8 $\pm$ 3.42 NS	5.6 $\pm$ 3.29 NS	42.6 $\pm$ 25.04 NS	16.0 $\pm$ 9.17 NS	15.0 $\pm$ 5.29 *P < 0.01	81.6 $\pm$ 54.01 NS
96 h	19.4 $\pm$ 2.19 NS	3.8 $\pm$ 2.28 NS	44.2 $\pm$ 30.36 NS	17.2 $\pm$ 13.81 NS	14.4 $\pm$ 7.27 *P < 0.03	61.2 $\pm$ 36.57 NS
120 h	16.4 $\pm$ 4.16 NS	3.8 $\pm$ 2.49 NS	58.4 $\pm$ 52.75 NS	16.2 $\pm$ 12.15 NS	8.8 $\pm$ 2.59 *P < 0.01	55.2 $\pm$ 46.22 NS

Los datos están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones fueron realizadas entre el tiempo 0 con los otros tiempos, en cada grupo. n: tamaño de muestra; EMN: Eritrocitos micronucleados; ET: Eritrocitos totales; EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados; EPC: Eritrocitos policromáticos; \* Prueba T de Student; NS: no significativo. Todas las dosis fueron ajustadas a un volumen final de 200  $\mu$ l con agua inyectable.

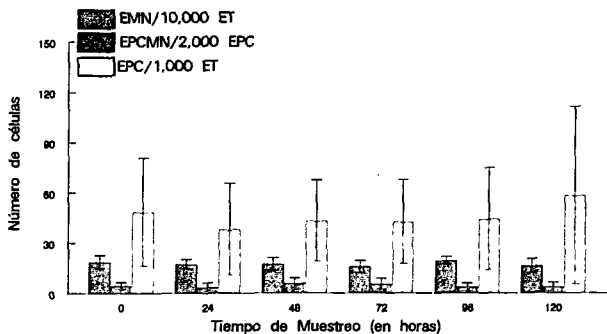


**GRÁFICA 1: Análisis de los grupos de estudio.**

Promedio  $\pm$  Desviación estándar de EMN/10,000 ET, EPCMN/2,000 EPC y EPC/1,000 ET de los grupos de estudio en los diferentes tiempos.

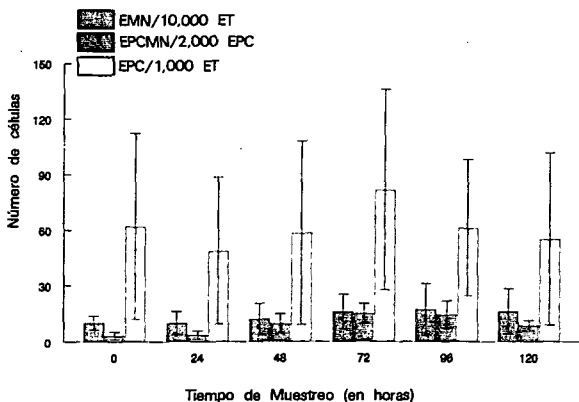
Control n=5

Gráfica A



Gráfica B

Experimental n=5



Los datos están expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar. EMN: Eritrocitos micronucleados; ET: Eritrocitos totales; EPCMN: Eritrocitos policromáticos micronucleados; EPC: Eritrocitos policromáticos.

## DISCUSIÓN.

En el manejo y cuidado de estos primates se debe tener en cuenta que se está trabajando con animales que son susceptibles a múltiples enfermedades de las cuales existe un alto porcentaje que se pueden transmitir al hombre y viceversa, por lo que hay que seguir prácticas higiénicas estrictas, como evitar la presencia de personas con síntomas de enfermedades infecciosas y utilizar siempre guantes de goma o carnaza para el manejo de los primates o sus tejidos, si bien, es importante recordar que los animales fueron obtenidos de un criadero y no del medio silvestre, con lo que la posibilidad de que tengan algún tipo de enfermedad exótica se reduce, además de que los ejemplares no tienen posibilidades de salir a la calle y contaminarse con organismos que se encuentren en el ambiente.

El presente trabajo es parte de un proyecto, el cual tiene como objetivo demostrar que la marmoseta *Callithrix jacchus* puede ser un bioindicador de genotóxicos y la manera como se valida esto es probando compuestos de conocida genotoxicidad y micronucleogenicidad, para que no exista duda del efecto del compuesto administrado y obtengamos la respuesta del modelo a dicho compuesto.

En un estudio previo de MN en médula ósea de macacos, se emplearon para el estudio 3 animales, uno por cada grupo <sup>32</sup>, en este caso tuvimos la oportunidad de formar grupos de hasta 5 animales y con los resultados observados hasta el momento se obtuvieron diferencias significativas en los EPCMN en ambos grupos tratados con los genotóxicos utilizados, mientras que los EMN sólo mostraron incrementos, los cuales no alcanzaron significancia estadística debido a las desviaciones estándar tan amplias que se obtuvieron. Esto pudiera deberse a que los grupos trabajados fueron de sexo y edades diferentes, pues, como ya se mencionó, es bien conocido que por ello puede haber diferencia en el número basal de EMN <sup>22,24,34,62</sup>, lo que significa que con una población más homogénea las variaciones pueden reducirse y la significancia manifestarse, lo cual se lograría si se contara con un bioterio que reprodujera marmosetas y con ello se

podrían controlar las variables y contar con grupos homogéneos, pero, ya que no hay bioterios de marmosetas, a fin de evitar la depredación de esta especie, adquirimos nuestros especímenes con un criador establecido, que no se dedica exclusivamente a la reproducción de esta especie, por lo cual no fue posible la entrega de animales de edades idénticas, sino de acuerdo a la disponibilidad existente. Sin embargo, el contar con grupos heterogéneos no fue problemático para nuestro estudio puesto que esperábamos obtener diferencias amplias, a fin de que la factibilidad del modelo fuera evidente y, en posteriores trabajos, en el caso de contar con grupos similares, las diferencias fueran aún mucho más claras.

Es importante hacer notar también que los EMN generalmente se manifiestan de manera más clara cuando las administraciones son por tiempos más prolongados, por los que éstas estructuras se acumulan con el tiempo <sup>2</sup>.

Además, no se debe olvidar que las dosis utilizadas en el presente fueron muy bajas, si tomamos en cuenta que para trabajar ratones se emplea como control positivo la ciclofosfamida a dosis de 50 mg/kg, lo que comparado con la dosis de 5 mg/kg utilizada en el presente resulta 10 veces menor, sin embargo, este dato resulta importante ya que el presente modelo manifestó sensibilidad a dosis muy baja, con lo que a su vez se produce menor daño en el individuo y menor gasto de reactivos.

En este punto cabe aclarar que se decidieron estas dosis por ser las que se manejan terapéuticamente en niños y ya que se desconocía el efecto de estos compuestos en esta especie, decidimos ser cautelosos y por ello, no tuvimos ningún deceso. Particularmente, para nuestros fines la prueba funcionó extraordinariamente a estas dosis mediante el conteo de EPC, lo que hace a la marmoseta una opción como modelo para pruebas de genotoxicidad para períodos cortos de exposición.

Por otro lado, esta especie tiene características particulares que la hacen ideal para trabajarla en laboratorio por su tamaño, peso (menor que el de una rata adulta), su fácil manejo, su factibilidad para reproducirla en cautiverio (con la posibilidad de tener dos

camadas por año a diferencia de otros primates que sólo tienen una), la facilidad de tomar la gota de sangre requerida para esta prueba mediante el corte de la uña, la manutención y su rápida adaptabilidad al manejo.

Es importante también comentar que esta especie es la primera del Orden de los Primates que se presenta <sup>22,70</sup> y se prueba de esta manera para proponerla como bioindicador, como resultado de una de las líneas de Investigación del laboratorio, en la cual tenemos seleccionadas aproximadamente 20 especies de mas de 150 estudiadas <sup>20-22,70</sup>, que pueden llegar a ser bioindicadores naturales, si bien los primates pueden ser los más adecuados dentro de este grupo para probar medicamentos enfocados al uso humano.

La originalidad del presente trabajo radica en que contar con un primate para llevar a cabo la última prueba de genotoxicidad de nuevos fármacos da ventajas adicionales a las pruebas que se realicen y que no se conocía antes de estos estudios.

Además, probar la genotoxicidad de nuevos fármacos de empleo en el humano debe ser primordial antes de lanzarlos al mercado y como resultado de este trabajo, presentamos una nueva alternativa que deberá ser tomada en cuenta por que los resultados obtenidos son de una especie de gran cercanía al humano filogenéticamente y por ser la primera especie del Orden de los Primates descrita para realizar la prueba de MN en sangre periférica.

En cuanto al manejo y manutención de los ejemplares, su alimentación estuvo basada en un listado de alimentos usuales que el criador nos indicó, procurando proporcionarles diariamente los mismos alimentos con la intención de que los ejemplares pudieran tomar los que resultaran de su agrado o apetencia, de acuerdo a su requerimiento, ya que a diferencia de otros animales de laboratorio, estos presentan características individuales particulares que, por un lado, permiten identificarlos plenamente, pero que ocasiona que se deba dar un trato específico a cada uno de acuerdo a sus necesidades.

Respecto al hábitat, se probaron dos tipos de jaulas, adaptadas de acuerdo a sus requerimientos de espacio y con opción a que pudieran ejercitarse colocándoles palos de madera distribuidos de manera que pudieran trepar, saltar, colgarse o caminar sobre ellos, así como nidos para refugiarse y "juguetes" para que se entretuvieran, puesto que son animales curiosos que se aburren con facilidad y requieren retos o novedades para mantenerse alertas. En este sentido, para su higiene se utilizó arena de gato para la recolección de desperdicios, colocada como una cama de 1 cm de espesor en una charola bajo la jaula, la cual estaba soportada en cubos de madera de 10x10x15 forrados con plástico, colocados dobles en las 4 esquinas de la jaula como soporte, con la finalidad de que la arena se mantuviera alejada del piso de la jaula, para evitar que los animales no alcanzaran los desperdicios depositados en la cama de arena, puesto que usualmente estiraban los brazos para recoger alimento que se les caía. Esta arena era limpiada diariamente y cambiada en su totalidad cada semana, además se aseaban las jaulas y el piso alrededor de ellas, pues acostumbraban orinar hacia afuera de su jaula, por lo cual, las jaulas se forraron con plástico transparente en dos de sus lados y el piso era cubierto con papel para que la recolección de desperdicios fuera más sencilla.

Se procuró en todo momento que los ejemplares se encontraran cómodos, para lo cual el Laboratorio de Mutagénesis tuvo que ser reacomodado y reacondicionado, a fin de dejar espacios para situar las jaulas en lugares estratégicos de frente a la ventana, además de la colocación de lámparas fluorescentes especiales. Adicional a esto, para mantener los ciclos de luz-oscuridad de 12x12 h, por las tardes se dejaba prendida una lámpara de emergencia recargable que se apagaba sola a las pocas horas (3-5 h). Otro punto importante fue que los fines de semana y días festivos se hacían guardias para la limpieza y la alimentación, así como también se dejaban luces encendidas y

música en los horarios acostumbrados entre semana para mantener las condiciones estables y los monos se adaptaran a una rutina establecida.

La mayoría de los primates presentan uñas como los humanos, sin embargo, la marmoseta presenta garras, muy similares a las de las ardillas arborícolas. Dicha característica resulta muy importante para la realización de nuestro trabajo, ya que esto facilita la toma de muestra de sangre, pues permite cortar la garra de una mano lo más cercano posible al dedo a fin de que sangre para obtener una o dos gotas de sangre, que es cantidad más que suficiente para elaborar los frotis. Esta forma de tomar la muestra evita tener que puncionar alguna vena del animal, que además, en el caso de las marmosetas, por su tamaño tan pequeño, resulta difícil. Además, la garra vuelve a crecer en aproximadamente 7 a 15 días y con esta manera de muestreo, el daño al animal es mínimo y no es tan agresivo como puncionarlos.

Los primates son organismos interesantes por su inteligencia y cercanía filogenética al humano, con riqueza de lenguaje y conductas que pueden ser identificadas al poco tiempo de estarlos observando al punto de poder identificar conductas específicas. En este aspecto, el haber podido tener primates en el laboratorio resultó una experiencia que muy pocas personas pueden compartir, debido, por un lado, al costo de cada ejemplar, así como a los cuidados que se deben de tener con y para los especímenes. Además, es necesario realizar trámites y solicitar permisos a la autoridades respectivas, como la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT <sup>99</sup>, para cumplir con los reglamentos estipulados para la posesión de organismos de este tipo. En este punto, como se puede observar en el Anexo A, la compra de los especímenes fue a un criador establecido, lo que evita que los animales sean depredados de su medio natural y permite además conocer todos los antecedentes familiares de los ejemplares. Esto tiene como único inconveniente que la entrega de los animales queda supeditada a la disponibilidad de los mismos por el criadero. Asimismo,

a la par de la adquisición de los ejemplares se debe tramitar el permiso correspondiente, el cual en este caso fue de Colección Científica, por la naturaleza de la finalidad de la posesión. Dicho permiso se otorga por tiempo definido de acuerdo a la duración del estudio a realizar. Una vez terminado el experimento, los animales son identificados mediante la inserción subcutánea de un microchip, lo cual es notificado a la SEMARNAT, a fin de evitar que estos puedan ser traficados, pues los define con un número permanente y con el lugar al que pertenece dicho número, el cual la SEMARNAT difunde a fin de que cualquier animal encontrado sea identificado mediante ese chip y devuelto al lugar al que pertenece.

Asimismo, al considerar todos los puntos mencionados en cuanto a manejo, permisos y condiciones de manutención, queda de manifiesto que este tipo de organismos no deben ser adquiridos con la finalidad de servir como mascotas, puesto que tienen requerimientos muy especiales y necesitan más cuidados que algún tipo de animal doméstico.

Los requerimientos para la manutención de los primates están bien establecidos y hay mucha información descrita, pero la mayoría es para colecciones de exhibición o de zoológicos.

Los primates, salvo pocas excepciones, son animales sociables y no deben alojarse solos, a excepción de indicaciones médicas o requerimientos específicos de los experimentos y por períodos de tiempo cortos. En el inicio de nuestro proyecto, alojamos a nuestros especímenes en jaulas individuales con la intención de poderlos identificar fácilmente, mientras nos acostumbrábamos a ellos y aprendiéramos a reconocerlos, fue notorio que en el momento en el que los juntamos en una misma jaula, los animales se volvieron más activos, ya que la interacción entre ellos los mantenía más ocupados. Con esto, los animales desarrollaron conductas diferentes en cuanto a sus juegos y a su conducta social, tal como espulgarse, mantenerse juntos en el nido para dormir o establecer jerarquías.

Cuando los animales están destinados a exhibición el espacio disponible para ellos es evidentemente mayor, además de que será su hábitat permanente, por lo que debe cumplir con los requerimientos necesarios para que su desarrollo sea el adecuado, lo que en condiciones de laboratorio no es suficiente, si bien, en el laboratorio permanecen por períodos de tiempo cortos. En el caso del presente, el espacio fue reducido primeramente por las dimensiones del laboratorio y en segundo lugar para facilitar su manipulación, ya que en jaulas muy grandes la sujeción se dificulta y se requerirían además redes para atrapar a los especímenes, lo que les causaría mayor estrés.

Finalmente, como se mencionó, la marmoseta *Callithrix jacchus* es el primate más pequeño que se ha empleado en investigación biomédica <sup>73-75,79,82,96</sup>, pero no se había evaluado como bioindicador de agentes genotóxicos por medio de la prueba de MN en eritrocitos de su sangre, por lo que la propuesta del presente es dar a conocer su potencial como modelo en la evaluación de fármacos que serán destinados al uso humano, con la ventaja de que la prueba de MN es sencilla, económica y rápida y que sólo requiere una gota de sangre.



## CONCLUSIONES.

- o La marmoseta presenta características adecuadas en cuanto a peso, tamaño, docilidad, adaptación, manejo y manutención que permiten tenerla como animal de laboratorio.
- o El número de EMN varía respecto a la edad, como en otras especies, si bien el número de EMN siempre fue adecuado para seguir considerándolo como un buen modelo; por lo que, se recomienda para trabajos a futuros, emplear grupos homogéneos, lo que dará menos dispersión en la desviación estándar y con esto, la posibilidad de observar incrementos estadísticamente significativos.
- o La dosis utilizada de ciclofosfamida muestra que hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.03$ ) en el grupo de animales tratados, al comparar los promedios de los EPCMN contra los del valor basal; por lo que, la prueba de MN en la marmoseta puede ser realizada en EPC, para pruebas de períodos de exposición cortos.
- o Los resultados obtenidos en el presente sugieren que la marmoseta *Callithrix jacchus* es un bioindicador opcional y que podemos continuar con la demostración del modelo.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Córdoba D. Toxicología. 4ª ed. Manual Moderno. Bogotá Colombia. 2001; 18-19.
2. Zúñiga-González GM, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Gallegos-Arreola MP, Flores-García A, López-Urbe A. Induction of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood after cutaneous application of 5-Fluorouracil. Arch Med Res. 2003a; 34: 141-144.
3. Pariza MW. Mutagens and carcinogens in the diet. Wiley-Liss. New York, USA. 1990; 1-9, 139.
4. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. 4ª ed. Manual Moderno. México, D.F. 1991; 453-457.
5. Montoya Cabrera MA. Toxicología Clínica. Ed. Francisco Méndez Cervantes. México. 1992; 315.
6. Gibson GG, Skett P. Pathways of Drug Metabolism. En: Introduction to Drug Metabolism. 2ª ed. Blackie Academic & Profesional An Imprint of Chapman & Hall. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras. 1994; 1-34.
7. Plewa MJ, Gentile JM. The activation of chemicals into mutagens by green plants. In Hollander A., Series Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection. New York: Plenum Press. 1982; vol. VII: 401-420.
8. Teratogénesis. <http://www.cfnavarra.es/BIF/txt/15/30terato.html>, 2001.
9. Venitt S. Short-term assays using bacteria. In Montesano, R. (Eds): Long-term and Short-term Assays for Carcinogens A Critical Appraisal. IARC Scientific Publications. International Agency for Research on Cancer. Lyon. 1986; 83: 143-161.
10. Ames BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Microbial test for Mutagenicity/Carcinogenicity. Ed. by Traul KA. Van Nostrand Reinhold Company. New York. 1985a; 12: 113-128.
11. Quillardet P, Hofnung M. The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins procedures. Mutat Res. 1985; 147: 65-78.
12. Kier LD. The Salmonella typhimurium/mammalian-microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat Res. 1986; 168: 69-240.

13. Zúñiga-González G. Sistemas de detección de daño genético. En: Genética, Ambiente y Salud de Álvarez Moya C. 2ª ed. Universidad de Guadalajara. México. 2001; 127-150.
14. Schmezer P, Pool BL, Lefevre PA, Callander R, Ratpan F, Tinwell H, Ashby J Assay-Specific genotoxicity of n-nitrosodibenzylamine to the rat liver *in vivo*. *Environ Mol Mutagen*. 1990; 15: 190-197.
15. Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, Fukumoto M, Okonogi H, Kadokura M. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 22: 101-106.
16. Schmid W. The micronucleus tests. *Mutat Res*. 1975; 31: 9-15.
17. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environ Mol Mutagen*. 1991; 18: 277-291.
18. Heddle JA, Hite M, Kirthart BK, Mavournin JT, MacGregor G, Newil W, Salamaone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*. 1983; 123: 61-118.
19. Corazza G, Ginaldi L, Zoli G, Frisoni M, Lalli G, Gasbarrini G, Quaglino D. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function, a ressesment. *Clin Lab Haematol*. 1990; 12: 269-275.
20. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Ramos A, Fanti-Rodríguez E, Portilla E, García-Martínez D, Cantú JM, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 species. *Mutat Res*. 1996a; 369: 123-127.
21. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Luna-Aguirre J, González-Rodríguez A, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Gallegos-Arreola MP. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species. *Mutat Res*. 2000; 467: 99-103.
22. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ramos-Ibarra ML, Martínez-González S, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Ramos-Mora A, Ontiveros-Lira D, Gallegos-Arreola MP. Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat Res*. 2001a; 494: 161-167.

23. Zúñiga-González G, Ramírez-Muñoz MP, Torres-Bugarín O, Pérez-Jiménez J, Ramos-Mora A, Zamora-Perez A, Gallegos-Arreola MP, Sánchez-Corona J. Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis domesticus*) peripheral blood by colchicine and cytosine-arabioside. *Mutat Res.* 1998; 43: 187-189.
24. Zúñiga-González G, Torres-Bugarín O, Ramos-Ibarra ML, Zamora-Perez A, Gómez-Meda BC, Ventura-Aguilar AJ, Ramos-Mora A, Ortiz GG, Álvarez-Moya C, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Gallegos-Arreola MP. Variation of micronucleated erythrocytes in peripheral blood of *Sciurus aureogaster* in relation to age: an increment of micronucleated polychromatic erythrocytes after the administration of colchicine. *Environ Mol Mutagen* 2001b; 37: 173-177.
25. Yamamoto KI, Kikuchi YA. Comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.* 1980; 71: 127-131.
26. Pearson HA, Johnston D, Smith KA, Touloukian RJ. The born-again spleen. Return of splenic function after splenectomy for trauma. *N England J Med*, 1978; 298: 1389-1392.
27. Hellman SS, Vokes EE. Advancing current treatments for cancer. *Sci Ame*, 1996; 275-284.
28. Beaula KD, Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. *Mutat Res.* 1991; 263: 185-196.
29. Hart JW, Hartley-Asp B. Induction of micronuclei in the mouse: revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Mutat Res.* 1983; 120: 127-132.
30. Heddle JA, Lue CB, Saunder F, Benz D. Sensitivity to five mutagens in Fanconi's anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Res.* 1978; 38: 2983-2988.
31. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The micronuclei assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res.* 1990; 245: 245-249.
32. Choy WN, Willhite CC, Cukierski MJ, Book SA. Primate Micronucleus study of L-Selenomethionine. *Environ Mol Mutagen.* 1989; 14: 123-125.
33. Caria H, Chaveca T, Laires A, Rueff J. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res.* 1995; 343: 85-95.

34. Zúñiga-González G. Selección de animales para ser utilizados como indicadores de agentes genotóxicos mediante el conteo de micronúcleos. Tesis doctoral, Universidad de Guadalajara. 1996.
35. Tice RR, Luke CA, Shelby MD. Methyl isocyanate: an evaluation of *in vivo* cytogenetic activity. *Environ Mol Mutagen.* 1987; 9: 37-58.
36. Herrera A, Barrueco C, Caballo C, Peña E. Effect of permethrin on the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 20: 218-228.
37. Russo A, Levis A.G. Further evidence for the aneuploidogenic properties of chelating agents: induction of micronuclei in mouse male germ cells by EDTA. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 19: 125-131.
38. Torres-Bugarín O, De Anda-Casillas A, Ramírez-Muñoz MP, Sánchez-Corona J, Cantú JM, Zúñiga G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res.* 1998; 413: 277-281.
39. Trzos RJ, Petzold GL, Brunden MN, Swenberg JA. The evolution of sixteen carcinogens in the rat using the micronucleus test. *Mutat Res.* 1978; 58: 79-86.
40. Hayashi M, Morita T, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res.* 1983; 120: 241-247.
41. Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Espinoza-Jiménez S, Gallegos-Arreola MP, Álvarez-Moya C, Torres-Bugarín O. Induction of micronuclei in proestrus vaginal cells from colchicine- and cyclophosphamide-treated rats. *Environ Mol Mutagen.* 2003b; 42: 306-310.
42. Greenaway JC, Fantel AG, Shepard TH, Juchau MR. The *in vitro* teratogenicity of cyclophosphamide in rat embryos. *Teratology.* 1982; 25: 335-343.
43. Gilani SH, Chatzinoff M. Embryopathic effects of cyclophosphamide. *Environ Res.* 1983; 31: 296-301.
44. Lähdetie J. Micronuclei induced during meiosis by ethylmethanesulfonate, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene in male rats. *Mutat Res.* 1983; 120: 257-260.
45. Brade W, Seeber S, Herdrich K. Comparative activity of ifosfamide and cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986; 18: suppl 2: S1-9.

46. Porter AJ, Singh SM. Transplacental teratogenesis and mutagenesis in mouse fetuses treated with cyclophosphamide. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1988; 8: 191-203.
47. Zemlicks D, Lishner M, Ertich R, Koren G. Teratogenicity and carcinogenicity in a twin exposed *in utero* to cyclophosphamide. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1993; 13: 139-143.
48. Krishna G, Petrere J, Anderson J, Theiss J. Use of cyclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assay. *Mutat Res*. 1995; 335: 331-337.
49. McVan BF. Índice de Medicamentos. Manual Moderno. México, D.F. 1995; 231-232, 320-322.
50. Casarett & Doull. Toxicología. 5ª ed. McGraw Hill, USA. 1999; 254,417.
51. Rodríguez-Carranza R. Vademécum Académico de Medicamentos. 3ª. Ed. McGraw Hill Interamericana. México. 2000; 131-132, 171-172.
52. Dorland. Diccionario médico de bolsillo. 24ª ed. Interamericana-McGraw Hill. España. 1993; 269, 685.
53. Schalm OW, Schalm DVM. Hematología Veterinaria. 1ª ed. UTEHA. México. 1964; 216-234.
54. Hillman RS, Finch CA. El Eritrocito. 5ª ed. Manual Moderno. 1987; 18-23.
55. Guerrero-García R. Manual de laboratorio de Hematología. Universidad Veracruzana. México. 1997; 39, 45, 50.
56. Schreinemachers DM, Everson RB. Effect of residual splenic function and folate levels on the frequency of micronucleated red blood cells in splenectomized humans. *Mutat Res*. 1991; 263: 63-67.
57. Novales CX, Amato MJ. Sistema linfhemático. 1ª. ed. México. Ed. Limusa. 1993; 57.
58. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Hematology. 4th ed. USA: MacGraw-Hill, 1990; 308.
59. Ramírez-Muñoz MP, Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Portilla E, García-Martínez D, Ramos A, Cantú JM, Sánchez-Corona J. Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Lab Anim Sci*. 1999; 49: 418-420.
60. Zúñiga G, Torres-Bugarín O, Ramírez-Muñoz MP, Delgado-Lamas JL, De Loza-Saldaña R, Cantú JM. Micronucleated erythrocytes in splenectomized patients with and without chemotherapy. *Mutat Res*. 1996b; 361: 107-112.

61. Torres-Bugarín O, Zamora Perez AL, Esparza-Flores A, López-Guido B, Feria-Velasco A, Cantú JM, Zúñiga G. Eritrocitos micronucleados en niños esplenectomizados con y sin quimioterapia. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1999; 56: 212-217.
62. Allen JW, Collins BW, Setzer RW. Spermatid micronucleus analysis of ageing effects in haster. *Mutat Res.* 1996; 316: 261-266.
63. Lowe X, Collins B, Allen J, Titenko-Holand N, Breneman J, van Beek M, Bishop J, Wyrobeck AJ. Aneuploidies and micronuclei in the germ cells of male mice of advanced age. *Mutat Res.* 1995; 338: 59-76.
64. Meyne J, Legator MS. Sex-related differences in cytogenetic effects of benzene in the bone marrow of Swiss mice. *Environ Mutagen.* 1980; 2: 43-50.
65. Nagae Y, Miyamoto H, Suzuki Y, Shimizu H. Effect of estrogen on induction of micronuclei by mutagens in male mice. *Mutat Res.* 1991; 263: 21-26.
66. Rodríguez-Ariza A, Nieves A, Navas JI, Dorado G, López-Barea J, Pueyo C. Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from Spanish coasts. *Environ Mol Mutagen.* 1992; 19: 112-124.
67. Miguel AG, Daisey JM, Sousa JA. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ Mol Mutagen.* 1990; 15: 36-43.
68. Schlegel R, MacGregor JT, Everson RB. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res.* 1986; 46: 3717-3721.
69. Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 2000; 35: 234-252.
70. Zúñiga-González G, Gómez-Meda BC, Zamora-Perez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, González-Rodríguez A, Luna-Aguirre J, Rodríguez-Ávila JL. Especies exóticas con micronúcleos espontáneos: alternativa para estudios de genotoxicidad. *Nowet.* 2002; 1: 5-9.
71. Vaughan TA. *Mamíferos.* 3a. ed. Interamericana-McGraw Hill. México. 1988; 141-156.
72. Poole T. *The UFAW handbook on the care & management of laboratory animals.* 6a. ed. Longman Scientific & Technical, USA, 1994; 546-581.

73. Ohsawa K, Lehenbauer W, Eberle R. Herpesvirus papio 2: Alternative antigen for use in monkey B virus diagnostic assays. *Lab Anim Sci.* 1999; 49(6): 605-616.
74. Schmitt D. Evolutionary implications of the unusual walking mechanics of the common marmoset (*C. jacchus*). *Am J Phys Anthropol.* 2003; 122(1): 28-37.
75. Rylands AB. Habitat and the evolution of social and reproductive behavior in callitrichidae. *Am J Primatol.* 1999; 38(1): 5-18.
76. Morrell JM, Nowshari M, Rosenbusch, Nayudu PL, Hodges JK. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset, *Callithrix jacchus*. *Am J Primatol.* 1999; 41(1): 37-43.
77. Waag DM, Byrne WR, Estep J, Gibbs P, Pitt MLM, Banfield CM. Evaluation of *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) and Rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys as experimental models of acute Q fever after aerosol exposure to phase-I *Coxiella burnetii*. *Lab Anim Sci.* 1999; 49(6): 634-638.
78. Gralla EJ, Fleischman RW, Luthra YK, Stadnicki SW. The dosing schedule dependent toxicities of adriamycin in beagle dogs and rhesus monkeys. *Toxicology.* 1979; 13(3): 263-273.
79. Zuhlke U, Weinbauer G. The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model in toxicology. *Toxicol Pathol.* 2003; 31 suppl: 123-127.
80. Hatt JM, Sainsbury AVW. Unusual case of metabolic bone disease in a common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vet Rec.* 1998; 143(3): 78-80.
81. Liu SK. Metabolic disease in animals. *Semin Musculoskelet Radiol.* 2002; 6(4): 341-346.
82. Yamaguchi A, Kohno Y, Yamazaki T, Takahashi N, Shinki T, Horiuchi N, Suda T, Koizumi H, Tanioka Y, Yoshiki S. Bone in the marmoset: a resemblance to vitamin D-dependent rickets, type II. *Calcif Tissue Int.* 1986; 39(1): 22-27.
83. Buchanan-Smith HM, Shand C, Morris K. Cage use and feeding height preferences of captive common marmosets (*Callithrix j. jacchus*) in two-tier cages. *J Appl Anim Welf Sci.* 2002; 5(2): 139-149.
84. Cowlishaw G, Dunbar R. *Primate Conservation Biology.* The University of Chicago Press, Chicago and London, USA. 2000; 17,19,95.
85. de Rosa C, Vitale A, Puopolo M. The puzzle-feeder as feeding enrichment for common marmosets (*Callithrix jacchus*): a pilot study. *Lab Anim.* 2003; 37(2): 100-107.



86. Solomon EP, Berg LR, Martin DW. *Biología*. 5ª ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2001; 449-463.
87. Álvarez del Villar J. Los cordados. Origen, evolución y hábitos de los vertebrados. Consejo Nacional de la Enseñanza de la Biología. CECSA. México. 1987; 290-296.
88. Nowak RM. *Walker's Primates of the World*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. 1999; 224.
89. Romer AS. *Anatomía comparada. Vertebrados*. 4a. ed. Interamericana. México. 1973, 64-68
90. Gisbert C. *Guías Visuales Océano. Mamíferos*. Océano, España. 1999; 86-88.
91. Melo L, Mendes Pontes AR, Monteiro da Cruz MA. Infanticide and cannibalism in wild common marmosets. *Folia Primatol (Basel)*. 2003; 74(1): 48-50.
92. Sleeper B. *Primates*. Chronicle Books, San Francisco, USA. 1997; 136.
93. Sainsbury KJ. *Primates*, en: Beynon HP, Cooper EJ. *Manual de animales exóticos*. Harcourt Brace. España. 1999; 129-140.
94. Takahashi N, Suda S, Shinki T, Horiuchi N, Shiina Y, Tanioka Y, Koizumi H, Suda T. The mechanism of end-organ resistance to 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol in the common marmoset. *Biochem J*. 1985; 227(2): 555-563.
95. Smith K, Dillingham L, Giddens WE Jr. Metabolic bone disease resembling osteosarcoma in a woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*). *Lab Anim Sci*. 1978; 28(4): 451-456.
96. Gómez-Meda BC, Zúñiga-González G, Zamora-Pérez A, Ramos-Ibarra ML, Batista-González CM, Lemus-Varela ML, Hernández-Sánchez EJ. Efecto del calcitriol y un multivitamínico en el tratamiento de raquitismo en 2 marmosetas de la especie *Callithrix jacchus*. *Nowet* 2004; en prensa.
97. Shelby MD, Erexson GL, Hook GJ, Tice RR. Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 21: 160-179.
98. Diario Oficial. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-062-200-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
99. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www.semarnat.gob.mx>. 2003.

## GLOSARIO.

- **Agente alquilante.**- Sustancia química de síntesis, utilizada en la quimioterapia del cáncer, que desnaturaliza las nucleoproteínas por combinación y provoca una alteración del núcleo celular y de los cromosomas.
- **Anafase.**- Tercera etapa de la mitosis o de la meiosis (I o II) durante la cual los cromosomas emigran hacia los polos opuestos de la célula.
- **Aneuploidógeno.**- Agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez.
- **Antineoplásico.**- Inhibe o impide la evolución de neoplasia; que restringe la maduración y la proliferación de células.
- **Bioensayo.**- Determinación del poder activo de una droga por comprobación de su efecto sobre un organismo vivo o un preparado aislado de órgano.
- **Biomonitor.**- Organismo utilizado para detectar algún tipo de contaminante.
- **Carcinógeno.**- Cualquier agente que produce cáncer.
- **Catarrini.**- Monos del antiguo mundo (antropoides y hombre), las aberturas nasales están dirigidas hacia abajo. Relativo a un suborden de primates que comprende los simios del antiguo continente, de orificios nasales muy próximos, cola no prensil y provistos de 32 dientes (macacos y babuinos).
- **Centrómero.**- Pequeña masa de cromatina situada en el interior de un cromosoma y a la que se unen las dos cromátidas. El centrómero ocupa una posición característica en todo cromosoma. Es la última parte del cromosoma que se divide y por medio de la cual se fija al huso.
- **Clastógeno.**- Agente capaz de ocasionar rupturas en el ADN
- **Cromosoma.**- Cuerpo constituido por ADN incluido dentro de una trampa proteica; son los portadores de la información genética. Se hallan en el núcleo de la célula y pueden observarse como estructuras intensamente teñidas en forma de bastón o de J durante la división celular.
- **Genotóxico.**- Agente que afecta al ADN.

- **Haplorhini.**- Son primates superiores, tienen muchas características progresistas que no se observan entre los miembros de los subórdenes strepsirhini. Los haplorrinos - tarseros, monos, títis, simios y humanos- son los primates mejor conocidos y de mayor importancia en términos de diversidad taxonómica que los relativamente primitivos strepsirrinos.
- **Micronúcleo.**- Fragmento de un cromosoma o cromosoma completo que por alguna causa no puede ser integrado al núcleo y queda en el citoplasma celular.
- **Micronucleogénico.**- Agente formador de micronúcleos.
- **Mitógeno.**- Sustancia que estimula la mitosis de las células.
- **Mutación.**- Cambio permanente y heredable del material genético. Definido comúnmente como un cambio en un solo gen (mutación puntual), aún cuando el término se usa también para designar un cambio en el número o disposición de los cromosomas.
- **Mutágeno.**- Cualquier agente que produce mutación.
- **Plantígrado.**- Que anda sobre la totalidad de la planta de los pies y no sobre los dedos.
- **Platirini.**- Monos sudamericanos cuyas aberturas nasales tienen una orientación lateral. Relativo a un suborden de primates que tienen los orificios nasales separados, que cuentan con 36 dientes y viven en América (mono títí y mono araña)
- **Primate.**- Relativo a un orden de mamíferos trepadores, de uñas planas y cerebro muy desarrollado al que pertenecen los lemúridos y simios.
- **Prosimio.**- Primates que tienen el hocico alargado, generalmente provisto de rinano; orejas grandes y la cola que puede ser corta, larga o faltar, nunca es prensil. El segundo dedo de los miembros posteriores siempre se ve provisto de garra. Los incisivos de la mandíbula inferior están casi invariablemente hacia delante. Ningún prosimio vive en el Nuevo Mundo.
- **Quimioterapia.**- Tratamiento de las enfermedades por agentes químicos.
- **Strepsirini.**- Primates relativamente primitivos, con visión estereoscópica, y destreza manual y comunicación vocal (comprende monos, grandes simios y humanos).
- **Tarsero.**- Mamíferos de Asia suroriental, nocturnos, de unos 15 cm de longitud sin la cola y con grandes ojos. Presentan caracteres especializados, como el alargamiento de la región del tobillo que es una adaptación para saltar a la que debe el animal su nombre.

- **Telofase.**- Período de la división celular donde los cromosomas de las células hijas alcanzan los polos de la célula.
- **Teratógeno.**- Agente o factor que produce defectos físicos en el embrión en desarrollo.
- **Unguiculado.**- Mamíferos cuyos dedos terminan en uñas.

## **ANEXO A. Mecanismo de adquisición y posesión de los especímenes.**

Para la adquisición de las especies se localizó un criadero establecido a fin de no depredar organismos de su medio natural, así como también para tener conocimiento del origen y antecedentes familiares de los monos y contar con factura para efectos de la contabilidad del proyecto, dado que éstos fueron adquiridos con financiamientos otorgados tanto por el CONACYT como por el IMSS.

A la par que se tramita la compra, se debe solicitar un permiso ante la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT <sup>95</sup> en el rubro de "INSCRIPCIÓN O ACTUALIZACIÓN EN EL PADRÓN DE COLECCIONES CIENTÍFICAS Y MUSEOGRÁFICAS PÚBLICAS O PRIVADAS DE ESPECÍMENES SILVESTRES", para lo cual se llena un formato de solicitud del permiso y se anexan documentos, tal como comprobante de la compra, función, tiempo de permanencia y destino final de los ejemplares, de acuerdo a los lineamientos establecidos por la SEMARNAT, tal como se observa enseguida:

### **INSCRIPCIÓN Ó ACTUALIZACIÓN EN EL PADRÓN DE COLECCIONES CIENTÍFICAS Y MUSEOGRÁFICAS PÚBLICAS O PRIVADAS DE ESPECÍMENES SILVESTRES.**

#### **1. FUNDAMENTACIÓN JURÍDICA:**

- 1.1 Artículo 32 bis de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 29 de diciembre de 1976 y sus reformas.
- 1.2 Artículo 31, fracciones V, VI y XXII del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 21 de enero de 2003.
- 1.3 Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de enero de 1988 y sus reformas publicadas el 13 de diciembre de 1996.
- 1.4 Artículos 1°, 9 fracciones X y XX, 50, 51, 78, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de julio de 2000.
- 1.5 Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, publicada el 6 de marzo de 2002 en el Diario Oficial de la Federación.
- 1.6 Norma Oficial Mexicana NOM-126-ECOL-2000, publicada el 20 de marzo de 2001 en el Diario Oficial de la Federación.

#### **2. CASOS EN LOS QUE DEBE O PUEDE REALIZARSE EL TRÁMITE:**

- 1.1 Aplica a todas las instituciones o investigadores que cuentan con una colección de ejemplares, partes o derivados de especies silvestres con fines científicos que pretendan realizar intercambios a nivel nacional o internacional.

#### **2. MANERA DE PRESENTAR EL TRÁMITE (ESCRITO LIBRE, FORMATO U OTRA):**

- 2.1 Formato de solicitud.

#### **3. REQUISITOS:**

- 3.1.1 Curriculum vitae del responsable de la colección, y
- 3.1.2 Constancias foliadas de préstamo o donativo del material biológico
- 4. TIEMPO DE RESPUESTA:**
  - 4.1 PLAZO MÁXIMO:**
    - 4.1.1 La resolución es inmediata, la clave de registro se envía diez días hábiles después de haber recibido la solicitud de inscripción.
    - 4.1.2 Aplica la afirmativa ficta.
- 5. PAGO DE DERECHOS:**
  - 5.1 No aplica.
- 6. VIGENCIA DEL TRÁMITE:**
  - 6.1 Definitiva.
- 7. CRITERIOS DE RESOLUCIÓN DEL TRÁMITE, EN SU CASO:**
  - 7.1 No debe existir procedimiento administrativo instaurado por las autoridades competentes.
  - 7.2 Que la colección sea para fines académicos, didácticos y científicos.
- 8. UNIDADES ADMINISTRATIVAS ANTE LAS QUE SE PUEDE PRESENTAR EL TRÁMITE:**
  - 8.1 Dirección General de Vida Silvestre.
  - 8.2 Delegaciones Federales de la SEMARNAT en los estados.
- 9. INFORMACIÓN DE UTILIDAD:**
  - 9.1 Delegación Federal de la SEMARNAT en los estados, puede recibir documentación y proporcionar una opinión técnica; enviándolas a oficinas centrales para su resolución.
  - 9.2 Trámite parcialmente desconcentrado.

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN  
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

Formato de Solicitud:

INSCRIPCIÓN O ACTUALIZACIÓN EN EL PADRÓN DE COLECCIONES CIENTÍFICAS Y MUSEOGRÁFICAS  
PÚBLICAS O PRIVADAS DE ESPECÍMENES SILVESTRES

Página 1 de 2

CLAVE QUE ASIGNARÁ LA D.G.V.S.<sup>1</sup> \_\_\_\_\_

Para uso exclusivo de la Secretaría

**1.- DATOS DEL SOLICITANTE**

NOMBRE DEL SOLICITANTE: <sup>2</sup>	
INSTITUCIÓN: <sup>3</sup>	
DOMICILIO: <sup>4</sup>	
TELÉFONO <sup>5</sup>	FAX
CORREO ELECTRÓNICO <sup>6</sup>	FECHA EN QUE SE PRESENTA LA SOLICITUD: <sup>7</sup>

**2. IDENTIFICACIÓN DE LA COLECCIÓN**

NOMBRE DE LA COLECCIÓN: <sup>8</sup>			
RESPONSABLE DE LA COLECCIÓN: <sup>9</sup>			
UBICACIÓN FÍSICA DE LA COLECCIÓN (DOMICILIO) <sup>10</sup> :			
TAXA QUE SE SOMETE A REGISTRO <sup>11</sup>			
PECES	<input type="radio"/> ANFIBIOS	<input type="radio"/> REPTILES	<input type="radio"/>
MAMÍFEROS	<input type="radio"/> AVES	<input type="radio"/> INVERTEBRADOS (CUÁLES):	<input type="radio"/> _____

3. DATOS DE LA COLECCIÓN

CONTENIDO DE LA COLECCIÓN <sup>12</sup>			
PIEL-CRÁNEO	<input type="checkbox"/>	ESQUELETO	<input type="checkbox"/>
		PRESERVADOS (EN)	<input type="checkbox"/>
NIDO-HUEVO	<input type="checkbox"/>	PLUMAS	<input type="checkbox"/>
		OTROS (ESPECIFICAR)	<input type="checkbox"/>
TOTAL DE EJEMPLARES CATALOGADOS (DEL TAXA QUE SOMETE A REGISTRO) <sup>13</sup>			
MENCIONAR CUANTAS FAMILIAS, GÉNEROS Y ESPECIES SE INCLUYEN EN ESTE TOTAL <sup>14</sup>			
FAMILIA:		GÉNERO:	
		ESPECIE:	
REPRESENTATIVIDAD DE LA COLECCIÓN <sup>15</sup> :			
FUENTE <sup>16</sup> :			
CARACTERÍSTICAS DE LA COLECCIÓN <sup>17</sup> :			
NACIONAL	<input type="checkbox"/>	REGIONAL	<input type="checkbox"/>
		ESTATAL	<input type="checkbox"/>
ESTADOS MEJOR REPRESENTADOS DE LA COLECCIÓN <sup>18</sup>			
OBJETIVO DE LA COLECCIÓN <sup>19</sup>			
INVESTIGACIÓN	<input type="checkbox"/>	EDUCACIÓN	<input type="checkbox"/>
		DIFUSIÓN	<input type="checkbox"/>
		OTRO (ESPECIFICAR)	<input type="checkbox"/>

SI LO ESTIMA CONVENIENTE AGREGUE HOJAS

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA<sup>20</sup>



## INSTRUCTIVO PARA LLENAR LA SOLICITUD:

LEA CUIDADOSAMENTE LA SOLICITUD, ÉSTA PUEDE SER LLENADA A MÁQUINA DE ESCRIBIR, A MANO CON LETRA DE MOLDE, UTILIZANDO BOLÍGRAFO. O BIEN SI EL ARCHIVO ES DIGITAL UTILICE COMPUTADORA.

- 1 Para uso exclusivo de la Secretaría.
- 2 Escriba el nombre completo del solicitante, anotando apellido paterno, apellido materno y nombre(s).
- 3 Escriba el nombre completo de la Institución donde labora, mismo que será el domicilio de permanencia de la colección.
- 4 Escriba el domicilio de la Institución donde labora, anotando calle, número exterior e interior, colonia, código postal, ciudad, población o localidad, delegación o municipio y estado.
- 5 Anote el número telefónico y fax de la Institución, incluyendo la clave lada.
- 6 Anote el correo electrónico personal del solicitante y de la institución.
- 7 Anote la fecha en que se entregó esta solicitud a las oficinas correspondientes de la Secretaría, anotando el lugar, día, mes y año correspondiente.
- 8 Escriba el nombre de la colección.
- 9 Escriba el nombre completo del responsable de la colección, anotando apellido paterno, apellido materno y nombre(s).
- 10 Escriba el domicilio físico donde permanecerá la colección, anotando calle, número exterior e interior, colonia, código postal, ciudad, población o localidad, delegación o municipio y estado.
- 11 Marque el taxa al que corresponda a la colección a registrar.
- 12 Marque el contenido de la colección.
- 13 Anotar el número total de ejemplares que conforman la colección, según el taxa que se va a registrar.
- 14 Anotar el número total de Familias, Géneros y Especies que conforman la colección.
- 15 Indicar cual es el porcentaje de especies representadas en la colección, respecto al total reportado para México, del taxa que se somete a registro.
- 16 Especificar la fuente bibliográfica de la cual se hizo el comparativo anterior.
- 17 Marcar el rango representativo de la colección.
- 18 Enlistar los estados que estén mejor representados en la colección.
- 19 Marcar cual es el objetivo principal de la colección.
- 20 Nombre completo (apellido paterno, materno y nombre(s)) y Firma autógrafa del solicitante.

Si existen dudas acerca del llenado de este formato pueda usted acudir a la Delegación Federal de la SEMARNAT más cercana o consultar directamente al:  
Módulo de Trámites de la Dirección General de Vida Silvestre:  
Av. Revolución 1425, C.I.S., Col. Tlacopac, San Ángel, C. P. 01040, México, D. F.  
Teléfonos: 56 24 60 02, 56 24 36 52, Fax: 56 24 35 88,  
Correo electrónico: dgvs@semarnat.gob.mx, Página electrónica: www.semarnat.gob.mx/vs



SECRETARÍA DE  
MEDIO AMBIENTE Y  
RECURSOS NATURALES

# SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

Registro de Colección Científica; Clave: JAL-MAM-141-0203

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, con fundamento en el Artículo 32 Bis, Fracciones I, III, V, XXII y XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículo 5º, Fracción XI, Artículo 79, Fracciones I, II, III, VI, VII, y Artículo 80, Fracción I; Artículos 82, 83 y 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículo 31, Fracción VI del Reglamento Interior de la SEMARNAT; Artículos 1º, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre y las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000 por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional, otorga el Registro de Colección Científica a:

## CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE OCCIDENTE, DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

a nombre de la colección:

**"MUTAGÉNESIS"**

LA DIRECTORA GENERAL

  
GEORGITA RUIZ MICHAEL

México D. F., a 7 de agosto de 2003