

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



OPTIMIZACIÓN DE HIDRÓLISIS Y TINCIONES DE RAÍZ EN LA PLANTA *Allium*
cepa: POTENCIAL MODELO PARA ESTUDIO DE GENOTOXICIDAD Y
CITOTOXICIDAD

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA
MARIO CONTRERAS DUEÑAS

Ensenada, B.C.

Junio 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS
CAMPUS ENSENADA.



**“OPTIMIZACIÓN DE HIDRÓLISIS Y TINCIONES DE RAÍZ EN LA PLANTA
Allium cepa: POTENCIAL MODELO PARA ESTUDIO DE
GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD”**

TESIS PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO
DE

Licenciado en Biología

PRESENTA

**Mario Contreras Dueñas
354039**

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal y de acuerdo con el
Art. 19 del R.G.E.P.E.P, emite los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dra. Maria Evarista Arellano
García
DIRECTOR

Dr. Francisco Casillas
Figueroa
CODIRECTOR

Dr. Rafael Bello Bedoy
SINODAL

Dr. Alejandro Sánchez
González
SINODAL

Dra. Olivia Torres Bugarín
SINODAL

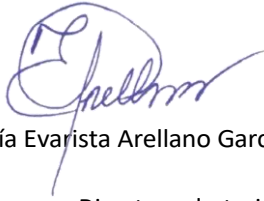
“Por la Realización Plena del Ser”

Resumen de la tesis de
Mario Contreras Dueñas
como requisito parcial para la obtención de la
Licenciatura en Biología.

Ensenada, Baja California, México. Mayo del 2025

“Optimización de hidrólisis y tinciones en el modelo *Allium cepa*”

Resumen aprobado:



Dra. María Evarista Arellano García

Directora de tesis



Dr. Francisco Casillas Figueroa

Codirector de tesis

Resumen

La cebolla (*Allium cepa*) es una planta ampliamente utilizada en estudios de genotoxicidad y citotoxicidad desde hace casi una década. Debido a su versatilidad, sensibilidad y bajo costo, *Allium cepa* ha sido un modelo óptimo para estudiar fármacos, contaminantes y nanomateriales, así como los efectos que estos producen en las células y en el ADN. Sin embargo, no ha sido descrita una metodología consistentemente efectiva para realizar los experimentos necesarios de manera apropiada. En este estudio se propone una metodología para montar los experimentos a partir de la comparación de dos colorantes y distintos métodos de hidrólisis. Se explica el procedimiento desde la preparación de los bulbos, los cortes de las raíces, la hidrólisis, las tinciones y el montaje, así como algunas recomendaciones y consideraciones generales. Se realizó la prueba *Allium* utilizando cebollas adquiridas en el supermercado local; se montaron tres replicas independientes aplicando ciclofosfamida (CP) a 0.5 mg/ml y tres réplicas aplicando agua destilada. Cada uno de estos montajes fue probado con distintos métodos de hidrólisis (ácido clorhídrico, ácido acético y la combinación de ambos) en distintas concentraciones y tiempos. Asimismo, se utilizaron dos colorantes (orceína acética y aceto-carmín) en cada uno de los tratamientos para probar su eficacia. Se encontró que el ácido clorhídrico (HCl) en concentración 1N durante 10 minutos a temperatura ambiente resultó más efectivo para ablandar la pared celular. Por otra parte, la tinción más efectiva para diferenciar el material genético en las células fue la orceína acética aplicada durante 30 minutos. Asimismo, se recomienda realizar los experimentos con cebollas frescas de una misma fuente, preferentemente cultivadas desde semilla para obtener resultados más precisos.

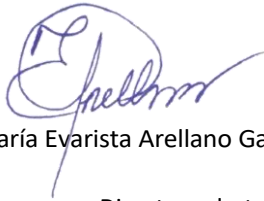
Palabras clave: cebolla, toxicidad, ciclofosfamida, orceína, aceto-carmín.

Resumen de la tesis de
Mario Contreras Dueñas
como requisito parcial para la obtención de la
Licenciatura en Biología.

Ensenada, Baja California, México. Mayo del 2025

“Optimización de hidrólisis y tinciones en el modelo *Allium cepa*”

Resumen en inglés aprobado por:



Dra. María Evarista Arellano García

Directora de tesis



Dr. Francisco Casillas Figueroa

Codirector de tesis

Abstract

The onion (*Allium cepa*) has been a widely used plant in genotoxicity and cytotoxicity studies for almost a decade. Due to its versatility, sensibility and low cost, *Allium cepa* has been an optimal model for studying drugs, contaminants and nanomaterials, as well as the effects caused on cells and DNA. However, a consistently effective methodology to conduct the experiments has not been described. This study proposes a methodology for setting up the experiments based on the comparison of two dyes and different hydrolysis methods. The methodology is explained starting from the preparation of bulbs, root cuts, hydrolysis, staining and sample preparation, as well as some general considerations and recommendations. The *Allium* test was performed using onions acquired at a local supermarket; three independent replicates were prepared applying cyclophosphamide (CP) at 0.05 mg/ml and three replicates applying distilled water. Each of these preparations was tested with different hydrolysis methods (hydrochloric acid, acetic acid and the combination of both) at different concentrations and time lapses. Two dyes (acetic orcein and acetocarmine) were also used in each treatment in order to test their effectiveness. Hydrochloric acid (HCl) at 1N concentration during 10 minutes at room temperature was found to be more effective in breaking up the wall cell. On the other hand, the most effective stain to differentiate genetic material in cells was acetic orcein applied during 30 minutes. It is recommended to perform the experiments with fresh onions from the same source, preferably grown from seed for more accurate results.

Key words: onion, toxicity, cyclophosphamide, orcein, acetocarmine.

Agradecimientos

A mis padres, cuyo apoyo incondicional hizo posible la realización de este trabajo, fueron una paz para mí tanto en los buenos como en los malos momentos y siempre han sido mi inspiración para seguir adelante. No hay palabras suficientes para agradecerles.

A la Universidad Autónoma de Baja California que prestó sus instalaciones para la realización de este trabajo; a los profesores de la Facultad de Ciencias que me dieron las herramientas y me prepararon no solamente para ser un profesionista, sino para siempre ser curioso y seguir aprendiendo todos los días; a mi codirector y sinodales, cuyos consejos y retroalimentación fueron de suma importancia para la realización de esta tesis.

A la Dra. Evarista Arellano, que a pesar de mis ausencias, errores y frustraciones, siempre me tuvo paciencia y siempre estuvo dispuesta a ayudarme a resolver cualquier problema. Su pasión por la ciencia es contagiosa y me animaba a continuar cuando sentía que no podía.

A Metzli, la persona que ha estado a mi lado, en quien más confío y la que me ha apoyado desde que inicié la universidad. Su cariño, comprensión y palabras de aliento han sido fundamentales en mi vida estos últimos años.

Resumen

La cebolla (*Allium cepa*) es una planta ampliamente utilizada en estudios de genotoxicidad y citotoxicidad desde hace casi una década. Debido a su versatilidad, sensibilidad y bajo costo, *Allium cepa* ha sido un modelo óptimo para estudiar fármacos, contaminantes y nanomateriales, así como los efectos que estos producen en las células y en el ADN. Sin embargo, no ha sido descrita una metodología consistentemente efectiva para realizar los experimentos necesarios de manera apropiada. En este estudio se propone una metodología para montar los experimentos a partir de la comparación de dos colorantes y distintos métodos de hidrólisis. Se explica el procedimiento desde la preparación de los bulbos, los cortes de las raíces, la hidrólisis, las tinciones y el montaje, así como algunas recomendaciones y consideraciones generales. Se realizó la prueba *Allium* utilizando cebollas adquiridas en el supermercado local; se montaron tres replicas independientes aplicando ciclofosfamida (CP) a 0.5 mg/ml y tres réplicas aplicando agua destilada. Cada uno de estos montajes fue probado con distintos métodos de hidrólisis (ácido clorhídrico, ácido acético y la combinación de ambos) en distintas concentraciones y tiempos. Asimismo, se utilizaron dos colorantes (orceína acética y aceto-carmín) en cada uno de los tratamientos para probar su eficacia. Se encontró que el ácido clorhídrico (HCl) en concentración 1N durante 10 minutos a temperatura ambiente resultó más efectivo para ablandar la pared celular. Por otra parte, la tinción más efectiva para diferenciar el material genético en las células fue la orceína acética aplicada durante 30 minutos. Asimismo, se recomienda realizar los experimentos con cebollas frescas de una misma fuente, preferentemente cultivadas desde semilla para obtener resultados más precisos.

Palabras clave: cebolla, toxicidad, ciclofosfamida, orceína, aceto-carmín.

Abstract

The onion (*Allium cepa*) has been a widely used plant in genotoxicity and cytotoxicity studies for almost a decade. Due to its versatility, sensibility and low cost, *Allium cepa* has been an optimal model for studying drugs, contaminants and nanomaterials, as well as the effects caused on cells and DNA. However, a consistently effective methodology to conduct the experiments has not been described. This study proposes a methodology for setting up the experiments based on the comparison of two dyes and different hydrolysis methods. The methodology is explained starting from the preparation of bulbs, root cuts, hydrolysis, staining and sample preparation, as well as some general considerations and recommendations. The *Allium* test was performed using onions acquired at a local supermarket; three independent replicates were prepared applying cyclophosphamide (CP) at 0.05 mg/ml and three replicates applying distilled water. Each of these preparations was tested with different hydrolysis methods (hydrochloric acid, acetic acid and the combination of both) at different concentrations and time lapses. Two dyes (acetic orcein and acetocarmine) were also used in each treatment in order to test their effectiveness. Hydrochloric acid (HCl) at 1N concentration during 10 minutes at room temperature was found to be more effective in breaking up the wall cell. On the other hand, the most effective stain to differentiate genetic material in cells was acetic orcein applied during 30 minutes. It is recommended to perform the experiments with fresh onions from the same source, preferably grown from seed for more accurate results.

Key words: onion, toxicity, cyclophosphamide, orcein, acetocarmine.

Índice

Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
Introducción.....	9
Antecedentes.....	12
Hipótesis y objetivos	16
Hipótesis	16
Objetivo general.....	16
Objetivos específicos	16
Metodología.....	17
<i>Allium cepa</i>	17
Preparación de los colorantes	23
Lectura al microscopio y análisis estadístico.....	24
Resultados	27
Consideraciones al protocolo original	27
Cortes de la zona de proliferación.....	27
Hidrólisis.....	27
Tinciones.....	28
Montaje de las laminillas	28
Impacto estacional de los experimentos.....	29
Análisis estadísticos.....	30
Citotoxicidad.....	31
Genotoxicidad.....	35

Discusión	39
Comparación con trabajos anteriores.....	42
Variación de los resultados	43
Conclusiones.....	45
Literatura citada.....	47

Índice de figuras

Figura 1. Incremento de artículos sobre <i>Allium test</i> en Web of Science.....	13
Figura 2. Detalles de los tratamientos utilizados.....	18
Figura 3. Detalles del corte de las raíces de <i>Allium cepa</i> para preparar los experimentos	19
Figura 4. Protocolo general para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad con el modelo <i>Allium cepa</i>	20
Figura 5. Detalles de las cebollas dentro de los tubos Falcon.....	21
Figura 6. Cebollas (tratamientos y controles) en crecimiento dentro de incubadora a 25°C.....	21
Figura 7. Raíces de cebollas fijadas con metanol 80% dentro de tubo Eppendorf	22
Figura 8. Detalles de las laminillas montadas	23
Figura 9. Preparación de orceína acética a partir de la presentación en polvo	24
Figura 10. Ejemplo de fases del ciclo celular.....	25
Figura 11. Detalles de la raíz de cebolla	27
Figura 12. Zona de proliferación de la raíz	29
Figura 13. Comparación de fases del ciclo celular utilizando dos colorantes (40x).....	31
Figura 14. Comparación del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular procesadas con las dos tinciones sobre los mismos ejemplares en raíces distintas	32
Figura 15. Comparación del porcentaje del índice mitótico en el control y el tratamiento en ambas tinciones.....	33

Figura 16. Distintas aberraciones cromosomales en células teñidas con orceína acética (40x)	35
Figura 17. Comparación del número de micronúcleos por cada 1000 células en el control y el tratamiento con ciclofosfamida en ambas tinciones	36
Figura 18. Comparación del número de anomalías por cada 1000 células en el control y el tratamiento con ciclofosfamida en ambas tinciones	38
Figura 19. Comparación de micrografías celulares de <i>Allium cepa</i> teñidas con orceína acética.....	43

Índice de tablas

Tabla I. Resultados de las estrategias de hidrólisis utilizadas	28
Tabla II. Valores de media de los factores de variación con cada una de las variables de respuesta (fases del ciclo celular y anomalías) y el índice mitótico con su desviación estándar.....	30
Tabla III. Resumen de análisis de variancia de dos factores (ANOVA) para la variable de respuesta índice mitótico	34
Tabla IV. Resumen de análisis de variancia de dos factores (ANOVA) para la variable de respuesta número de micronúcleos.....	37
Tabla V. Resumen de análisis de variancia de dos factores (ANOVA) para la variable de respuesta otras anomalías.	39

Introducción

La evaluación de la citotoxicidad y la genotoxicidad es importante en temas de salud pública porque permite estimar los riesgos que representan para los seres vivos y el medio ambiente la exposición a tóxicos y toxinas. Sustancias tóxicas como los pesticidas (Bolognesi, 2003), los fármacos (Zounkova et al., 2010), metales pesados (Fiskesjo, 1980; Llanos et al., 2000) o los nanomateriales (Brinch et al., 2016) en sus distintos ámbitos de aplicación, requieren de modelos de evaluación de cito y genotoxicidad de bajo costo, sencillos de ejecutar y que permitan la interpretación de resultados (Meneguetti, 2012).

La citotoxicidad y la genotoxicidad son dos procesos de daño celular que están íntimamente relacionados (Müller & Streffer, 1994). La citotoxicidad se define como los cambios que intervienen en las distintas fases del ciclo celular, pueden alterar la velocidad de la mitosis, los procesos de reparación de daño al ADN, así como las vías de muerte celular como la necrosis y la apoptosis (Bolognesi, 2003). Cuando los cambios en el ciclo celular se acumulan de manera excesiva en la vida de un organismo, pueden originar efectos acumulativos perniciosos para las células, los tejidos, los órganos o los individuos; en cambio, si los procesos de proliferación, reparación y muerte celular se presentan en condiciones normales, el organismo se conservará en homeostasis (Krenning et al., 2019). La genotoxicidad se define como los cambios que ocurren en el ADN y que afectan la estructura y función de los genes, incluso pueden ser el origen de la citotoxicidad al alterar los genes implicados en el proceso de mitosis y muerte celular (Ruiz De Arcaute et al., 2021).

Por su parte, la especie *Allium cepa* (*Amaryllidaceae*) es una planta modelo ampliamente utilizada para evaluar los efectos genotóxicos y citotóxicos de una sustancia de interés; el uso recurrente de esta especie para dicha evaluación se estandarizó y como resultado se creó la técnica *Allium test* (Levan 1938; Kohlmünzer et al., 1976; Fiskesjo, 1995; Malakahmad et al., 2018; Sarac et al., 2019; El-Kholy et al., 2023). El primer registro del uso de esta técnica se remonta al trabajo de Levan (1938), quien observó los efectos de la colchicina en las raíces de *Allium cepa*. La técnica

consiste en aplicar la sustancia de interés en agua y colocar los bulbos de cebolla dentro de la solución para promover el crecimiento de las raíces; luego de un tiempo determinado, se realizan cortes de las raíces, se tiñen y se observan en el microscopio para detectar células en división así como posibles afectaciones (Levan, 1938). La primera descripción de la técnica hecha por Levan consiste en exponer los bulbos de cebolla en colchicina por distintos periodos de tiempo; después, se transfieren los bulbos a agua pura para posteriormente, fijar las raíces en solución Navashin (Levan, 1938). Por último, las raíces se cortan en fragmentos de 20 a 30 μ y se tiñen con violeta genciana o “litchgrün”; los tiempos de fijación y tinción no son especificados (Levan, 1938).

Allium cepa es una planta sensible ante algunos contaminantes, tales como arsénico (Yi et al., 2007), cadmio (Jaiswal et al., 2022), pesticidas (Camilo-Cotrim et al., 2022) así como también ante algunos fármacos (Onwuamah et al., 2014; Das et al., 2021; Oftana et al., 2024), y por ello se considera uno de los modelos más eficientes para caracterizar citotoxicidad y genotoxicidad (Fiskesjö, 1995). Básicamente, debido a la óptima observación de las diferentes etapas de la mitosis y la identificación de los cromosomas, sumado a la sencillez del procedimiento, a los resultados rápidos, la fácil disponibilidad de la planta, además del bajo costo de los materiales, es un modelo adecuado para estudiar citotoxicidad y genotoxicidad (Fiskesjo, 1985). No obstante, algunas de las desventajas de este modelo, radican en su alta sensibilidad, ya que es posible que algunos contaminantes que afectan significativamente a la planta no afecten de la misma forma a organismos más complejos, por ejemplo, animales que son empleados como modelo de estudio tales como el pez cebra (*Danio rerio*). Otra desventaja es la dificultad de observar efectos a largo plazo al aplicar algunas sustancias que causen daño indirecto no medible, como por ejemplo, la disminución de absorción de nutrientes (Fiskesjö, 1995).

Para poder caracterizar los efectos de los contaminantes en las células, es necesario utilizar biomarcadores, los cuales son eventos o cambios medibles que ocurren dentro de un sistema biológico (Grandjean, 1995). Estos biomarcadores son variados y en el caso de *Allium cepa*, los más utilizados se describen a continuación

(Budantsev et al., 2020; Wu et al., 2010; Yi et al., 2007).

- Aberraciones cromosómicas: Incluyen fragmentación cromosómica, fusión cromosómica, formación de puentes cromosómicos, roturas cromosómicas, pérdida o ganancia de cromosomas, entre otros.
- Micronúcleos: Son pequeñas estructuras nucleares adicionales que se forman durante la división celular y contienen fragmentos cromosómicos dañados o cromosomas completos que no se incorporaron correctamente a las células hijas.
- Alteraciones en la morfología nuclear: Cambios en la forma y el tamaño del núcleo celular, como núcleos picnóticos (condensados), núcleos lobulados o núcleos con forma anormal.
- Células binucleadas: Presencia de células con dos núcleos en lugar de uno, lo cual indica problemas en la división celular.
- Células con cromatina condensada: La cromatina es la estructura en la que se organiza el ADN en el núcleo celular. En casos de genotoxicidad, la cromatina puede presentar una condensación anormal.

Las tinciones utilizadas en *Allium cepa* para evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de diferentes agentes, son diversas y algunas de ellas no han sido suficientemente evaluadas en relación con su efectividad para revelar los daños al ADN. Las técnicas de tinción más comunes son: aceto-carmín (Mohammed et al., 2015), orceína acética (Ping et al., 2012), safranina (Kumari et al., 2009), fucsina (Sivaram et al., 2021), reactivo de Schiff (Alavi et al., 2023), hematoxilina y el modelo panóptico rápido (Meneguetti, 2012).

Dada la diversidad de técnicas de tinción y montaje que se utilizan para evaluaciones citológicas con estos modelos vegetales, el presente proyecto propone optimizar las técnicas de tinción de las células de raíces de *Allium cepa*, como modelo para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad, de tal forma que permita observar las distintas fases del ciclo celular y definir los criterios de conteo de las principales anomalías nucleares que revelan los niveles de genotoxicidad de los tratamientos de prueba.

Antecedentes

Desde la primera descripción de cuerpos extranucleares en el citoplasma (cuerpos de Howell-Jolly) como indicador de daño al núcleo celular (Howell, 1890), se han desarrollado distintas técnicas para evaluar efectos citotóxicos y genotóxicos. Uno de los primeros fue sin duda la explicación del efecto de la colchicina sobre células en mitosis de raíces de *Allium cepa* (Levan, 1938). Posteriormente siguieron algunos estudios emblemáticos utilizando las plantas de *Vicia faba* (haba) y *Allium cepa*, como el trabajo donde se comparan las aberraciones cromosómicas desarrolladas a partir de la reacción de varios químicos (Kihlman, 1958, 1963, 1975; Larsson & Kihlman, 1960).

Los micronúcleos (MN) son pequeñas estructuras formadas a partir de cromosomas rezagados cubiertos por la envoltura nuclear luego de no haber sido incorporados al núcleo durante la replicación celular (Krupina et al., 2021). El ensayo de micronúcleos fue descrito por Hayashi en células de médula ósea y en eritrocitos de sangre periférica de ratón (Hayashi et al., 1994) y posteriormente formalizado en un protocolo estándar (Hayashi et al., 2007); este ensayo se ha utilizado para evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de fármacos de amplio uso como los antineoplásicos y nanomateriales (Castañeda-Yslas et al., 2021), aves (Baesse et al., 2019), peces (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Flores-Galván et al., 2017; Flores-Galván et al., 2020), en felinos (Arellano-García et al., 2020) y en otros vertebrados (Zúñiga-González et al., 2000, 2003). No obstante, este ensayo no se puede aplicar en algunos vertebrados como el humano, a no ser que sean esplenectomizados, esto debido a la alta eficiencia del sistema reticuloendotelial en filtrar eritrocitos viejos, anómalos o con inclusiones (Afshari et al., 1994; Ramírez-Muñoz et al., 1999; Schlegel & MacGregor, 1984) y carecer de bazo que es el principal filtro de los eritrocitos deteriorados.

Otra técnica aplicable en humanos que es mínimamente invasiva y contempla también el registro de procesos aneugénicos, clastogénicos, de reparación y muerte celular es la técnica de micronúcleos en epitelio bucal (Bolognesi et al., 2013) que se ha estandarizado a nivel internacional en cuanto a los criterios de conteo de anomalías

celulares y procedimientos básicos de laboratorio (Torres-Bugarín & Ramos-Ibarra, 2013).

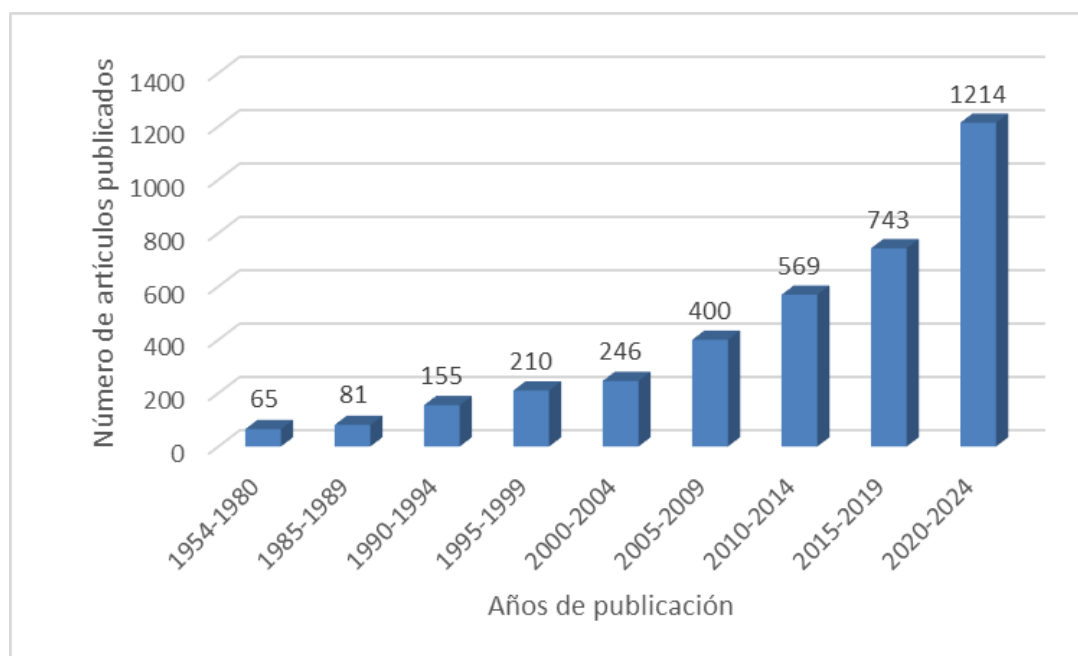


Figura 1. Incremento de artículos sobre *Allium test* en Web of Science. Se utilizó la etiqueta “*Allium test*” en el buscador avanzado de la base de datos y se registró el número de artículos publicados por año. El incremento es de aproximadamente 6.44 artículos por año.

Desde la década de los ochenta, ha habido un incremento con una tendencia exponencial en el número de artículos publicados referentes a la planta *Allium cepa* en la plataforma Web of Science, lo que evidencia que el uso de este organismo es ampliamente utilizado (Figura 1). A pesar de que las técnicas basadas en modelos vegetales fueron las primeras en aplicarse, hasta donde sabemos, poco se ha descrito en relación con la estandarización de los procedimientos experimentales en general y especialmente en las rutinas de conteo y tinción de las preparaciones. Por ejemplo, Arya y Mukherjee (2014) utilizan azul de Evan y orceína acética para estudiar cómo las células expuestas al cadmio presentaron aberraciones cromosómicas, micronúcleos y fragmentación del ADN (Arya & Mukherjee, 2014). Basu y Tripura (2021) explican cómo el extracto de hojas y semillas de la planta *Cascabela thevetia* (*Apocynaceae*)

utilizada con fines medicinales mostró ser citotóxica, causando la aparición de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y reducción en el índice mitótico en ambos modelos, en los cuales usaron como método de tinción orceína acética (Basu & Tripura, 2021). Con el uso de aceto-carmín como técnica de tinción en el ensayo *Allium cepa*, se registraron las aberraciones inductoras de apoptosis en las células expuestas al extracto de *Amaranthus spinosus* (*Amaranthaceae*) (Prajitha & Thoppil, 2017). En otro trabajo, también con aceto-carmín, al probar el extracto del tallo de *Nicotiana plumbaginifolia* (*Solanaceae*) se encontró que causa aberraciones cromosómicas y disminución del índice mitótico en *Allium cepa* (Mushtaq et al., 2019).

La safranina es otro colorante utilizado para distinguir anomalías en células de *Allium cepa* (Kumari et al., 2009). En su estudio (Kumari et al., 2009), encontraron que la safranina permitió estimar una relación dosis-dependiente en el número de anomalías celulares expuestas experimentalmente a nanopartículas de plata comerciales (AgNP). Además, encontraron que las AgNPs penetran las células vegetales disminuyendo el índice mitótico por arresto del ciclo celular en 60 %, y además induce la formación de rupturas cromosómicas y puentes nucleoplasmáticos (Kumari et al., 2009). La fucsina es otro colorante utilizado con buenos resultados. Sivaram y colaboradores (2022) lo utilizaron recientemente para examinar la citogenotoxicidad de perfluorooctanato de sulfuro y del ácido pirolígnico sobre células de raíces de *Allium cepa*, y en ambos, estos tóxicos también fueron capaces de inducir una disminución del índice mitótico y producir daño al ADN de manera dependiente de la dosis (Sivaram et al., 2021, 2022). Además de los anteriores, también se usa con excelentes resultados el reactivo de Schiff (Alavi et al., 2023), la hematoxilina (Subramanyam & Subramaniam, 1962) y el modelo panóptico rápido (Meneguetti, 2012).

A partir de lo anteriormente expuesto, es necesario optimizar la metodología de evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad en plantas. Esto con el fin de obtener resultados comparables y con posibilidades de desarrollar recomendaciones para que los

tomadores de decisiones puedan regular el uso de fármacos, plaguicidas, nanomateriales y otras sustancias de uso general. Es indispensable no solo saber si todos estos métodos de tinción son equivalentes, sino también las formas de preparación de las laminillas y los criterios de conteo de las anomalías nucleares que estos modelos celulares para asegurar la replicabilidad de los experimentos y la reproductibilidad de los resultados.

La estandarización del método de tinción es de particular importancia, ya que puede originar falsos positivos e influir en los resultados, como lo demostraron Bonassi et al. (2011) con las pruebas de epitelio bucal, en un estudio que involucró 30 laboratorios. Este grupo de trabajo observó un aumento anormal de micronúcleos para tinciones no específicas de ADN, e indicaron que la heterogeneidad en el método de tinción es la más importante fuente de variación al contribuir en 38% de la variabilidad en la frecuencia de MN (Bonassi et al., 2011).

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Las tinciones ADN específicas son las que permiten reproducir los procesos para evaluar la genotoxicidad y la citotoxicidad en *Allium cepa*.

Objetivo general

Optimizar los procesos de hidrólisis, tinción, y montaje, así como los criterios de conteo en células de raíces de *Allium cepa* para medir la genotoxicidad y la citotoxicidad.

Objetivos específicos

Ensayar diferentes métodos y tiempos de hidrólisis empleados para ablandar las paredes celulares en células meristemales de *Allium cepa* con inducción cito/genotóxica por ciclofosfamida en la concentración de 0.5 mg/ml.

Ensayar diferentes tiempos de tinción de los colorantes orceína acética y acetocarmín, empleados para teñir células meristemales de *Allium cepa* con inducción cito/genotóxica por ciclofosfamida en la concentración de 0.5 mg/ml.

Comparar los biomarcadores índices mitótico, micronúcleos y otras anormalidades de las tinciones ensayadas con el modelo *Allium cepa* expuesto a agua (control negativo) y a ciclofosfamida (control positivo).

Metodología

Allium cepa

La cebolla (*Allium cepa*) es una planta anual de gran importancia económica. Domesticada hace unos 5000 años, es utilizada principalmente en la industria alimentaria. *Allium cepa* es una planta monocotiledónea con un número de cromosomas $2n=16$ (Brewster, 2008). Su ciclo de vida comienza con la fase juvenil, cuando una semilla emerge y se desarrolla como plántula (Brewster, 2008). Después comienza la fase termo, donde la plántula juvenil crece, desarrolla un bulbo subterráneo y culmina con la inducción de la inflorescencia. Durante la fase de competencia, la planta desarrolla la inflorescencia. La fase de terminación es la última etapa del ciclo, donde las flores son completamente visibles, y terminan desarrollando las semillas iniciando de nuevo el ciclo (Brewster, 2008).

Se utilizó el modelo *Allium cepa* descrito por Fiskesjo (1985); en general se desarrollaron dos tratamientos con tres réplicas independientes por tratamiento (Fiskesjo et al., 1985). El control negativo se desarrolló con agua destilada y el control positivo con ciclofosfamida 0.5 mg/mL. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas independientes. Los detalles de los tratamientos se representan en la figura 2.

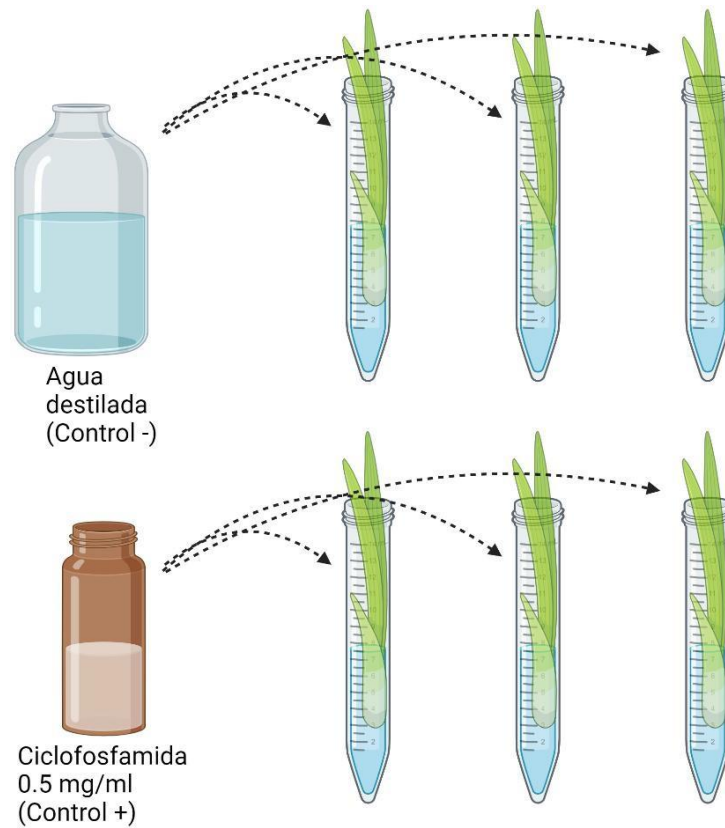


Figura 2. Detalles de los tratamientos utilizados. Se realizaron tres réplicas de cebolla en agua destilada como control negativo con el fin de probar la técnica en cebollas en condiciones normales. Por otro lado, se realizaron tres réplicas en ciclofosfamida a 0.5 mg/ml como control positivo para probar la técnica en cebollas afectadas con una antineoplásico con evidencia de daño cito y genotoxicológico.

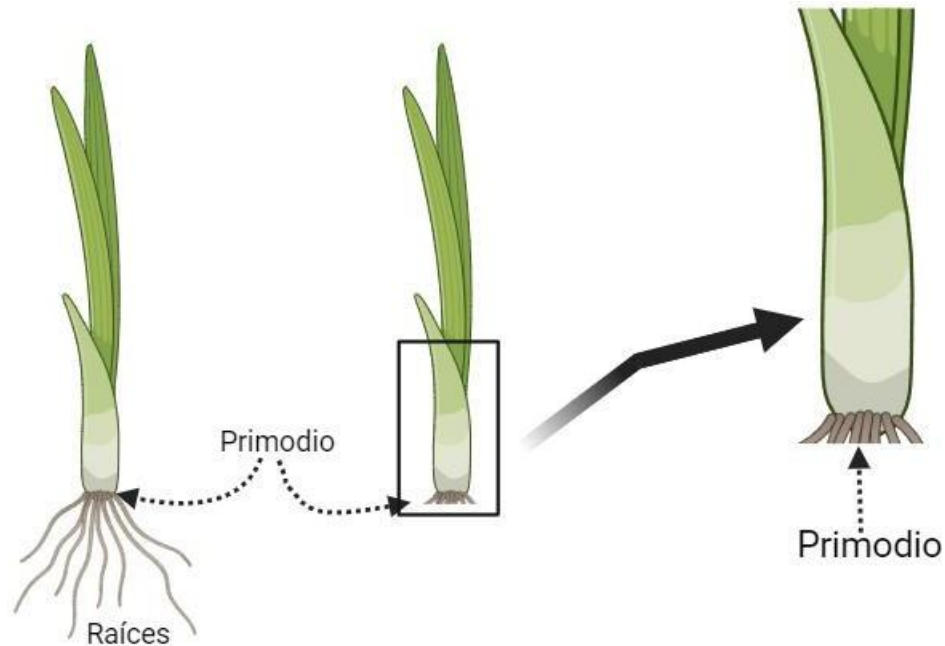


Figura 3. Detalles del corte de las raíces de *Allium cepa* para preparar los experimentos. Obsérvese el corte sin destruir los primodios.

Se compraron cebollas (*Allium cepa*) en el supermercado local de un tamaño aproximado de 20-25 cm y con un peso de entre 12-15 g. Para cada tratamiento se utilizaron tres bulbos de *Allium cepa* (2-3 cm de diámetro). Se lavaron las cebollas con agua destilada para eliminar tierra o residuos; las raíces se eliminaron sin destrucción primordial (Figura 3). Las cebollas se colocaron en un vaso de precipitado de 1 l con agua destilada y ubicadas en una incubadora a 25°C con el fin de aclimatarlas y promover el crecimiento de nuevas raíces. Después de 72 horas, las nuevas raíces crecieron de 3 a 5 cm.

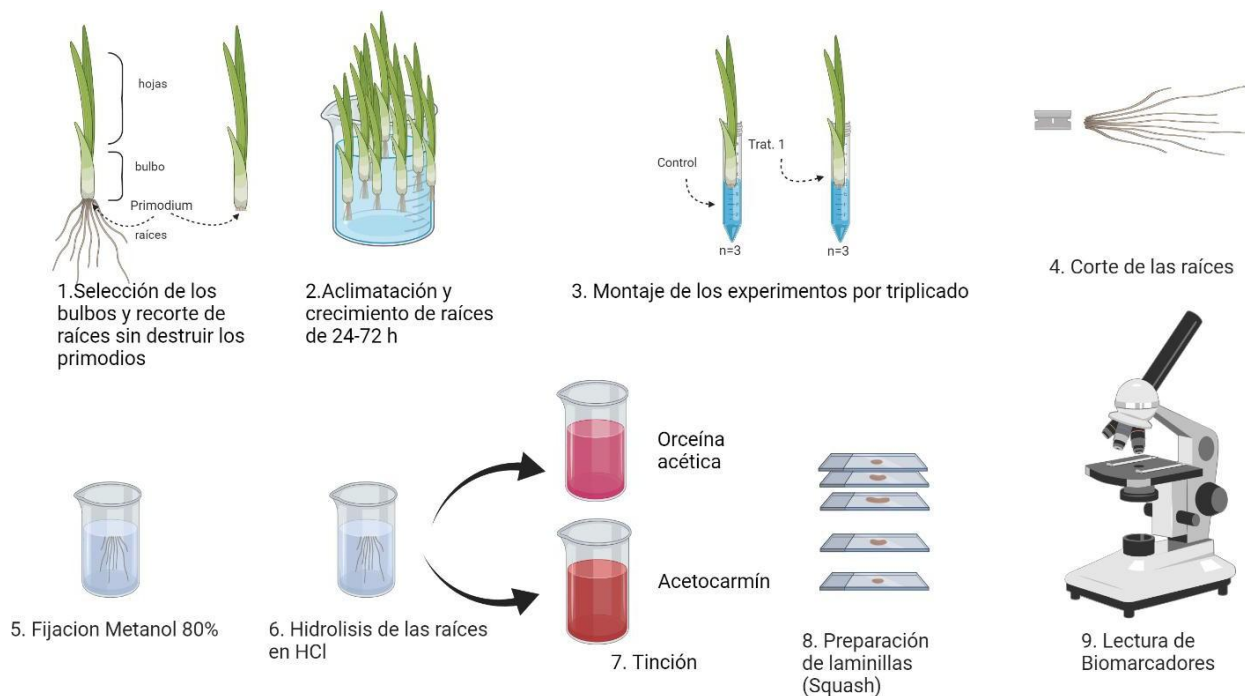


Figura 4. Protocolo general para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad con el modelo *Allium cepa* (Casillas-Figueroa et al., 2020). Las variables a considerar para este trabajo, el agente hidrolizante, la concentración y el tiempo de la hidrólisis, así como el tiempo de la tinción.

Utilizando el protocolo descrito por Casillas-Figueroa et al. (2020) (Figura 4) basado en la metodología de Fiskesjo (1985), se colocaron tres de las cebollas en tubos Falcon de 15 ml o 50 ml según el grosor del bulbo, cada uno conteniendo 6 ml de una solución citotóxica de ciclofosfamida a 0.5 mg/ml. Otras tres cebollas se colocaron en tubos Falcon de 15 ml, cada uno con 6 ml de agua destilada como control (Figura 5). Cuando fue necesario, se utilizaron palillos de madera para suspender las cebollas dentro de los tubos y evitar que se deslicen hasta el fondo. Esto se llevó a cabo para cada una de las tinciones a probar. Las cebollas se colocaron nuevamente en la incubadora a 25°C (Figura 6).

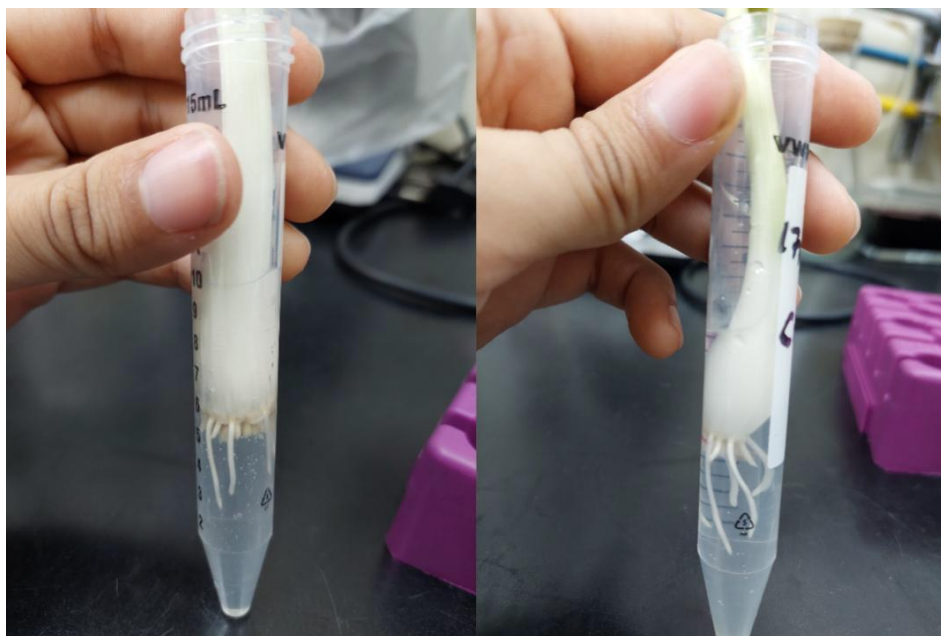


Figura 5. Detalles de las cebollas dentro de los tubos Falcon. El bulbo debe estar totalmente sumergido, pero dejando un espacio en el fondo para promover el desarrollo de las raíces nuevas, sin obstaculizar su crecimiento.

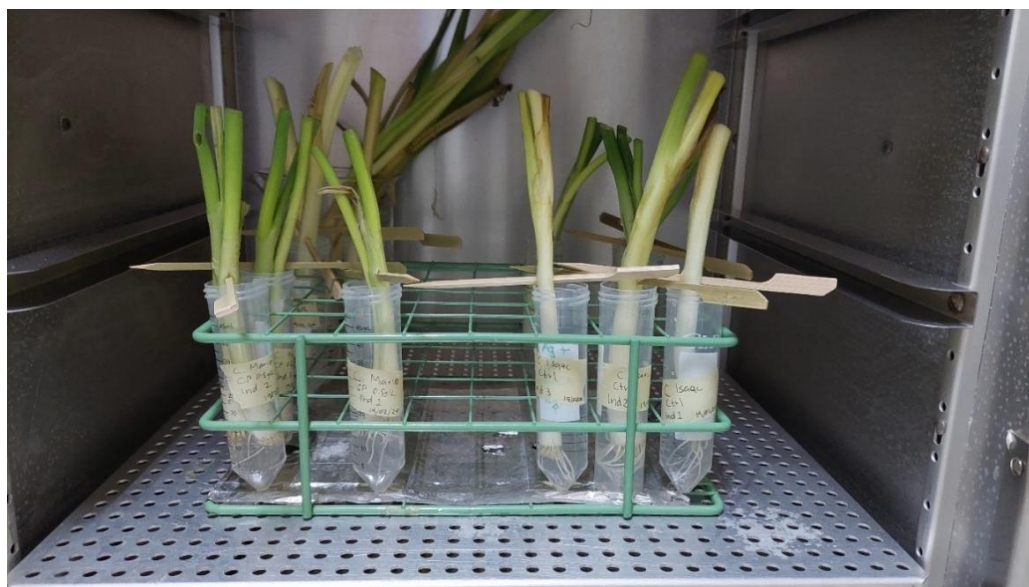


Figura 6. Cebollas (tratamientos y controles) en crecimiento dentro de incubadora a 25°C. Las cebollas fueron monitoreadas diariamente para prevenir el deterioro y realizar los cambios de agua cuando fuera necesario.

Después de 24 horas en el tratamiento, las cebollas con ciclofosfamida fueron lavadas con agua destilada para frenar la acción del antineoplásico en las células. Se aforaron los tubos con agua destilada a 6 ml durante 72 horas más. Una vez transcurrido este tiempo, se cortaron aproximadamente 2 cm de las raíces viables y se depositaron en tubos Eppendorf de 2 ml con metanol al 80% para fijarlas (Figura 7). Una vez fijadas, las raíces permanecieron viables durante cuatro meses.



Figura 7. Raíces de cebollas fijadas con metanol 80% dentro de tubo Eppendorf. Dentro del tubo pueden permanecer hasta viables hasta cuatro meses.

Después de la fijación, se procedió a la hidrólisis de las raíces en ácido clorhídrico (HCl) 1N a temperatura ambiente durante 15 minutos; posteriormente se realizaron enjuagues suaves con agua destilada, para después teñirlas con los dos colorantes bajo prueba: orceína acética y aceto-carmín, que son los métodos de tinción más utilizados para este ensayo. La tinción con orceína se ejecutó durante 30 minutos (Fiskesjo et al., 1985), mientras que la tinción con aceto-carmín se efectuó durante 40 minutos (Haque & Ghosh, 2017). Después de las tinciones, se prepararon las laminillas y se realizaron los montajes con la técnica de squash con aproximadamente 1 o 1.5 cm de raíz. Al montar la raíz se agregó una gota de ácido acético al 45%; el squash se llevó a cabo con la ayuda de la goma

de borrar de un lápiz realizando movimientos circulares suaves (Figura 8). Posteriormente se realizó la observación de las células en microscopio óptico con objetivo 40x (Fiskesjö, 1995; Fiskesjo et al., 1985). El protocolo general de los experimentos se representa en la figura 3.



Figura 8. Detalles de las laminillas montadas. La parte inferior de las muestras, de coloración clara, es la zona de proliferación celular; esta parte es suave y maleable y es donde las células son visibles. En la parte superior, de coloración más oscura, las células se han diferenciado; esta parte es fibrosa y las células son poco visibles al microscopio.

Preparación de los colorantes

Orceína acética. Para preparar la solución, se calentaron 60 ml de ácido acético glacial hasta llegar al punto de ebullición. Una vez alcanzado este punto, se agregaron 2 g de orceína pura en polvo de manera pausada y gradual para evitar derrames (Figura 9). Posteriormente se le agregaron 40 ml de agua destilada. Se dejó enfriar por 1 hora y se filtró con papel filtro de 20 μm .



Figura 9. Preparación de orceína acética a partir de la presentación en polvo. La preparación se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una campana de extracción.

Aceto-carmin. Se utilizó un colorante líquido preparado de solución de Schneider (aceto-carmin). Únicamente se filtró con papel filtro de 20 μ m.

Lectura al microscopio y análisis estadístico

Posterior al montaje de las laminillas, se realizaron conteos de 1000 células para cada réplica, utilizando tres raíces por réplica. Se registró cada una de las fases del ciclo celular observadas en cada laminilla (Asita & Mokhobo, 2013). Asimismo, se registraron las distintas anomalías nucleares (Figura 10) para cada una de las técnicas de tinción; esto con la finalidad de probar si las estimaciones de los coeficientes de regresión y correlación entre las curvas dosis respuesta son estadísticamente similares para las tinciones ensayadas con los diferentes biomarcadores de daño citogenotóxico.

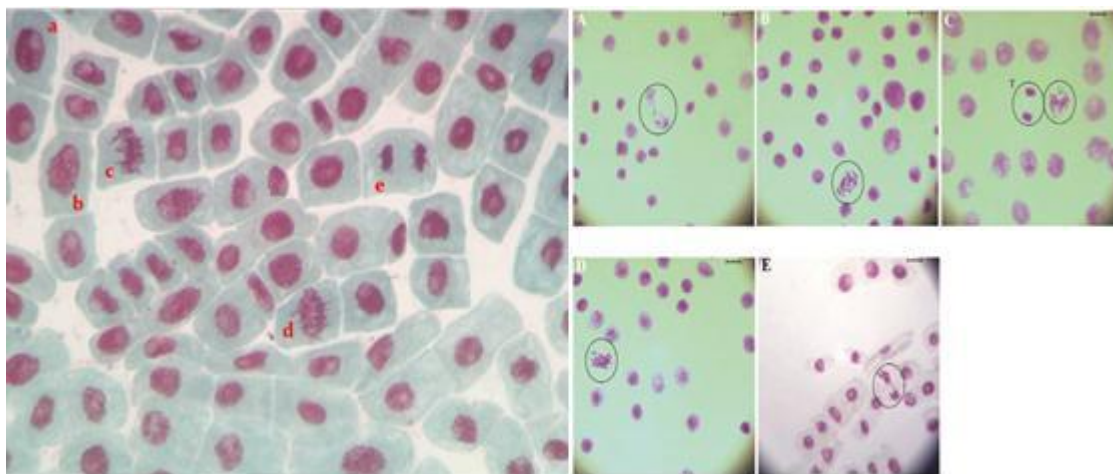


Figura 10. Ejemplo de fases del ciclo celular. En el lado izquierdo (a) interfase, (b) profase(c) metafase, (d) anafase y (e)telofase. Micrografía cortesía de Casillas-Figueroa, 2020. En el lado derecho se puede observar: (A) pérdida cromosómica y puente en anafase, (B) pérdida cromosómica, (C) adherencia cromosómica en metafase, (D) pérdida cromosómica en metafase y (E) puente cromosómico en telofase.

Para analizar los datos estadísticos, se utilizaron los programas GraphPad Prism© y Jamovi©. Se aplicó un Análisis de Varianza de dos vías (ANOVA II) para evaluar el efecto de dos factores: el tipo de tinción (orceína o aceto-carmín) y el tratamiento (agua o ciclofosfamida) sobre tres variables de respuesta:

- Índice mitótico, utilizado como biomarcador de citotoxicidad.
- Frecuencia de micronúcleos, indicador de eventos genotóxicos de tipo clastogénicos.
- Número total de anomalías celulares, considerado un biomarcador del daño genotóxico total.

Este análisis permitió determinar si los factores evaluados influyen significativamente en cada una de las variables de respuesta.

Los datos para los micronúcleos tuvieron que ser transformados para reducir el impacto de las varianzas de acuerdo con Zar (1984) con base en el supuesto que la frecuencia de micronúcleos se ajusta a una distribución de Poisson (Zar, 1984). La variable transformada se realizó con base en la siguiente expresión:

$$X^t = \sqrt[2]{X + 0.5}$$

El primer análisis de varianza (ANOVA) de dos vías contempló la comparación del índice mitótico como variable de respuesta que mide la proliferación celular. Como factor A, se contemplaron los tratamientos con agua y con ciclofosfamida, mientras que el Factor B se refiere al tipo de tinción (orceína y aceto-carmín). De forma que las hipótesis estadísticas son:

Ho: El tipo de tinción utilizada no afecta el índice mitótico

Ha: El tipo de tinción utilizada afecta el índice mitótico.

Ho: Los tratamientos de agua y CP no afectan el índice mitótico

Ha: Los tratamientos de agua y CP afecta el índice mitótico.

Ho: El índice mitótico no se afecta por la combinación del tratamiento y la tinción utilizada

Ha: El índice mitótico se afecta por la combinación del tratamiento y la tinción utilizada

El segundo análisis de varianza, de manera similar al anterior, contempla a la frecuencia de micronúcleos como variable de respuesta, con relación a los mismos factores: tratamiento y tipo de tinción. El último ANOVA involucra al número total de anormalidades como variable de respuesta frente a los mismos factores previamente mencionados.

Resultados

Consideraciones al protocolo original

Cortes de la zona de proliferación

Para obtener la zona de proliferación de la raíz se realizó un corte de aproximadamente 2 cm desde la cofia para garantizar que, durante la manipulación en el proceso de hidrólisis, enjuague y tinción, el segmento permanezca visible. Así se asegura la conservación de la zona de proliferación y se evita la zona de células diferenciadas (Figura 11).

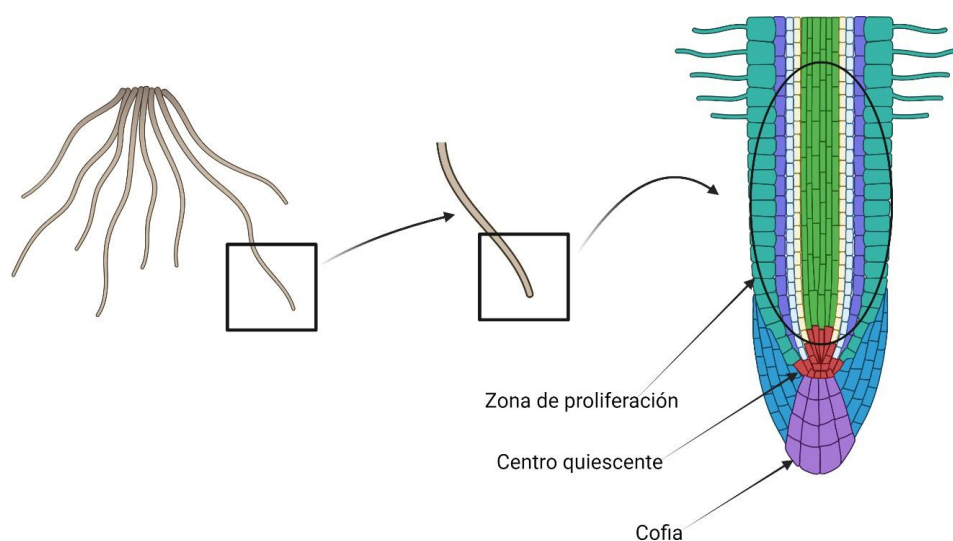


Figura 11. Detalles de la raíz de cebolla. Se hace énfasis en la zona de proliferación ya que es donde se encuentran las células sin diferenciar en las distintas fases del ciclo celular. La cofia, que se encuentra en la punta de la raíz, es una zona dura y donde la observación de células es más compleja.

Hidrólisis

La hidrólisis más efectiva resultó al utilizar ácido clorhídrico (HCl) 1N por un lapso de 12 a 15 minutos a temperatura ambiente. Otras concentraciones de HCl, tiempos y temperaturas resultaron poco consistentes, sin conseguir la eliminación de la pared celular e impidiendo una clara visualización de las células (tabla I).

Tabla I. Resultados de las estrategias de hidrólisis utilizadas. Los resultados consistentes son aquellos que fueron efectivos en todos los experimentos; los resultados inconsistentes son aquellos que fueron efectivos algunas veces; los resultados sin efecto no funcionaron.

Estrategia de hidrólisis	Agente hidrolizante	Tiempo (s)	Temperatura °C	Resultado
1	HCl 1 N	10	20 - 25	Consistente
2	HCl 1 N	10	60	Inconsistentes
3	Ac. Acético 45 % + HCl 1N (9:1)	10	20 – 25	Sin efecto
4	HCl 5 N	10	20 – 25	Sin efecto
5	HCl 5 N	20	20 – 25	Inconsistente

Para la hidrólisis, se ensayó un tiempo de hidrólisis de entre 20 y 40 segundos a temperatura ambiente (20-25 °C) con HCl concentrado sin diluir con resultados consistentes, esto es, una buena resolución en las imágenes obtenidas de manera general en prácticamente toda la muestra, sin destrucción de las células o el material genético.

Tinciones

Respecto a la duración del proceso de tinción, es necesario garantizar que la tinción reaccione con el ADN. En el caso de aceto-carmin es mejor proceder con tiempos de aproximadamente 45 minutos e ir disminuyendo el tiempo si los núcleos resultan sobre teñidos. Con orceína, 25-30 minutos es suficiente para conseguir que los núcleos se tiñan totalmente y lograr un buen contraste con el citoplasma.

Montaje de las laminillas

Si bien hay diferentes técnicas para realizar el squash, debido a la naturaleza de la raíz, es necesario prestar atención a la zona de proliferación celular (figura 12), ya que la parte posterior a esta resulta dura y fibrosa en comparación, pues en esa zona las células ya están diferenciadas. Se recomienda también comenzar de manera muy suave para determinar qué tan blanda se encuentra la raíz, ya que si se ejerce demasiada presión la muestra puede desintegrarse o presentar células que al microscopio luzcan excesivamente

elongadas.

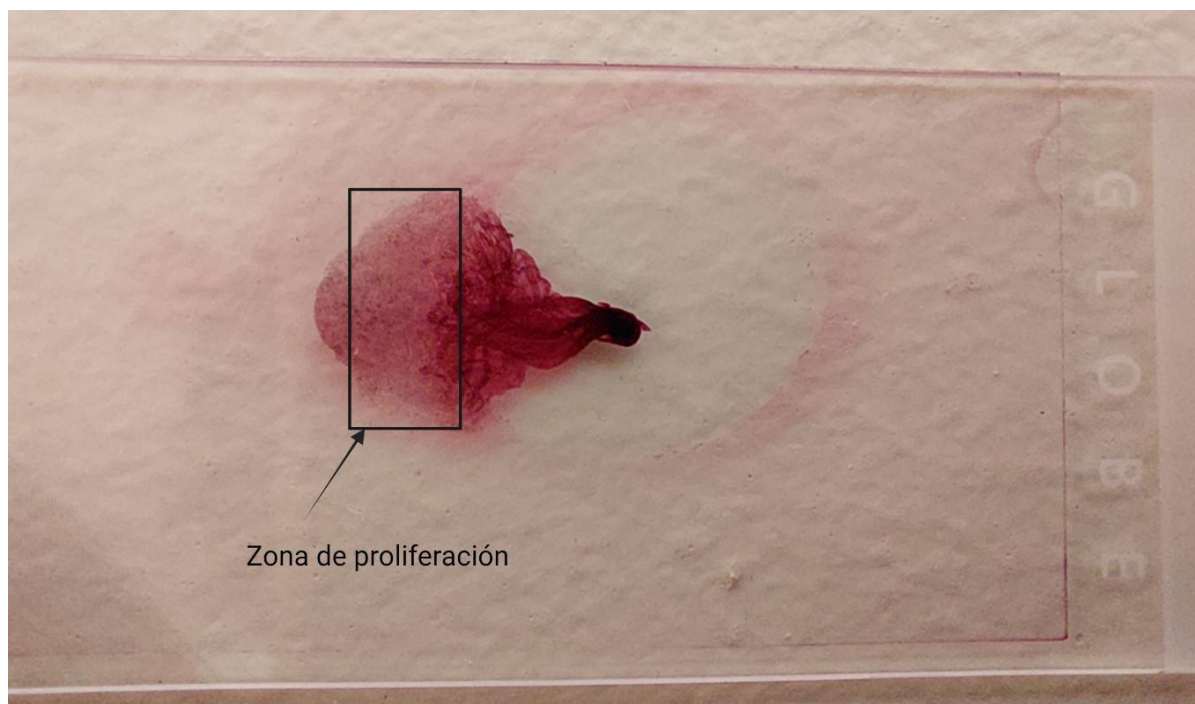


Figura 12. Zona de proliferación de la raíz. En esta zona se concentran la mayor cantidad de células en división visibles de la raíz con gran claridad; asimismo, se distinguen de manera clara las distintas fases del ciclo celular y las diferentes anomalías.

Otro aspecto que debe ser considerado al momento de observar las células es la configuración del microscopio. Para obtener mejores resultados, es recomendable ajustar la iluminación general, el condensador, la distancia y los objetivos en cada una de las muestras, con el fin de obtener imágenes lo más nítidas posible.

Impacto estacional de los experimentos

En el transcurso de la investigación experimental, se observó que los meses de diciembre y enero presentan condiciones subóptimas para la realización de experimentos con *Allium cepa*. Durante este período, se evidenció una marcada reducción en la actividad celular, sugiriendo un posible estado de aletargamiento o dormancia. En contraste, los meses correspondientes a la primavera y el verano ofrecen un ambiente más favorable, como se demuestra por el desarrollo óptimo observado en los experimentos durante esta estación. Fuera de esta ventana temporal, se percibe que las células exhiben un decremento en su vitalidad y crecimiento.

Análisis estadísticos

Tabla II. Valores de media de los factores de variación con cada una de las variables de respuesta (fases del ciclo celular y anomalías) y el índice mitótico con su desviación estándar.

Factores de variación		Variables de respuesta							
Tinción	Tratamiento	Interfase	Profase	Metafase	Anafase	Telofase	Micronúcleos	Otras anomalías	Índice mitótico
Orceína acética	Control	1103±42.1	94.7±20.8	13±3.46	9±4	41.3±10	3.33±4.04	3.33±0.57	12.4±1.46
	CP	1066±36.2	41.3±22.5	9.67±4.73	6.67±1.53	19.7±3.51	8.67±6.11	17.3±3.51	6.66±1.78
Aceto-carmín	Control	987±57.3	68.7±2.89	19.7±11	5±1	13.3±3.51	1±1	1±1	9.75±1.65
	CP	1049±51.6	45.7±8.02	19±0	7.33±2.31	14.7±4.73	5±2.65	3.67±1.53	7.56±0.84

Citotoxicidad

Se observaron diferencias entre las dos tinciones en la comparación de las diferentes fases del ciclo celular, tanto en las micrografías como en los conteos. En términos generales, la orceína proporciona un mejor contraste con el citoplasma. Por otro lado, en la tinción con aceto-carmín, los cromosomas son más nítidos y diferenciables en la profase y metafase en las muestras (Figura 13).

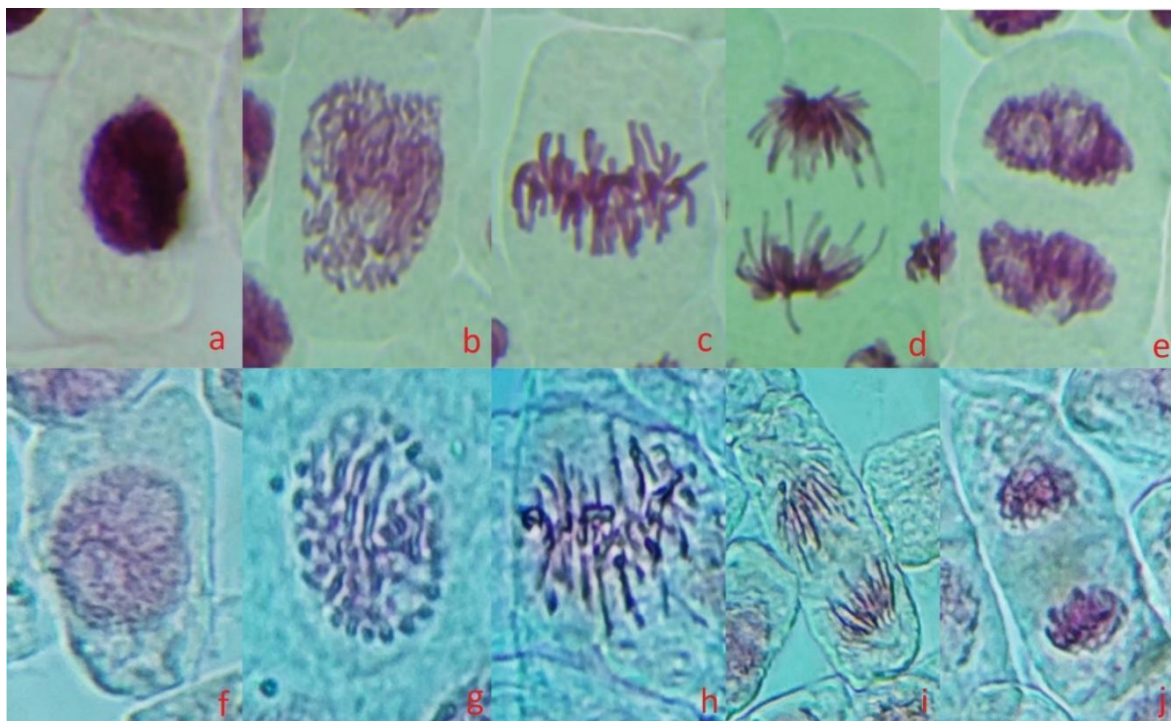


Figura 13. Comparación de fases del ciclo celular utilizando dos colorantes (40x): orceína acética (a-e) y aceto-carmín (f-j). De izquierda a derecha, células en interfase (a,f), profase (b,g), metafase (c,h) anafase (d,i) y telofase (e,j). Micrografías obtenidas con cámara Hilitand® vinculada a microscopio Primo Star™ con objetivo 40X.

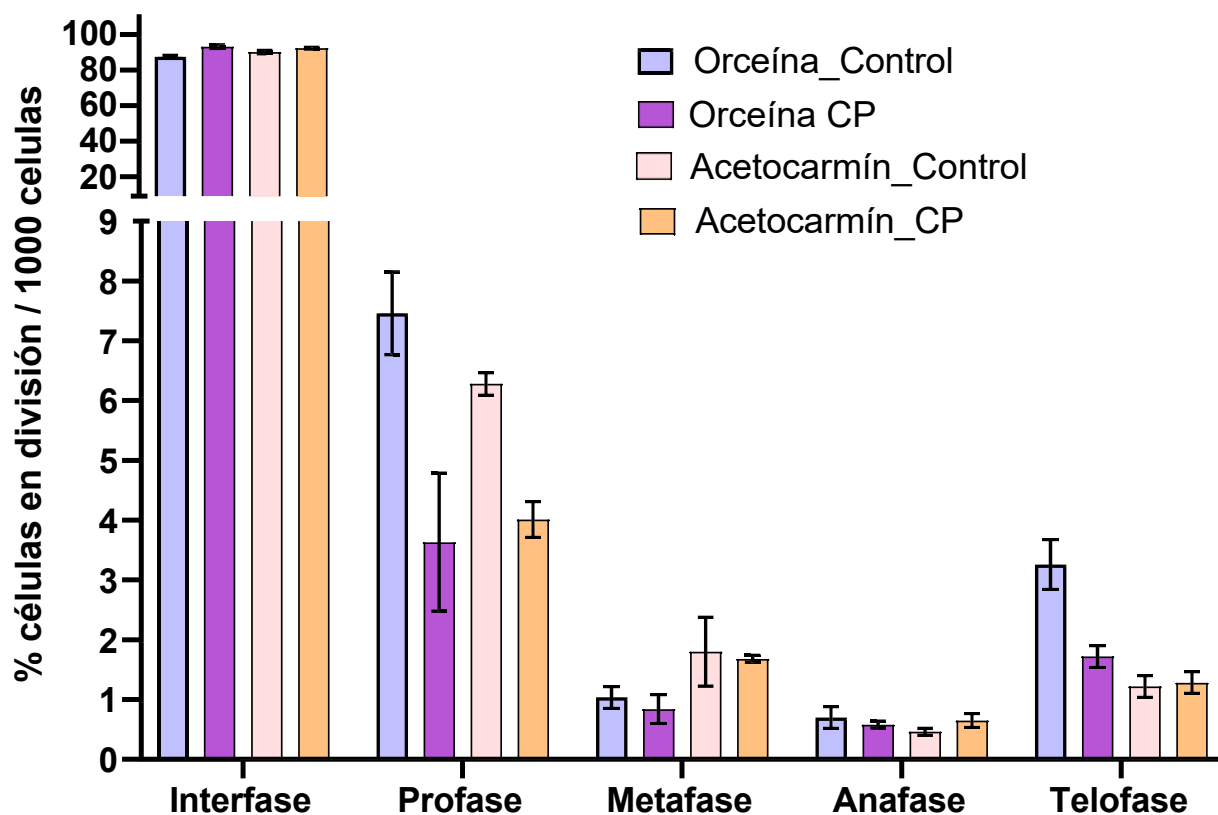


Figura 14. Comparación del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular procesadas con las dos tinciones sobre los mismos ejemplares en raíces distintas. Se observa que en interfase y anafase los resultados son muy similares utilizando ambas tinciones y ambos tratamientos. En profase y telofase, orceína ofrece resultados sólidos, particularmente en los controles. En metafase se presentaron resultados similares en ambos tratamientos y ambas tinciones.

La figura 14 muestra una gráfica comparativa general del porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular con cada uno de los colorantes y cada uno de los tratamientos. Esto se realizó con los conteos de 1000 células por cada tratamiento/tinción. Se observa en la figura 14 que la tinción con orceína es más efectiva que la de orceína acética, especialmente en las etapas profase y telofase del ciclo celular.

Al comparar el índice mitótico (IM), que resume los porcentajes de cada una de las fases del ciclo celular en una sola cifra ya que, en los controles el IM con orceína fue (12.4 ± 0.841), mientras que con aceto-carmin fue (9.75 ± 0.955). Para el tratamiento con ciclofosfamida, el IM ascendió a (6.66 ± 1.03) con orceína y (7.56 ± 0.49) con aceto-carmin (Figura 15, tabla III).

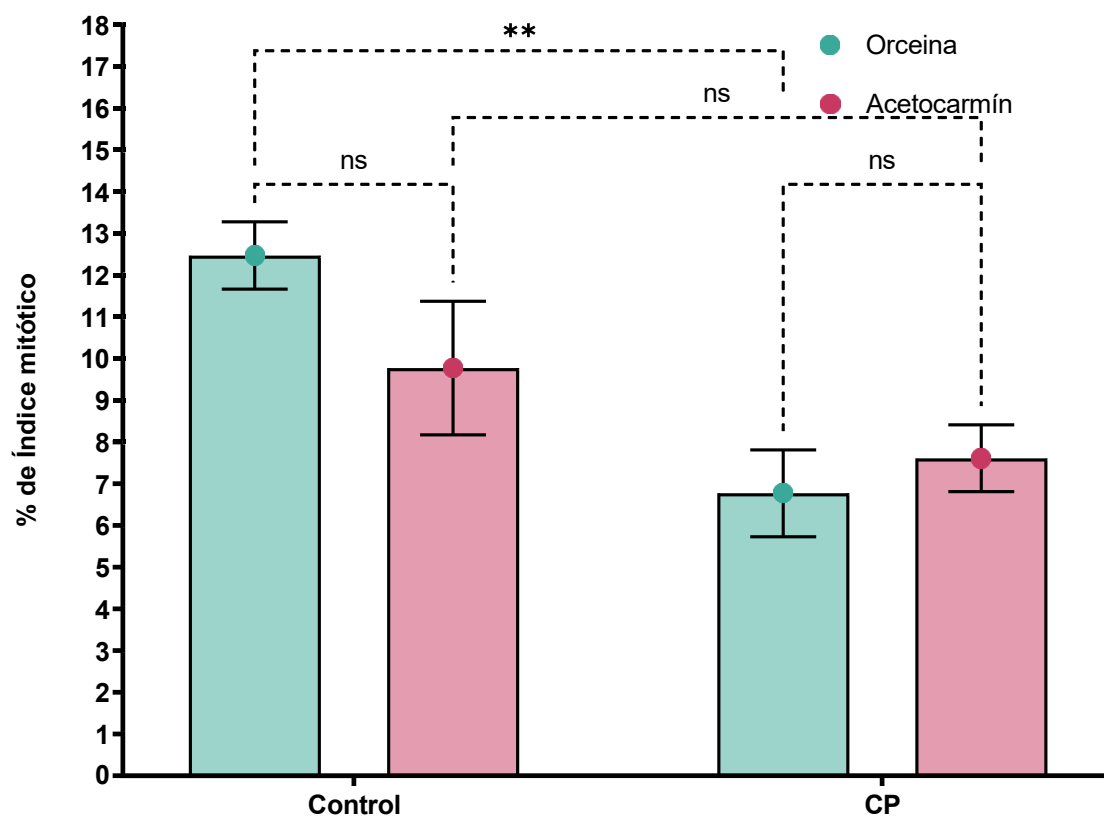


Figura 15. Comparación del porcentaje del índice mitótico en el control y el tratamiento en ambas tinciones. ** Indican diferencia significativa (**: $p < 0.01$). El símbolo ns indica diferencia no significativa. La comparación de orceína acética en control con orceína acética en CP muestra diferencia significativa. El resto de las interacciones no presentaron diferencias significativas.

Tabla III. Resumen de análisis de variancia de dos factores (ANOVA) para la variable de respuesta índice mitótico. Incluye la suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrados medios, valor F y valor p. ** Indica diferencia significativa.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F	Valor P
Interacción	9.399	1	9.399	4.476	0.0673
Tratamiento (Agua, CP)	46.33	1	46.33	22.06	0.0015**
Tinción (Orceína, Aceto-carmín)	2.595	1	2.595	1.236	0.2986
Residual	16.8	8	2.1		

Después de realizar una prueba ANOVA de dos vías, se observa en la figura 15 que la interacción de los tratamientos muestra diferencia significativa, particularmente en los resultados de la comparación de tratamiento y control utilizando la tinción de orceína acética. Esto sugiere que la tinción de orceína acética es más efectiva para detectar las diferencias en el índice mitótico al aplicar un agente citotóxico.

Genotoxicidad

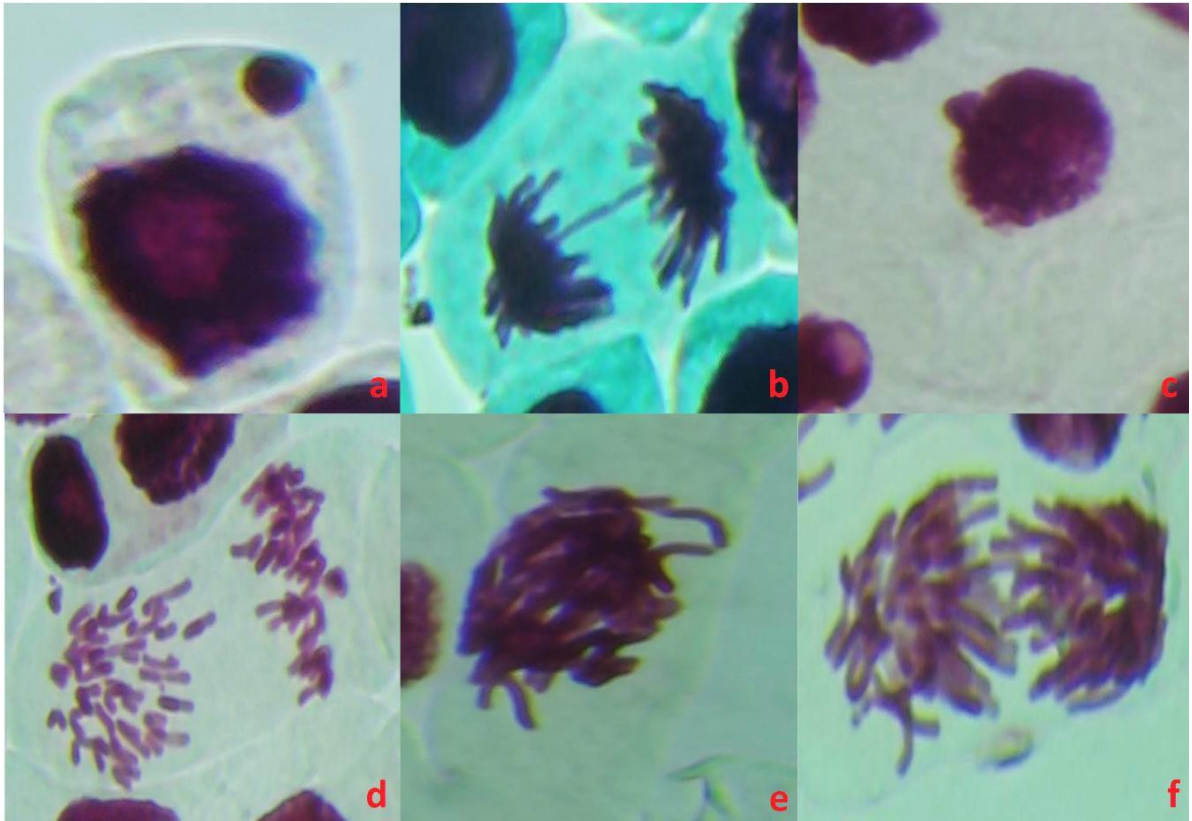


Figura 16. Distintas aberraciones cromosomales en células teñidas con orceína acética (40x). a) micronúcleo, b) puente de anafase, c) yema, d) fragmentación, e) cromosomas pegajosos, f) anafase multipolar. (Fuente: autoría propia). Micrografías obtenidas con cámara Hilitand® vinculada a microscopio Primo Star™ con objetivo 40X.

Las aberraciones presentadas con más frecuencia en las células se muestran en la figura 16. Algunas otras aberraciones observadas fueron c-metáfases, anafases y metafases interrumpidas, cromosomas viajeros, gigantismo y pérdida de cromosomas.

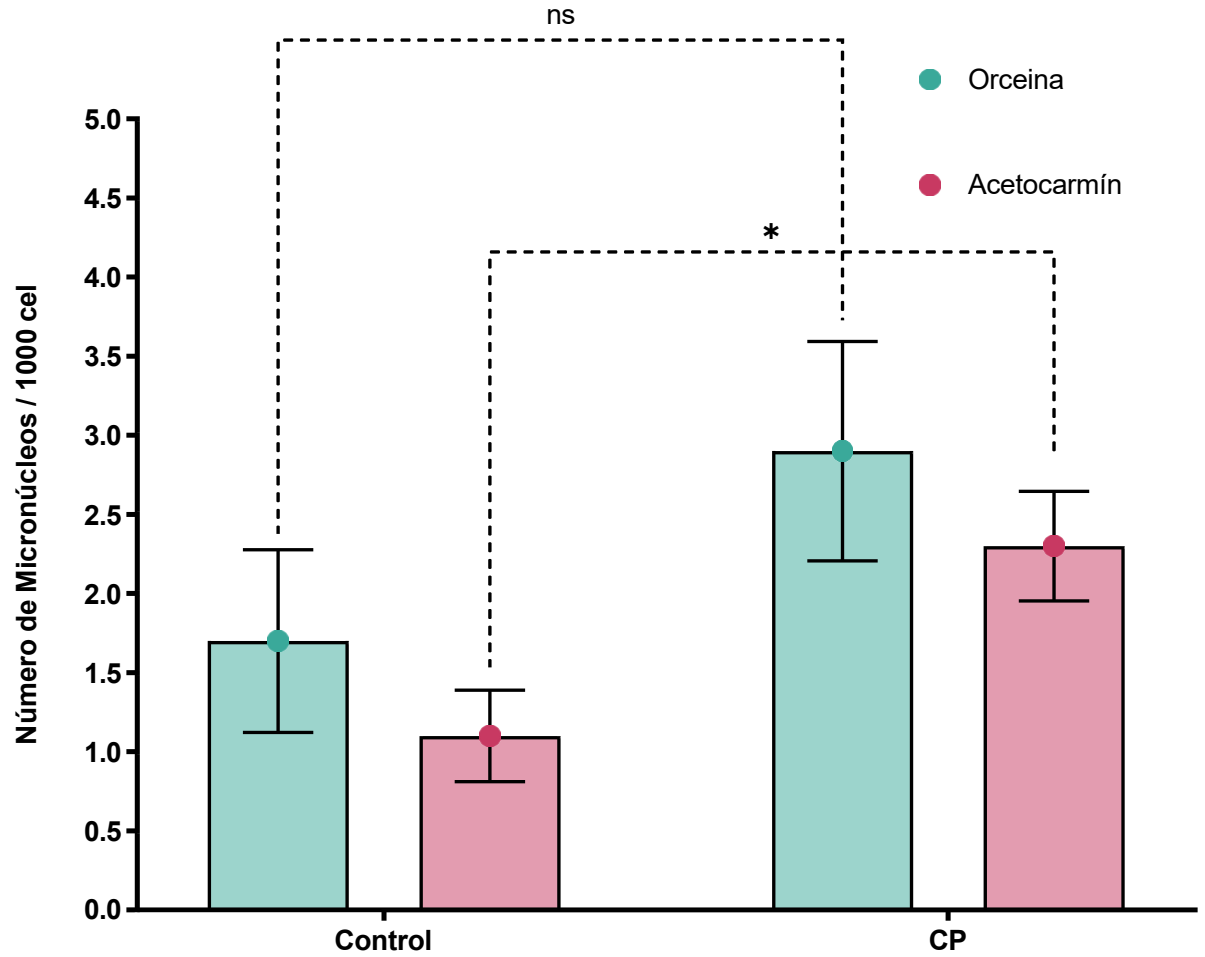


Figura 17. Comparación del número de micronúcleos por cada 1000 células en el control y el tratamiento con ciclofosfamida en ambas tinciones (datos transformados). * Indica diferencia significativa.

Tabla IV. Resumen de análisis de variancia de dos factores (ANOVA) para la variable de respuesta número de micronúcleos. Incluye la suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrados medios, valor F y valor p.* Indica diferencia significativa.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P
Interacción	1.479x10 ⁻³¹	1	1.479x10 ⁻³¹	1.94x10 ⁻³¹	>0.9999
Tratamiento (Agua, CP)	4.32	1	4.32	5.666	0.0445*
Tinción (Orceína, Aceto- carmín)	1.08	1	1.08	1.416	0.2681
Residual	6.1	8	0.7625		

De acuerdo con la comparación del tratamiento y el control utilizando ambas tinciones con el número de micronúcleos, se muestra una diferencia significativa utilizando el colorante de aceto-carmín con respecto a la orceína acética.

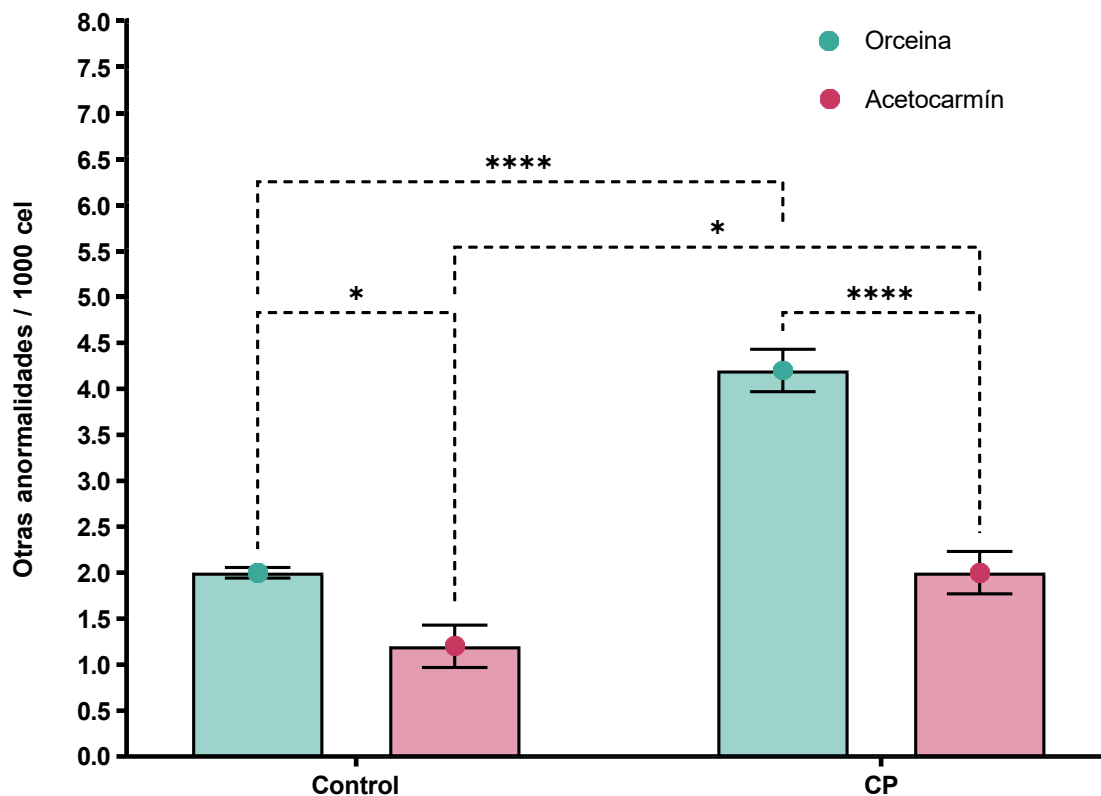


Figura 18. Comparación del número de anomalías por cada 1000 células en el control y el tratamiento con ciclofosfamida en ambas tinciones. * Indica diferencia significativa ($P < 0.05$), **** indica diferencia muy significativa (< 0.0001).

Los resultados del análisis de varianza de dos vías obtenidos a partir de las anomalías detectadas (además de los micronúcleos), muestran valores p significativos (*) y muy significativos (****) tanto para el tratamiento con ciclofosfamida, la tinción y la interacción entre ambas (tabla III). En la figura 18 se presentan las comparativas y los valores de significancia (p) de las variables: la comparación entre el control y el tratamiento utilizando orceína acética muestra una diferencia muy significativa ($p < 0.0001$), mientras la relación entre el control y el tratamiento utilizando aceto-carmín muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$). Además, se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar ambas tinciones en los controles, y una diferencia muy significativa ($p < 0.0001$) al comparar los tratamientos con CP.

Tabla V. Resumen de análisis de variancia de dos factores (ANOVA) para la variable de respuesta otras anomalías. Incluye la suma de cuadrados, grados de libertad, cuadrados medios, valor F y valor p.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor P
Interacción	1.47	1	1.47	12	0.0085
Tratamiento (Agua, CP)	6.75	1	6.75	55.1	< 0.0001
Tinción (Orceína, Aceto-carmín)	6.75	1	6.75	55.1	< 0.0001
Residual	0.98	8	0.1225		

Discusión

A lo largo de los experimentos, fue necesario adaptar algunos de los procedimientos del ensayo original (Fiskesjö, 1995, 1997), sobre todo en lo que refiere a la hidrólisis y los tiempos de tinción. Originalmente el protocolo establece que la hidrólisis debe realizarse con HCl 1N (Fiskesjo et al., 1985), mientras que otros autores sugieren utilizar la concentración de 5N (Casillas-Figueroa et al., 2020; Mohammed et al., 2015). También se utiliza una mezcla de ácido acético 45% y HCl en una proporción de 9:1, sin embargo, las pruebas realizadas bajo este modelo resultaron poco satisfactorias, ya que el tejido de la raíz no se ablandó lo suficiente para realizar el squash adecuado (Paul & Arjun, 2018). Por lo anterior, para evitar la destrucción del tejido con altas concentraciones de ácido y el poco ablandamiento en concentraciones bajas, se optó por utilizar HCl en concentración de 1N.

El tiempo de anaquel del HCl es quizá un factor sensible; es necesario considerar que la estabilidad del HCl puede cambiar con el tiempo, debido a factores como la evaporación del agua en la que se encuentra diluido el reactivo, la contaminación del mismo debido a

la continua manipulación de goteros y otros instrumentos de laboratorio, así como reacciones con el aire, lo cual puede llevar a aumentos o disminuciones en la concentración, derivados de la evaporación o la reacción con otras sustancias, por lo que se sugiere preparar el agente hidrolizante considerando una caducidad máxima de 2 semanas.

Se pudo constatar que la contra-tinción sugerida por Casillas-Figueroa (2020) con verde rápido es poco efectiva, ya que este colorante suele teñir la muestra parcialmente de forma que hay células con un buen contraste y células que no incorporan el verde rápido al citoplasma (Casillas-Figueroa et al., 2020). Otra recomendación es preparar los colorantes desde cero de ser posible, para evitar la contaminación, degradación o sedimentación de estos, así como realizar filtrados entre cada 7 a 10 días para evitar aglomeraciones.

En un estudio de Fisun y Rasgele, la tinción con orceína se utilizó con éxito para determinar la citotoxicidad de Raxil en diferentes concentraciones, que es un fungicida de uso común en el cultivo de cereales para prevenir ataques fúngicos y encontraron que esta tinción es efectiva para revelar el efecto decreciente en el índice mitótico de raíces de *Allium cepa* por efecto de este fungicida (Fisun & Rasgele, 2009); por otra parte, la tinción con aceto-carmín propuesta por Ma et al (1995), permitió detectar el efecto clastógeno de contaminantes ambientales en la prueba *Allium* (Ma et al., 1995); en este trabajo se pudo observar que aceto-carmín fue más efectivo cuando se trata de observar las células en metafase y anafase, que son los estadios del ciclo celular donde los efectos clastogénos son evidentes, aunque no dan cuenta de cómo puede ser más útil en la evaluación de la citotoxicidad entendida como índice mitótico (Ma et al., 1995). No obstante, mucho se ha discutido sobre la no especificidad de aceto-carmín para teñir el ADN, y algunos autores consideran esta tinción básica en el análisis del bandeamiento de cromosomas en células vegetales (Cremonini et al., 2003; Tonzetich, 2004).

Asimismo, Pharmawati y Wrasati (2023) utilizaron orceína acética para detectar diferencias significativas inducidas por nitrato de níquel en este modelo, y determinó que esta tinción permite detectar efectos clastogénos y citotóxicos dosis-dependiente,

comparando el índice de inhibición mitótica y el número de anormalidades nucleares (Pharmawati & Wrasati, 2023). Por otra parte, la tinción con aceto-carmín permitió detectar diferencias significativa ($p < 0.05$) en el crecimiento radicular promedio de *Allium cepa* sometido a diversas concentraciones aguas residuales de efluentes farmacéuticos; el índice de mitosis (IM) se redujo rápidamente cuando las concentraciones de efluentes aumentaron en comparación con el control, mientras que la inhibición mitótica se incrementó con el aumento de las concentraciones de efluentes en comparación con los controles (Jibril Sani Mohammed et al., 2023). Sin embargo, cuando se observan las micrografías publicadas por estos autores, la tinción resultante es un tanto difusa comparada con la tinción con orceína de otros autores (Fisun & Rasgele; Bonciu et al., 2018; Pharmawati & Wrasati, 2023); en cambio cuando Asita y Mokhobo (2013) publican sus resultados sobre el efecto de plaguicidas en el modelo *Allium cepa*, sus micrografías se observan con algo de refringencia y una aceptable nitidez, pero no tan diferenciables como las publicadas con orceína por otros autores (Asita & Mokhobo, 2013) o las publicadas en este estudio.

El trabajo de Bonciu et al. (2018), corrobora que el uso de orceína acética permite la fácil identificación de distintas aberraciones cromosómicas provocadas por distintos agentes tóxicos en las que destacan C-metafases, degradación y cromosomas pegajosos tal como se muestra en las diferencias significativas observadas entre los controles con agua y CP de este trabajo (Bonciu et al., 2018). Malakahmad et al. (2018), también utilizó la orceína acética para caracterizar los efectos genotóxicos en *Allium cepa* derivados de las aguas contaminadas del Río Perak en Malasia; las aberraciones cromosómicas más observadas en el estudio fueron C-metafases, pérdida cromosómica, puentes, rompimientos y células binucleadas (Malakahmad et al., 2018).

En este estudio se obtuvieron resultados similares a los descritos en la literatura previamente citada, sin embargo, al utilizar diferentes tiempos de hidrólisis y tinción para los experimentos, la nitidez de sus micrografías es variada, lo cual podría provocar que algunos conteos se dificulten o sean ambiguos al momento de caracterizar las posibles

aberraciones observadas. Al momento de realizar las búsquedas bibliográficas, se encontró que, en años recientes, el uso de orceína acética ha superado al uso de acetocarmín en estudios donde se utiliza *Allium cepa*, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en este estudio, donde las muestras con orceína acética se vieron más nítidas y permitieron mejores conteos.

Comparación con trabajos anteriores

Posterior a la realización de los experimentos, se compararon las micrografías obtenidas con las publicadas por otros autores que utilizaron tinciones con orceína. La nitidez de las imágenes varía de autor a autor a pesar de utilizar el mismo modelo y el mismo colorante. Una de las principales diferencias, fue que, a pesar de trabajar con la misma especie, se utilizaron variedades distintas: Pharmawati y Wrsiati trabajaron con *Allium cepa* var. *aggregatum* (Pharmawati & Wrsiati, 2023);; Jibril no especifica cuál fue la variedad que utilizó, pero una de sus fotografías muestra que utilizó una variedad morada distinta a la utilizada en este estudio (Jibril et al., 2023); el estudio de Nwakanma et al. no especifica la variedad utilizada ni muestra fotografías pero menciona que los bulbos eran pequeños (Nwakanma et al., 2021); en el estudio de Malakahmad et al. se menciona que utilizaron bulbos de “cebolla dulce” (Malakahmad et al., 2018). Una comparación de las micrografías obtenidas se puede observar en la figura 19. Estos datos pueden sugerir que la variedad de la cebolla puede ser un factor determinante para el crecimiento, desarrollo, montaje y observación de las raíces que no se consideró dentro de este estudio pero que puede ser tomado en cuenta para trabajos posteriores. La elección de la variedad tipo cebollín fue tomada meramente por practicidad y reducción de espacio.

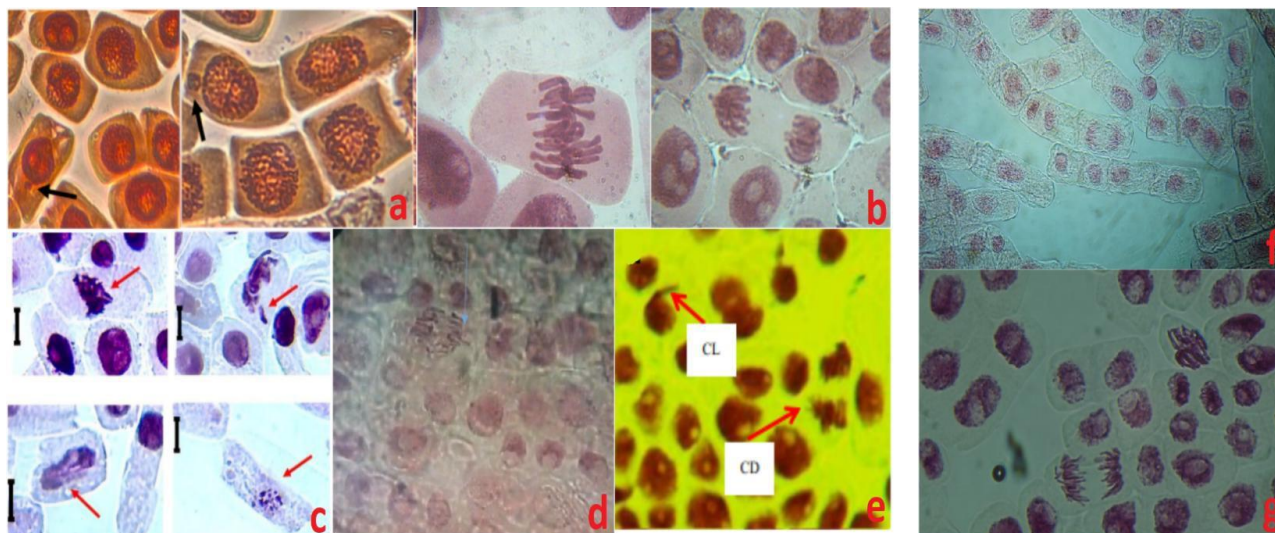


Figura 19. Comparación de micrografías celulares de *Allium cepa* teñidas con orceína acética. Imágenes obtenidas en trabajos anteriores comparadas con las presentadas en este trabajo: a) Barco et al., 2024, b) Nwakanma et al., 2021, c) Pharmawati & Wrasati, 2023, d) Jibril et al., 2023, e) Malakahmad et al., 2018, f) micrografía propia (tinción con aceto-carmin), g) micrografía propia (tinción con orceína acética).

Variación de los resultados

Durante el proceso de experimentación se obtuvieron algunos resultados poco consistentes. Aunque se siguieron todos los pasos estipulados en la metodología, las primeras veces se lograron resultados excelentes, mientras que en experimentos posteriores los resultados fueron variados y poco concluyentes. Esto puede deberse al organismo utilizado (*Allium cepa*) que, al ser comprado en el mercado local, sus orígenes son desconocidos y bien podrían provenir de diferentes cosechas, ser cultivadas bajo distintos modelos agrícolas o podrían haber pasado mucho tiempo en anaquel o en congelación. Estos factores podrían haber afectado el desarrollo de las raíces nuevas. Algunos de los trabajos que utilizan el modelo *Allium cepa* mencionan que las cebollas fueron compradas en mercados locales (Arya & Mukherjee, 2014; Mohammed et al., 2015b; Radić et al., 2010), mientras que algunos otros mencionaron que las cebollas fueron compradas directamente de los granjeros (Bonciu, 2018; Paul & Arjun, 2018). En relación con lo anterior, la estación del año puede tener un impacto experimental en el modelo de micronúcleos de *Allium cepa* (cebolla).

Las plantas de cebolla compradas en el supermercado o mercado local son diversas dependiendo la temporada y se desconoce qué tipo de proceso llevan desde el sembrado hasta la cosecha y qué clase de fertilizantes, plaguicidas o procesos de refrigerado llevan. Para evitar inconvenientes al momento de elegir los individuos de cebolla para los experimentos, es recomendable sembrar y crecer las plantas desde semilla en un invernadero, esto con el fin de obtener plantas sanas en un ambiente controlado y que cada una de ellas haya pasado por el mismo proceso de crecimiento.

Por otra parte, cuando los ejemplares provienen del mercado local, los factores abióticos como la exposición a diferentes niveles de radiación ultravioleta, cambios en la humedad y otras condiciones climáticas también pueden influir en la estabilidad del ADN y la eficiencia de los mecanismos de reparación del ADN en las plantas en la fase experimental. La disponibilidad de recursos, durante ciertas estaciones, puede aumentar la disponibilidad de cebollas frescas y sanas, lo que podría mejorar la consistencia de los resultados experimentales (Silveira et al., 2017; Silveira et al., 2019). En otras estaciones, la calidad y la disponibilidad pueden disminuir, introduciendo variabilidad en los experimentos. En quinto y último lugar, el estrés biótico puede tener también una importante influencia estacional, ya que las plantas de cebolla están expuestas a diferentes tipos de patógenos y plagas en diferentes estaciones, lo que puede inducir estrés y potencialmente influir en la formación de micronúcleos (Miller et al., 2006; D. I. Olorunfemi et al., 2015).

Conclusiones

Los ensayos de tinción con orceína acética y aceto-carmín en diferentes tiempos de exposición permitieron identificar que el tiempo óptimo de tinción para lograr una visualización clara y diferenciada de las estructuras celulares es de 25 a 30 minutos para orceína acética y 40 a 45 minutos para aceto-carmín.

La tinción con orceína acética resultó en una mejor diferenciación de las diferentes fases del ciclo celular, facilitando la identificación de anomalías estructurales inducidas por la ciclofosfamida. La tinción con aceto-carmín mostró ser más eficaz para detectar anomalías en los cromosomas en las células meristemales de *Allium cepa*.

El índice mitótico fue significativamente menor en las células tratadas con ciclofosfamida en comparación con las células del control negativo, indicando un efecto inhibitorio de la división celular por la ciclofosfamida.

La frecuencia de micronúcleos y otras anomalías celulares fue significativamente mayor en las células tratadas con ciclofosfamida en comparación con el control negativo, confirmando la inducción de daño genotóxico por la ciclofosfamida.

La tinción con orceína acética y aceto-carmín permitió la identificación clara de los micronúcleos y otras anomalías, con una mayor sensibilidad observada en la tinción con orceína. Las diferencias observadas en los biomarcadores (micronúcleos y aberraciones cromosómicas) entre las células tratadas con ciclofosfamida y el control negativo validan la eficacia del modelo *Allium cepa* como un sistema de bioensayo para la detección de efectos cito/genotóxicos.

Es necesario tomar en cuenta criterios claros para el conteo de micronúcleos, tales como la definición de tamaño, forma y ubicación dentro de la célula, para asegurar la consistencia y precisión en los resultados. Los criterios propuestos para la identificación de otras anomalías celulares incluyen la presencia de puentes anafásicos, fragmentos cromosómicos y células con irregularidades nucleares, proporcionando una guía detallada para el análisis. La adopción de estos criterios permitirá la estandarización del proceso de conteo de micronúcleos y anomalías celulares, mejorando la reproducibilidad y comparabilidad de los resultados entre diferentes estudios. La implementación de estos

criterios en futuros estudios contribuirá a la validación del modelo *Allium cepa* como una herramienta robusta y confiable para la evaluación de efectos cito/genotóxicos en investigaciones toxicológicas y ambientales.

Ambos colorantes demostraron ser efectivos para teñir células con inducción cito/genotóxica, pero la elección del tiempo de tinción y el tipo de colorante puede depender del tipo de análisis específico que se desee realizar. La hidrólisis más segura se define con HCl en concentración 1N recién preparado y con un máximo de tiempo de anaquel de 15 días. La forma más efectiva de realizar la hidrólisis es sobre un vidrio de reloj por tiempo de 12 a 15 minutos a temperatura ambiente; se sugiere cubrir con otro vidrio de reloj la muestra para evitar evaporación.

Aunque la metodología sugerida en este trabajo es relativamente consistente, se sugiere que previo a la experimentación a realizar con el modelo *Allium cepa*, se realicen pruebas particularmente con los tiempos de hidrólisis, pues parecen tener resultados variados dependiendo del organismo utilizado. Aunado a eso, es recomendable utilizar cebollas que provengan de una misma fuente y, de ser posible, cultivar las plantas desde semilla, ya que esto podría reducir el sesgo de los posibles factores ajenos a la experimentación que podrían tener un efecto en las células de la planta.

Literatura citada

- Afify, R. R. M., & El-Nwehy, S. S. (2023). Nano fertilizers with algae extract as biostimulant affecting growth, bulb yield, and quality of onion (*Allium cepa* L.). *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 55(6). <https://doi.org/10.54910/sabrao2023.55.6.24>
- Afshari, A. J., McGregor, P. W., Allen, J. W., & Fuscoe, J. C. (1994). Centromere analysis of micronuclei induced by 2-aminoanthraquinone in cultured mouse splenocytes using both a gamma-satellite DNA probe and anti-kinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1002/em.2850240204>
- Al-Sabti, K., & Metcalfe, C. D. (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 343(2), 121-135. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0)
- Alavi, E., Tajadod, G., Jafari Marandi, S., & Arbabian, S. (2023). *Vicia faba* seed: A bioindicator of phytotoxicity, genotoxicity, and cytotoxicity of light crude oil. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(8), 21043-21051. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-23244-w>
- Arellano-García, M. E., Izaguirre-Pérez, M. E., Molina-Noyola, L. D., Castañeda-Yslas, I. Y., Luna-Vázquez-Gómez, R., & Torres-Bugarín, O. (2020). Genetic Instability of a Polydactyl Hypopigmented Cat With Squamous Cell Carcinoma—A Case Report. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00258>
- Arya, S. K., & Mukherjee, A. (2014). Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(2). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000035>
- Asita, A. O., & Mokhobo, M. M. (2013). Clastogenic and Cytotoxic Effects of Four Pesticides Used to Control Insect Pests of Stored Products on Root Meristems of *Allium cepa*. *Environment and Natural Resources Research*, 3(2). <https://doi.org/10.5539/enrr.v3n2p133>
- Baesse, C. Q., Tolentino, V. C. de M., Morelli, S., & Melo, C. (2019). Effect of urbanization on the micronucleus frequency in birds from forest fragments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 631-637. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.026>

Basu, S., & Tripura, K. (2021). Differential sensitivity of *Allium cepa* L. and *Vicia faba* L. to aqueous extracts of *Cascabela thevetia* (L.) Lippold. *South African Journal of Botany*, 139, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.033>

Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251-272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)

Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyanyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photogallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(2), 100-113. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>

Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V. M., Demircigil, G. C., Odio, A. D., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., ... Fenech, M. (2011). The HUMan MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>

Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C. S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M. C., Liu, D., Menicucci, F., Pesnya, D. S., Popescu, A., Romanovsky, A. V., Schiff, S., Ślusarczyk, J., de Souza, C. P., Srivastava, A., Sutan, A., & Papini, A. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, 71(3). <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1503496>

Brewster, J. L. (2008). Onions and Other Vegetable Alliums. CABI.

Brinch, A., Hansen, S. F., Hartmann, N. B., & Baun, A. (2016). EU Regulation of Nanobiocides: Challenges in Implementing the Biocidal Product Regulation (BPR). *Nanomaterials*, 6(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/nano6020033>

Budantsev, A. Y., Uversky, V. N., & Kutysenko, V. P. (2020). *Allium*-test - apical root meristem of *Allium cepa*. In *Allium: Ecology, Distribution and Cultivation*.

Camilo-Cotrim, C. F., Bailão, E. F. L. C., Ondei, L. S., Carneiro, F. M., & Almeida, L. M. (2022). What can the *Allium cepa* test say about pesticide safety? A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(32), 48088-48104. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20695-z>

Casillas-Figueroa, F., Arellano-García, M. E., Leyva-Aguilera, C., Ruíz-Ruiz, B., Vázquez-Gómez, R. L., Radilla-Chávez, P., Chávez-Santoscoy, R. A., Pestryakov, A., Toledano-Magaña, Y., García-Ramos, J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Argovit™ silver nanoparticles effects on *Allium cepa*: Plant growth promotion without cyto genotoxic damage. *Nanomaterials*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/nano10071386>

Castañeda-Yslas, I. Y., Torres-Bugarín, O., García-Ramos, J. C., Toledano-Magaña, Y., Radilla-Chávez, P., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Ruiz-Ruiz, B., & Arellano-García, M. E. (2021). AgNPs Argovit™ Modulates Cyclophosphamide-Induced Genotoxicity on Peripheral Blood Erythrocytes *In Vivo*. | *EBSCOhost*. <https://doi.org/10.3390/nano11082096>

Cremonini, R., Ruffini Castiglione, M., Grif, V. G., Kotseruba, V. V., Punina, E. O., Rodionov, A. V., Muravenko, O. V., Popov, K. V., Samatadze, T. E., & Zelenin, A. V. (2003). Chromosome banding and DNA methylation patterns, chromatin organisation and nuclear DNA content in *Zingeria biebersteiniana*. *Biologia Plantarum*, 46(4). <https://doi.org/10.1023/A:1024863511570>

Das, D., Mitra, P. K., & Gupta, S. (2021). Evaluation of Cytotoxicity Induced by the Anti-Cancerous Drugs Doxorubicin and Erlotinib in *Allium cepa* Assay for Eco-Safety Monitoring. *Cytologia*, 86(3), 195-199. <https://doi.org/10.1508/cytologia.86.195>

El-Kholy, A. S., Haroun, S. A., & Labeeb, M. (2023). Assessment of genotoxic effects of wastewater of Kitchener pool, Nile Delta Region, North Egypt, using *Allium test*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 12(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s43088-023-00364-x>

Fiskesjö, G. (1995). *Allium* Test. In S. O'Hare & C. Atterwill (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing Protocols* (Vol. 43, pp. 119–127). *Humana Press*. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:119>

Fiskesjö, G. (1997). *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In *Plants for Environmental Studies* (pp. 307–333). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420048711.ch11>

Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* Test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 12(1), P. 99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

Fiskesjö, G. (1980). Toxic effects of copper in drinking water tested on *Allium* root tips. *Mutation Research. Section on Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 74(3), Article 3. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(80\)90149-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(80)90149-1)

Fisun, K., & Rasgele, P. G. (2009). Onion (*Allium cepa*) genotoxicity test. *Technology*, 62(10), 1–5. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589659>

Flores-Galván, M., Arellano-García, E., Ruiz-Campos, G., & Daesslé, L. W. (2017). Genotoxic Assessment of Some Inorganic Compounds in Desert Pupfish (*Cyprinodon macularius*) in the Evaporation Pond from a Geothermal Plant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 99(2), 218-223. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2114-6>

Flores-Galván, M. A., Daesslé, L. W., Arellano-García, E., Torres-Bugarín, O., Macías-Zamora, J. V., & Ruiz-Campos, G. (2020). Genotoxicity in fishes environmentally exposed to As, Se, Hg, Pb, Cr and toxaphene in the lower Colorado River basin, at Mexicali valley, Baja California, México. *Ecotoxicology*, 29(4), 493-502. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02200-9>

Gana, L. P., Etsassala, N. G. E. R., & Nchu, F. (2022). Interactive Effects of Water Deficiency and Endophytic *Beauveria bassiana* on Plant Growth, Nutrient Uptake, Secondary Metabolite Contents, and Antioxidant Activity of *Allium cepa* L. *Journal of Fungi*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/jof8080874>

Grandjean, P. (1995). Biomarkers in epidemiology. *Clinical Chemistry*, 41(12 Pt 2), 1800-1803.

Haque, S. M., & Ghosh, B. (2017). Cell division study in 'pollen mother cells' and 'pollen grains' of *in vivo* and *ex vitro* plants in *Drimiopsis botryoides*. *Grana*, 56(2). <https://doi.org/10.1080/00173134.2016.1144785>

Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Asano, N., Suzuki, H., Ohyama, W., & Gibson, D. (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), 10-30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.010>

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., Oleson, F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., & Vannier, B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(3), 293-304. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0165-1161(94)90039-6)

Howell, W. H. (1890). The life-history of the formed elements of the blood, especially the red blood corpuscles. *Journal of Morphology* 4(1), 57-116. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050040105>

Jaiswal, S., Dey, R., & Bag, A. (2022). Effect of Heavy Metal Cadmium on Cell Proliferation and Chromosomal Integrity in *Allium cepa*. *National Academy Science Letters*, 45(1), 35-37. <https://doi.org/10.1007/s40009-021-01072-9>

Jibril S. M., Yahaya M., Usman A., Eghobor S., Bashir M. M., Yahya S. A., Mohammed I. A. & Aisha W. A. (2023). Evaluation of Cyto-Genotoxicity of Pharmaceutical Industrial Effluent in Kano Metropolis, Kano State, Nigeria, Using *Allium Cepa* L. Assay. *UMYU Scientifica*, 2(1). <https://doi.org/10.56919/usci.2123.013>

Kihlman, B. A. (1963). Deoxyadenosine as an inducer of chromosomal aberrations in *Vicia faba*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 62(3), 267-272. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030620306>

Kihlman, B. A. (1958). Respiration and Radiosensitivity of Broad Bean Roots. *Nature*, 182(4637), 730-731. <https://doi.org/10.1038/182730b0>

Kihlman, B. A. (1975). Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6), 401-412. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90050-3)

Kohlmünzer, S., Grzybek, J., & Kisiel, W. (1976). Biological activity of vernoflexuoside on the basis of *Allium* test. *Experientia*, 32(2), 172-174. <https://doi.org/10.1007/BF01937748>

Krenning, L., van den Berg, J., & Medema, R. H. (2019). Life or Death after a Break: What Determines the Choice? *Molecular Cell*, 76(2), 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.023>

Krupina, K., Goginashvili, A., & Cleveland, D. W. (2021). Causes and consequences of micronuclei. *Current Opinion in Cell Biology*, 70, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.004>

Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, 407(19), Article 19. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>

Larsson, B., & Kihlman, B. A. (1960). Chromosome aberrations following irradiation with high-energy protons and their secondary radiation: A study of dose distribution and biological efficiency using root-tips of *Vicia faba* and *Allium cepa*. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, 2, 8-19. <https://doi.org/10.1080/09553006014550021>

Levan, A. (1938). The Effect of Colchicine on Root Mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24(4), 471-486. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>

Llanos, J., Capasso, C., Parisi, E., Prieur, D., & Jeanthon, C. (2000). Susceptibility to Heavy Metals and Cadmium Accumulation in Aerobic and Anaerobic Thermophilic

Microorganisms Isolated from Deep-Sea Hydrothermal Vents. *Current Microbiology*, 41(3), 201-205. <https://doi.org/10.1007/s00284431056>

Ma, T.-H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Valtierra Rabago, E., Adriana Arreola, G., & Zhang, H. (1995). The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 334(2), 185–195. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1)

Malakahmad, A., Manan, T. S. B. A., Sivapalan, S., & Khan, T. (2018). Genotoxicity assessment of raw and treated water samples using *Allium cepa* assay: evidence from Perak River, Malaysia. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6). <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0721-8>

Meneguetti, D. (2012). Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 02. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000127>

Miller, M. E., Saldana, R. R., Black, M. C., & Pappu, H. R. (2006). First Report of Iris yellow spot virus on Onion (*Allium cepa*) in Texas . *Plant Disease*, 90(10). <https://doi.org/10.1094/pd-90-1359b>

Mohammed, K. P., Aarey, A., Tamkeen, S., & Jahan, P. (2015). Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777(1), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.11.005>

Müller, W.-U., & Streffer, C. (1994). Micronucleus Assays. En G. Obe (Ed.), *Advances in Mutagenesis Research* (pp. 1-134). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78193-3_1

Mushtaq, W., Ain, Q., Siddiqui, M. B., & Hakeem, K. R. (2019). Cytotoxic allelochemicals induce ultrastructural modifications in *Cassia tora* L. and mitotic changes

in *Allium cepa* L.: A weed versus weed allelopathy approach. *Protoplasma*, 256(3), 857-871. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01343-1>

Nwakanma, N. C., Ikegwu, E., & Bolarinwa, I. S. (2021). Genotoxic Effects of *Ganoderma lucidum* (Curtis) Karst and *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer using the *Allium* Test. *RENEWABLE*, 1(1), 53-63.

Oftana, I., Ancheta, S. G., & Lumogdang, L. (2024). Cytogenotoxicity Evaluation of Flucloxacillin Using the *Allium cepa* Assay (SSRN Scholarly Paper 4921268). *Social Science Research Network*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4921268>

Olorunfemi, D. I., Taiwo, M. O., & Olorunfemi, O. P. (2015). Assessment of DNA damage in onion root cells exposed to contaminated rural water sources using RAPD markers. *Studia Universitatis Vasile Goldis Arad, Seria Stiintele Vietii*, 25(1).

Onwuamah, C. K., Ekama, S. O., Audu, R. A., Ezechi, O. C., Poirier, M. C., & Odeigah, P. G. C. (2014). Exposure of *Allium cepa* Root Cells to Zidovudine or Nevirapine Induces Cytogenotoxic Changes. *PLOS ONE*, 9(3), e90296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090296>

Paul, R., & Arjun, J. (2018). Evaluation of industrial effluent and domestic sewage genotoxicity using *Allium cepa* bioassay. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11(3). <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.3/19>

Pharmawati, M., & Wrasati, L. P. (2023). Chromosomal and Nuclear Alteration Induced by Nickel Nitrate in the Root Tips of *Allium cepa* var. *aggregatum*. *Pollution*, 9(2). <https://doi.org/10.22059/POLL.2022.349167.1634>

Ping, K., Darah, I., Yusuf, U., Yeng, C., & Sasidharan, S. (2012). Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *MOLECULES*, 17(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules17077782>

- Prajitha, V., & Thoppil, J. E. (2017). Cytotoxic and apoptotic activities of extract of *Amaranthus spinosus* L. in *Allium cepa* and human erythrocytes. *Cytotechnology*, 69(1), 123-133. <https://doi.org/10.1007/s10616-016-0044-5>
- Radić, S., Stipaničev, D., Vujčić, V., Rajčić, M. M., Širac, S., & Pevalek-Kozlina, B. (2010). The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of The Total Environment*, 408(5), 1228–1233. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2009.11.055>
- Ramírez-Muñoz, M. P., Zúñiga, G., Torres-Bugarín, O., Portilla, E., García-Martínez, D., Ramos, A., Cantú, J. M., & Sánchez-Corona, J. (1999). Evaluation of the micronucleus test in peripheral blood erythrocytes by use of the splenectomized model. *Laboratory Animal Science*, 49(4), 418–420.
- Ruiz de Arcaute, C., Laborde, M. R. R., Soloneski, S. M. E., & Larramendy, M. L. (2021). Genotoxicidad y carcinogénesis. *En Principios de ecotoxicología*. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/159398>
- Sarac, I., Bonciu, E., Butnariu, M., Petrescu, I., & Madosa, E. (2019). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of some heavy metals by use of *Allium* test. *Caryologia*, 72(2), Article 2. <https://doi.org/10.13128/cayologia-256>
- Schlegel, R., & MacGregor, J. T. (1984). The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: Implications for cytogenetic screening. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 127(2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(84\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(84)90018-6)
- Silveira, G. L., Lima, M. G. F., Reis, G. B. dos, Palmieri, M. J., & Andrade-Vieria, L. F. (2017). Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere*, 178, 359–367. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.03.048>

Silveira, M. A. D., Ribeiro, D. L., dos Santos, T. A., Demarco, N. R., & d'Arce, L. P. G. (2019). DNA Damage and Apoptotic Effects in Water Samples of a Brazilian River Protected by the HELP Program of UNESCO. *Exposure and Health*, 11(4). <https://doi.org/10.1007/s12403-018-0271-4>

Sivaram, A., Logeshwaran, P., Surapaneni, A., Shah, K., Crosbie, N., Rogers, Z., Lee, E., Venkatraman, K., Kannan, K., Naidu, R., & Megharaj, M. (2021). Evaluation of Cyto-genotoxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) to *Allium cepa*. *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*, 40(3), Article 3. <https://doi.org/10.1002/etc.4905>

Sivaram, A., Logeshwaran, P., Abinandan, S., Mukunthan, K., & Megharaj, M. (2022). Cyto-genotoxicity evaluation of pyroligneous acid using *Allium cepa* assay. *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH PART A-TOXIC/HAZARDOUS SUBSTANCES & ENVIRONMENTAL ENGINEERING*, 57(10), Article 10. <https://doi.org/10.1080/10934529.2022.2119741>

Subramanyam, S., & Subramaniam, M. K. (1962). Studies on the structure of the chromosomes: I. *Allium cepa*—Stain fixatives and their utility. In *Proceedings/Indian Academy of Sciences* (Vol. 55, No. 5, pp. 276-284).

Sultan, A. Ö., & Çelik, T. A. (2009). Genotoxic and antimutagenic effects of *Capparis spinosa* L. on the *Allium cepa* L. Root tip meristem cells. *Caryologia*, 62(2). <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589676>

Tonzetich, J. (2004). Orcein staining and the identification of polytene chromosomes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 247. <https://doi.org/10.1385/1-59259-665-7:249>

Torres-Bugarín, O., & Ramos-Ibarra, M. L. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *International Journal of Morphology*, 31(2), 650-657. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022013000200050>

Wu, L., Yi, H., & Yi, M. (2010). Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 952–956. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.132>

Yi, H., Wu, L., & Jiang, L. (2007). Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. *Science of the Total Environment*, 383(1–3), 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.05.015>

Zar, H. J. (1984). *Biostatistical Analysis* (B. Kurtz, Ed.; 2 nd). Prentice-Hall.

Zoukova, R., Kovalova, L., Blaha, L., & Dott, W. (2010). Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. *Chemosphere*, 81(2), 253-260. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.029>

Zúñiga-González, G., Torres-Bugarín, O., Luna-Aguirre, J., González-Rodríguez, A., Zamora-Perez, A., Gómez-Meda, B. C., Ventura-Aguilar, A. J., Ramos-Ibarra, M. L., Ramos-Mora, A., Ortiz, G. G., & Gallegos-Arreola, M. P. (2000). Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): Part two. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(1), 99-103. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00021-8)

Zúñiga-González, G. M., Torres-Bugarín, O., Zamora-Perez, A. L., Gómez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, Ma. L., Gallegos-Arreola, P., Flores-García, A., & López-Urbe, A. (2003). Induction of Micronucleated Erythrocytes in Mouse Peripheral Blood After Cutaneous Application of 5-Fluorouracil. *Archives of Medical Research*, 34(2), 141-144. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00470-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00470-8)