



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

ESTANDARIZACIÓN DE ALLIUM TEST PARA LA
EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD DE
NANOMATERIALES: AGNPS COMO CASO DE ESTUDIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A N:

SANDRA GUADALUPE MENDEZ LÓPEZ

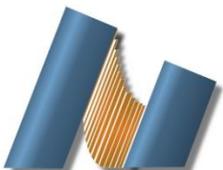
JUAN CARLOS MUNGUÍA LUNA

TUTOR DE TESIS

DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA

DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS

Ensenada Baja California a junio de 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

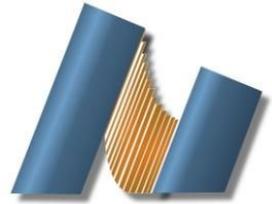
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
Bionanotecnología



ESTANDARIZACIÓN DE ALLIUM TEST PARA LA EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD DE
NANOMATERIALES: AGNPS COMO CASO DE ESTUDIO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTAN:
SANDRA GUADALUPE MENDEZ LÓPEZ
JUAN CARLOS MUNGUIA LUNA

DIRECTORES DE TESIS
DRA. YANIS TOLEDANO MAGAÑA
DR. JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, JUNIO 2022

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias. Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.



Sandra Guadalupe Mendez López



Juan Carlos Munguia Luna

Agradecimientos

A la Dra. Yanis Toledano Magaña y al Dr. Juan Carlos García Ramos por ser nuestros directores de tesis y ser los primeros en abrirnos las puertas a su laboratorio y conocimientos.

Al Dr. Francisco Casillas Figueroa por introducirnos al uso del Allium test para la evaluación de nanomateriales.

Al laboratorio de Nanomedicina y Nanotoxicología de la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) por prestarnos sus instalaciones y brindarnos la orientación para la realización de la tesis.

A la Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad perteneciente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Al Centro de Diagnóstico Radiológico de Ensenada y a Gerardo Cerda González por su ayuda con la toma de rayos X de nuestras muestras.

A nuestros sinodales:

Dra. Nina Bogdanchikova

Dra. María Evarista Arellano García

Dr. Hugo Alejandro Borbón Nuñez

por su apoyo en la revisión de este trabajo, retroalimentación y orientación.

Dedicatorias

Sandra Guadalupe Mendez López

A mis padres, Diana Alicia y Víctor Manuel, no hay palabras para describir todo lo que les agradezco, me han dado las herramientas y el amor para lograr todo lo que me proponga, y sobre todo me han guiado por la vida para hallar mi pasión y aquello que me llena de felicidad, que gran regalo me han otorgado.

A mi hermanito Juan Pablo, la persona en la que más confío y a quien más admiro, has sido mi motivo para seguir adelante en los momentos más difíciles, y te dedico este logro pues en cada paso tú me has acompañado.

A mis abuelos Octaviano, Andrea, Octavio y Alicia, quienes han sido pilares para mi formación, cuyo amor incondicional, experiencias y valiosos consejos han sido mi guía durante estos años.

A mis padrinos/tíos Jorge y Lupita, gracias por encaminarme hacia esta meta, su apoyo incondicional e incluso a la distancia cuando me fui a Ensenada ha sido fundamental para mí, han sido parte importante durante mi vida.

A mis tíos, en especial a Elisa, quien me ha apoyado con materias complicadas, y a Carolina, me has acompañado durante toda mi vida, apoyado cuando lo necesitaba, y sé que siempre puedo llamarte y estarás para escucharme.

A mis amigos Juan Carlos, Diego, Tonalmi y Perla; mi familia en Ensenada, personas muy especiales cuyo apoyo fue indispensable para salir victoriosa de la carrera, atesorar tanto su amistad.

A mi amiga y compañera de departamento, Abril, cuyo amistad y apoyo valoro mucho, juntas aprendimos a ser independientes y nos apoyamos en los momentos complicados.

A mis compañeros de generación, por ser un grupo unido y apoyarnos entre todos.

A todos mis profesores que han influido en que haya llegado hasta esta meta.

Al todos los miembros del laboratorio de Nanomedicina, un grupo que me acogió y me demostró lo bonito del trabajo en equipo en la investigación.

A la Dra. Yanis Toledano y al Dr. Juan Carlos García, quienes fueron mis profesores desde el primer semestre de la carrera, y luego me abrieron las puertas del laboratorio, quienes me enseñaron la pasión por la investigación, me orientaron y tuvieron paciencia para todo lo que aprendí con ellos.

A la UNAM que desde hace varios años me ha formado y brindado tantos conocimientos y experiencias, por ser la herramienta que me permitió lograr este objetivo, es un orgullo ser parte de ella y la llevaré en el corazón a donde quiera que vaya.

A Dios.

Juan Carlos Munguia Luna

Le dedico este trabajo a:

Mi familia, por siempre apoyarme en cualquier situación.

A mis amigos, por siempre estar ahí y sacarme una sonrisa.

Y a mis maestros, por ayudarme a llegar a este punto.

Resumen

En los últimos años la investigación de nanomateriales ha ido creciendo debido a sus aplicaciones en ingeniería, tecnología y medicina. Las nanopartículas de plata (AgNPs), con longitudes inferiores a 100 nm tienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales y son eficaces contra bacterias Gramnegativas y Grampositivas. Por lo tanto, las AgNPs se utilizan para dispositivos médicos y gran potencial para diversas aplicaciones médicas (Cameron, 2018).

Es importante estudiar el potencial daño genotóxico de las AgNPs (Wang et al., 2013), porque a pesar de que las células tienen una membrana selectiva, las AgNPs pueden liberar iones Ag^+ dentro de la célula, al atravesar los receptores de membrana y causar daño en diversos sistemas celulares, entre ellos el material genético.

Allium test es un ensayo muy efectivo para el análisis de daños en el ADN, cuando se estudian aberraciones cromosómicas y micronúcleos en las células meristemáticas apicales. Se eligió Allium test por su facilidad, practicidad, bajo costo y a la alta disponibilidad de la especie *Allium cepa*, (Leme & Marin-Morales, 2009).

El objetivo del presente estudio fue evaluar mediante el uso del modelo de Allium test, el efecto genotóxico de dos formulaciones de AgNPs con recubrimiento de polivinilpirrolidona (PVP) con distintos grados de polimerización, en concentraciones de 100, 75, 50, 25, 15, 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con 72 horas continuas de exposición y establecer las condiciones de concentración y tiempo de exposición de *Allium cepa* a la colchicina como control positivo de daño genotóxico, en concentraciones de 1.25, 0.125, 0.0125 y 0.00125 mM con 4+20, 24, 4+68 y 72 horas de exposición. El propósito fue determinar si el grado de PVP usado como recubrimiento de las AgNPs influye en el índice mitótico y daño genotóxico ocasionado a las células de raíces de *Allium cepa*.

Se utilizó agua destilada como control negativo, la colchicina como control positivo, AgNO_3 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y PVP K-15 (1.721 mg/mL) o PVP K-30 (1758 mg/mL) respectivamente para las dos AgNPs (AgNP1 y la AgNP4). También se usó AgNO_3 para comparar el efecto por la posible liberación de iones Ag^+ , y PVP para comparar el efecto del recubrimiento de las formulaciones de AgNPs utilizadas. Cada tratamiento se realizó

por quintuplicados. Se creó una base de datos utilizando SPSS con todos los resultados, se realizaron análisis estadísticos como ANOVA de dos vías y la prueba de Tukey.

La (EC_{50}) de colchicina encontrada fue de 0.125 mM a 72 h continuas de exposición. Para el caso de las nanopartículas, el valor EC_{50} se encontró en el intervalo de 15 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para AgNP1, mientras que AgNP4 presentó el intervalo de 25 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de AgNP1, se encontró que el recubrimiento de PVP influye en su actividad genotóxica. Por otro lado, AgNP4 presentó un comportamiento estadísticamente similar al C++ (colchicina [0.125 mM] con recuperación). Por esta razón, se considera que éstas dos formulaciones no presentan el mismo mecanismo de daño genotóxico.

Debido a que ambas formulaciones presentan un porcentaje de daño menor al encontrado para ambos controles (0.00125mM 72 h y 0.125mM a 4+68 h), se podría considerar que concentraciones menores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pueden ser seguras para su uso. Por otro lado, se considera que las nanopartículas estudiadas son agentes clastogénicos (que rompen el cromosoma) debido a su mayor frecuencia de puentes y menor tamaño de micronúcleos. Estadísticamente hablando, ambas nanopartículas no presentan diferencias significativas en el porcentaje de daño genotóxico, pero si en el índice mitótico. Los resultados permiten concluir que la formulación 1 promueve la proliferación celular.

Finalmente, se determinó la presencia de aglomerados de plata en las concentraciones más altas de ambas formulaciones mediante una placa de rayos X.

Palabras clave: Nanopartículas de plata, Genotoxicidad, Allium test, Colchicina, PVP

Índice

Agradecimientos	4
Dedicatorias	5
Resumen	7
Introducción	17
Antecedentes	20
Justificación	28
Marco Teórico	30
Ensayos de genotoxicidad	30
Ensayos con plantas	31
<i>Allium test</i>	31
Aberraciones cromosómicas	34
Micronúcleos	34
<i>Yemas</i>	35
Puentes	35
Defectos cromosómicos	37
Lesión nuclear	37
Materiales genotóxicos	37
Colchicina.....	37
Nanopartículas de plata	39
Polivinilpirrolidona (PVP)	40
Objetivos	42
Generales	42
Específicos	42
Hipótesis	43
Metodología	44
Determinación de control positivo.	44
Crecimiento y cultivo de las cebollas.....	44
Montaje del ensayo.....	44
Medición de cantidad y longitud de raíces.....	46
Ensayo de inhibición de crecimiento de raíces.....	46
Fijación y congelamiento.....	46

Tinción	47
Conteo	47
Análisis estadístico	47
Microscopía de fluorescencia	48
Rayos X	48
Resultados	49
Ensayos con colchicina	49
Parámetros macroscópicos	49
Parámetros microscópicos	54
Ensayos con AgNPs	62
Parámetros macroscópicos	62
Polivinilpirrolidona (PVP).....	62
Nitrato de plata (AgNO ₃)	63
AgNP1	63
AgNP4	67
Parámetros microscópicos	72
Análisis de resultados	85
Conclusiones	96
Trabajo actual	96
Trabajo futuro	98
Anexos	100
Referencias	106

Índice de figuras

Figura 1.	Raíces expuestas con colchicina. Izquierda, protuberancias macroscópicas en las raíces. Derecha corte transversal de la raíz donde se observa incremento del volumen celular. (Shimamura, 1939).	24
Figura 2.	Microfotografía de la sección longitudinal de la raíz de <i>Allium cepa</i> mostrando las regiones de la punta de la raíz (CAP), meristemo (M) y de las células hijas (F1) (Ma et al., 1995).	32
Figura 3.	Clasificaciones de las raíces de <i>Allium cepa</i> A) raíz normal, B) raíz con forma de “agujas de croché”, C) “formación de tumor C”, D) ruptura de puntas (European Commission, Joint Research Centre (JRC), 2019).	33
Figura 4.	Puentes creados por A) la unión de dos cromosomas por falta de telosoma; B) la unión de cromosomas por falla en ruptura de ADN; C) Citocinesis de una célula con un puente cromosómico causando la formación de micronúcleos y/o yemas. Creación de micronúcleo o yema por D) Cromosoma vagabundo y E) Cromosomas pequeños diminutos. F) Creación de micronúcleo por cromosoma con daño en el cinetocoro o una poca metilación de ADN del centrómero.	36
Figura 5.	La colchicina forma un complejo con la tubulina y se copolimeriza en la red del microtúbulo, suprimiendo la dinámica del microtúbulo (Jordan & Wilson, 2004).	38
Figura 6.	Vías de internalización de nanopartículas de plata y efectos en las células (McShan et al., 2014).	39
Figura 7.	Cebollas expuestas por 24 h a una concentración de colchicina 0.0125 mM. A) Cebollas en los tubos de ensayo y B) acercamiento para identificar las condiciones de las raíces.	49
Figura 8.	Cebollas expuestas por 48 h a una concentración de colchicina 0.125 mM. A) Cebollas en los tubos de ensayo y B) acercamiento para identificar los defectos de las raíces.	50
Figura 9.	Cebollas expuestas por 4 h con 68 h de recuperación a una concentración de colchicina 0.00125 mM. Las flechas señalan los desprendimientos de capa en las A) cebollas en los tubos de ensayo y B) acercamiento para identificar el desprendimiento de las capas.	51
Figura 10.	Gráficas que expresan la A) longitud y B) número de raíces 24 h de exposición.	51

Figura 11.	Gráficas que expresan la A) longitud y B) número de raíces 72 h de exposición.	52
Figura 12.	EC ₅₀ de colchicina después de 72 h de exposición y después de 4 h de exposición con 68 h de recuperación. La línea roja punteada indica el 50% de crecimiento.	54
Figura 13.	Ejemplificación de las fases del ciclo celular y aberraciones cromosómicas.	55
Figura 14.	Índice mitótico y porcentaje de daño de muestras expuestas a diferentes concentraciones de colchicina por A) 24 y B) 72 h con y sin recuperación.	57
Figura 15.	Células en cada fase mitóticas en <i>Allium cepa</i> expuestas a colchicina por 24 horas continuas, y 4 horas de exposición más 20 de recuperación.	58
Figura 16.	Células en cada fase mitóticas en <i>Allium cepa</i> expuestas a colchicina por 72 horas continuas, y 4 horas de exposición más 68 de recuperación.	58
Figura 17.	Porcentajes de defectos cromosómicos presentados en <i>Allium cepa</i> expuestas a colchicina por 24 horas continuas y 4 horas de exposición y 20 de recuperación.	59
Figura 18.	Porcentajes de defectos cromosómicos presentados en <i>Allium cepa</i> expuestas a colchicina por 72 horas continuas y 4 horas de exposición y 68 de recuperación.	60
Figura 19.	Cebollas expuestas a PVP K-15 por A) 24, B) 48 y C) 72 horas, así como a PVP K-30 a D) 24, E) 48 y F) 72 horas.	62
Figura 20.	Cebollas expuestas a AgNO ₃ por A) 24, B) 48 y C) 72 h.	63
Figura 21.	Cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de A) 25, B) 15 C) 10 y D) 5 µg/mL.	64
Figura 22.	Cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de A) 100, B) 75 y C) 50 µg/mL.	65
Figura 23.	Acercamientos a defectos de cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de A) 100, B) 75 y C) 50 µg/mL.	65
Figura 24.	Cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de 100 µg/mL A) acercamiento a defectos en el bulbo, B) corte longitudinal y C) corte transversal.	66

- Figura 25.** **A)** Longitud y **B)** número de raíces después de 24, 48 y 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs formulación 1. En donde, C+ representa el control positivo de colchicina [0.00125 mM] a 72 h continuas; C++, el control positivo de colchicina [0.125 mM] con una exposición de 4 h y 68 h de recuperación; y C- el control negativo con agua destilada. 67
- Figura 26.** Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 horas a concentraciones de **A)**25, **B)** 15 **C)**10 y **D)** 5 µl/mL. 68
- Figura 27.** Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 h a concentraciones de **A)**100, **B)** 75 y **C)** 50 µg/mL. 68
- Figura 28.** Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 horas a una concentración de 100 µg/mL **A)** acercamiento a defectos en el bulbo, **B)** defectos en el tallo, **C)** corte longitudinal y **D)** corte transversal del bulbo. 69
- Figura 29.** Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 h a concentración de **A)**100 y **B)** 50 µg/mL defecto en raíces “envolventes”. 70
- Figura 30.** **A)** Longitud y **B)** número de raíces en 24, 48 y 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs formulación 4. En donde, C+ representa el control positivo de colchicina [0.00125 mM] a 72 h. continuas; C++, el control positivo de colchicina [0.125 mM] con una exposición de 4 h. y 68 h. de recuperación; y C-, el control negativo con agua destilada. 71
- Figura 31.** EC₅₀ después de 72 h de exposición continua a diferentes concentraciones de las formulaciones 1 y 4 de las AgNPs. 71
- Figura 32.** Comparaciones de índice mitótico y porcentaje de daño para AgNP1. Las letras minúsculas indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control correspondiente con letra mayúscula: C+ (A), C++ (B), C- (C), PVP (D) y AgNO₃ (E). Los * indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de daño. Se considera p<0.05 73
- Figura 33.** Comparaciones de índice mitótico y porcentaje de daño para AgNP4. Las letras minúsculas indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control correspondiente con letra mayúscula: C+ (A), C++ (B), C- (C), PVP (D) y AgNO₃ (E). Los * indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de daño. Se considera p<0.05 74
- Figura 34.** Fases mitóticas en *Allium cepa* expuestas a AgNPs 1 por 72 h. 75
- Figura 35.** Defectos cromosómicos en *Allium cepa* expuestas a AgNPs 1 por 72 h. 76

Figura 36.	Fases mitóticas en <i>Allium cepa</i> expuestas a AgNPs 4 por 72 h.	77
Figura 37.	Defectos cromosómicos en <i>Allium cepa</i> expuestas a AgNPs 4 por 72 h.	77
Figura 38.	Índice mitótico de las nanopartículas 1 y 4.	79
Figura 39.	Porcentaje de daño de las nanopartículas 1 y 4.	80
Figura 40.	Fotografías de raíces negras de AgNP1 a 100 µg/mL en aumento x40, observado con A) luz blanca y B) en fluorescencia a $\lambda_e = 470$ nm.	82
Figura 41.	Radiografía de cebollas expuestas a AgNPs 1 con concentraciones de: A) y B) 100; C) y D) 75; y E) y F) 50 µg/mL y AgNPs 4 con una concentración de 100 µg/mL. En donde I) muestra el algodón impregnado con AgNPs 1 y su respectiva radiografía utilizado como control de identificación de plata metálica. Radiografía de cebollas expuestas a AgNPs 1 con concentraciones de: A) y B) 100; C) y D) 75; y E) y F) 50 µg/mL y AgNPs 4 con una concentración de 100 µg/mL. En donde I) muestra el algodón impregnado con AgNPs 1 y su respectiva radiografía utilizado como control de identificación de plata metálica.	83
Figura 42.	Comparación de tamaños de células expuestas a colchicina con una concentración de 1.25 mM: A), C), E), y G) y 0.00125mM: B), D), F), y H) 0.00125mM. Los paneles I-L muestran la comparación de tamaños de células expuestas a concentraciones de 100 µg/mL de I) AgNPs 1 y K) AgNPs 4 y 5 µg/mL de J) AgNPs 1 y L) AgNPs 4.	85
Figura 43.	Células de cebolla expuestas a colchicina [1.25 mM] por 4 h con 20 h de recuperación en donde A) se muestran múltiples polos antes de la división celular y B) se observan células polinucleadas y polimicronucleadas.	86
Figura 44.	Los defectos encontrados en muestras expuestas a colchicina [1.25 mM] en diferentes tiempos con y sin recuperación son A) cromosoma vagabundo en C-metafase; B) cromosoma vagabundo antes de convertirse en micronúcleo; C) y D) micronúcleo; E) célula con múltiples micronúcleos; F) célula polinucleada; G) célula binucleada; H) micronúcleos producidos por AgNPs 1 a 50 µg/mL; Micronúcleos producidos por AgNPs 4 a I) 100 y J) 25 µg/mL.	89

Índice de tablas

Tabla 1.	Uso de colchicina como control en el Allium test.	22
Tabla 2.	Evaluación de AgNps en el Allium test.	25
Tabla 3.	Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de AgNP1 y AgNP4 (Cruz-Ramírez et al., 2021).	45
Tabla 4.	Índice mitótico en <i>Allium cepa</i> con una exposición continua de colchicina de 72 y 24 horas y una exposición de 4 horas con un tiempo de recuperación de 68 y 20 horas.	56
Tabla 5.	Porcentaje de daño en <i>Allium cepa</i> con una exposición continua de colchicina de 72 y 24 horas y una exposición de 4 horas con un tiempo de recuperación de 68 y 20 horas.	56
Tabla 6.	Valores de significancia de prueba Anova de dos vías con los parámetros evaluados de concentración y tiempo en el conteo de células, los tratamientos fueron de 1.25, 0.125, 0.0125 y 0.00125mM a exposición de 24 y 72 h continuas y 4 de exposición más 20 o 68 h de recuperación.	61
Tabla 7.	Imágenes con aglomerados dependientes del tipo de nanopartícula y la concentración.	81
Tabla 8.	Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas utilizadas por Casillas (2020) (AgNP A) y las empleadas en este trabajo (AgNP1 y AgN4).	91

Índice de anexos

Anexo 1.	Comparación entre controles y diferentes concentraciones de AgNPs formulación 1 por medio de la prueba de Tukey.	100
Anexo 2.	Comparación entre controles y diferentes concentraciones de AgNPs formulación 4 por medio de la prueba de Tukey.	102
Anexo 3.	Comparación del índice mitótico entre diferentes concentraciones de AgNPs formulaciones 1 y 4 por medio de la prueba de Tukey.	104
Anexo 4.	Comparación del índice de daño entre diferentes concentraciones de AgNPs formulaciones 1 y 4 por medio de la prueba de Tukey.	105

Introducción

En los últimos años el interés por la investigación e implementación de nanomateriales se ha incrementado debido a sus aplicaciones potenciales en áreas como la ingeniería, tecnología y medicina (Donaldson et al., 2004). Debido a su popularidad, la exposición a nanomateriales y productos que los contienen se vuelve más frecuente, ya sea durante la producción, transporte o incluso la disposición final al medio ambiente (Liu & Jiang, 2016, Capítulo 1). Si no son tratados de manera apropiada, los nanomateriales pueden representar un riesgo para la salud humana. Por lo tanto, el desarrollo de investigaciones con el fin de estudiar los posibles efectos dañinos que estos nanomateriales pueden causar, tanto a nivel celular como en organismos vivos completos, es indispensable e impostergable (Sohaebuddin et al., 2010).

Para la identificación de los efectos dañinos ya sean citotóxicos, genotóxicos o teratogénicos, es necesario realizar pruebas *in vivo* y/o *in vitro* para determinar el tipo de daño que se produce y la dosis necesaria para provocar los efectos adversos. Por un lado, en los modelos *in vivo* se realiza una aproximación muy cercana a lo que se vería en un organismo complejo e íntegro por medio de experimentación en animales de laboratorio (Fina et al., 2013). Sin embargo, de manera experimental los modelos *in vitro* han ganado popularidad como alternativa para evitar el sacrificio de los animales de laboratorio. Los datos publicados por la European Commission, Joint Research Centre (European Commission, Joint Research Centre (JRC), 2019) contienen metodologías y protocolos de alternativas experimentales para la evaluación de posibles agentes tóxicos sin necesidad de uso de animales de laboratorio. Entre ellos, los métodos computacionales o modelos *in vitro*, presentan una aproximación a lo que se vería en un organismo complejo y reduciendo la cantidad de ensayos *in vivo* que se requieren realizar.

De manera más específica, los ensayos *in vitro* pueden realizarse en cultivos celulares (líneas celulares, cultivos primarios), bacterias, hongos, insectos, plantas e incluso pequeños animales (Cervantes, et al., 2019). Los modelos *in vitro* han proporcionado ventajas como la identificación de perturbaciones moleculares y celulares específicas de la sustancia química evaluada y el establecimiento de la concentración que causa el daño celular (Yoon et al., 2012).

Los ensayos *in vitro* con plantas superiores son una buena aproximación para determinar posibles efectos dañinos de nanomateriales, tanto en los ecosistemas como en la salud humana, permitiendo tomar medidas de prevención para mitigar el impacto del material evaluado (Ma et al., 2005).

El uso de plantas superiores es de gran utilidad para estudios de genotoxicidad, en especial, aquellos en los que se desea determinar el impacto de materiales en el medio ambiente. Algunos modelos vegetales permiten la evaluación de distintos parámetros como índice mitótico, mutaciones y aberraciones cromosómicas, observando las consecuencias en los distintos tipos de tejidos de la planta como las hojas, raíces y polen (Leme & Marin-Morales, 2009).

Se busca que las plantas utilizadas en este tipo de ensayos tengan una cantidad reducida de cromosomas y con un tamaño celular adecuado para poder apreciar de manera más precisa los daños genotóxicos. Es por ello por lo que entre las plantas más frecuentemente utilizadas están la *Arabidopsis thaliana* para ensayos de mutaciones (Kim et al., 2007), *Vicia faba* para evaluaciones citogenéticas (Ma, 1982), *Hordeum vulgare* para aberraciones cromosómicas o mutaciones relacionadas con la clorofila (Milewska-Hendel et al., 2017), y *Allium cepa* para ensayos de aberraciones cromosómicas (Grant, 1982).

La cebolla (*Allium cepa*) es de los modelos más utilizados para el estudio de daños genotóxicos desde su implementación por Levan (1938), donde describe el mecanismo de la colchicina como agente inhibidor de la mitosis y la posibilidad de observar aberraciones cromosómicas que llegaba a generar. Además, se ha promovido el uso del *Allium cepa* como forma de monitoreo ambiental, ya sea de contaminantes en suelos o en agua. En el protocolo número 8 establecido por Fiskesjö en 1989, se sugieren parámetros a evaluar respecto a la longitud y forma de las raíces, así como características de las células meristemáticas (European Commission, Joint Research Centre (JRC), 2019). Por lo tanto, el uso de la cebolla ha tenido buena aceptación para la evaluación de posibles agentes genotóxicos en el ambiente, donde los nanomateriales no son una excepción.

Los efectos de nanopartículas metálicas en plantas superiores no pueden ser generalizados debido a que se sabe que son consecuencia de la composición química,

recubrimiento y el tamaño de la nanopartícula que se estudia y que puede ocasionar la liberación de iones metálicos (Masarovičová & Kráľová, 2013).

En cuanto al estudio de AgNPs en plantas superiores, se ha encontrado que el recubrimiento y concentración son factores clave al evaluar efectos benéficos o dañinos. Por un lado, el equipo de Wang (2013) expuso a *Arabidopsis thaliana* y *Populus deltoides nigra* a AgNPs con polietilenglicol (PEG) y carbono, encontrando que arriba de ciertas concentraciones provocan efectos fitotóxicos, pero en concentraciones bajas promueven la elongación de las raíces. De manera similar, en el caso de Casillas-Figueroa (2020) se evaluaron AgNPs con recubrimiento de polivinilpirrolidona (PVP), encontrando que al exponer raíces de *Allium cepa* a concentraciones menores a 10 µg/ml también hay incremento en el crecimiento de las raíces sin daño genotóxico.

En consecuencia, toda nanopartícula debe de ser evaluada de forma particular ya que sus variaciones de tamaño o recubrimiento afectarán la respuesta del organismo modelo. Asimismo, es necesario utilizar un control adecuado para evaluar el daño genotóxico. En este sentido, la colchicina es un control apropiado, debido a su efecto en la inhibición de la mitosis; sin embargo, es necesario determinar las condiciones de exposición adecuada.

Si bien, *Allium test* ha sido utilizado por varios investigadores como control, no se ha encontrado estandarizado un tiempo de exposición y concentración para el caso de evaluación genotóxica con *Allium cepa* (Hyypio, 1954; Shimamura, 1939).

Antecedentes

Allium cepa como modelo para la evaluación de materiales, ha sido utilizado por diversos investigadores. Si bien, no existe un protocolo generalizado para la evaluación con cebollas, la metodología seguida es similar con ligeras modificaciones en cuanto a la tinción usada, el tiempo de exposición, la cantidad de células contadas e incluso los parámetros evaluados.

De forma general, Bosio (2012) sugiere el uso de cinco bulbos de *Allium cepa* por cada tratamiento a evaluar, donde se establezca un control negativo con agua y un control positivo con compuestos genotóxicos como metilsulfonilmetano o glifosato. Además, se sugiere que la exposición sea de 24 horas por tratamiento, seguido por la fijación de las raíces en una solución de etanol: ácido acético (3:1) por 24 horas, para finalmente su almacenamiento en etanol al 70% en refrigeración a 4° C. En cuanto al conteo considera que es necesario una cantidad de 500 a 1000 células por cada bulbo.

Asimismo, Guerra & de Souza (2002) han descrito distintas tinciones que pueden utilizarse con las raíces de las cebollas para observar las fases mitóticas y posibles daños, proponiendo el uso de la orceína acética, carmín acético o la tinción de Giemsa como las más apropiadas.

Los parámetros para evaluar pueden variar, de manera macroscópica se evalúa el tamaño y forma de las raíces (JCR,2019), y con la tinción de los cromosomas se cuantifican las células en cada fase de división para calcular el índice mitótico, así como daños cromosómicos, por ejemplo, micronúcleos, yemas, puentes o cromosomas perdidos (Bonciu, 2018).

Para los análisis estadísticos de los resultados, Barbério y colaboradores (2011) recopilaron artículos donde se utilizaba el modelo de *Allium cepa* para evaluación genotóxica y analizaron las pruebas estadísticas más frecuentemente utilizadas. Se encontraron como las más populares las pruebas paramétricas Anova y t de Student, no paramétricas Kruskal–Wallis y Mann–Whitney; así como análisis post-hoc donde los más frecuentes fueron el test de Tukey, Dunnett y Dunn.

Si bien se han sugerido algunas sustancias como control positivo, la colchicina, al ser un fármaco antimitótico, provoca daño aneugénico en las células y, por lo tanto, es un adecuado punto de comparación para la cuantificación del daño. Sin embargo, no se

ha formalizado el uso de una concentración o tiempo determinados por lo que los diversos autores utilizan parámetros de acuerdo con sus necesidades. En su mayoría se utilizan tiempos de exposición cortos con concentraciones altas, además de que en algunos experimentos no sólo se considera el tiempo de exposición, sino que además se coloca nuevamente la cebolla en agua para darle tiempo de recuperación.

Podemos mencionar autores como Kundu & Ray (2017), que realizaron el ensayo con *Allium cepa* para comparar los efectos de extractos acuosos de hojas de *Clerodendrum viscosum* (LAECV) con la colchicina donde, para esta última, se usó una concentración de 1.0014 mM con tiempo de exposición de 4 horas sin y con recuperación de 16 horas. Se observó una disminución significativa del índice mitótico para ambos casos, además de cuantificar defectos como puentes, metafases-C, cromosomas vagabundos y micronúcleos. Cabe destacar que si bien, estos últimos son un indicativo de genotoxicidad, fue casi nula su presencia comparada con los otros defectos.

En relación con el uso de micronúcleos como indicador de genotoxicidad, Ahiwar y Verma (2015) evaluaron el comportamiento cromosómico asináptico inducido por la colchicina con 12 horas de exposición. Este estudio fue más enfocado a los defectos en los pares de cromosomas que son afectados, por lo que se utilizó una concentración alta de 0.2% (5.007 mM) para provocar suficiente daño y no se cuantificó el índice mitótico. Sin embargo, destaca que encontraron un porcentaje de micronúcleos de hasta 32.85% en el total de células contadas.

Nelson (1972), considero un intervalo más amplio de concentraciones y tiempos de exposición como se observa en la tabla 1, donde calcula el índice mitótico de cada una de las condiciones. De manera general, se observa que hay un ligero aumento en el índice mitótico para la concentración intermedia de 0.125 mM, así como también se eleva cuando hay un tiempo de recuperación de 24 horas.

De forma similar, Chakraborty (2021) evalúa 3 tiempos de exposición con una sola concentración, y reporta que hubo una disminución del índice mitótico respecto al control con agua, además de que se observó un incremento de células en metafase, pero disminución en anafases y telofases. Un comparativo de estos cuatro estudios mencionados como de relevancia con colchicina en *Allium cepa* puede observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Uso de colchicina como control en el Allium test.

Concentración [mM]	Tiempo [h]	No. de células contadas	I.M.	MN	Referencia
5.007	12	70	–	17.4%	(Ahirwar & Verma, 2015)
5.007	12	70	–	32.85 %	
1.0014	4	2113	-19.53%	0.57%	(Kundu & Ray, 2017) ^{***}
1.0014	4+16	2470	-40.38%	2.06%	
1.25	2	1000-2000	8.8	–	(Nelson, 1972)
	2+4	1000-2000	22.6	–	
	2+24	1000-2000	31.9	–	
	2+72	1000-2000	13.9	–	
0.125	2	1000-2000	11.7	–	
	2+4	1000-2000	12	–	
	2+24	1000-2000	32.8	–	
	2+72	1000-2000	7.1	–	
0.0125	2	1000-2000	6.6	–	
	2+4	1000-2000	10.3	–	
	2+24	1000-2000	11.5	–	
	2+72	1000-2000	5.5	–	

* I.M. Índice mitótico, MN micronúcleos

** La suma indica tiempo de exposición más tiempo de recuperación

*** El I.M. es el porcentaje de disminución respecto al control con agua

Continúa en la siguiente página.

Continuación tabla 1.

Concentración [mM]	Tiempo [h]	No. de células contadas	I.M.	MN	Referencia
1001.4	2	–	9.9%	–	(Chakraborty et al., 2021)
	4	–	9.66%	–	
	4+16	–	3.94%	–	

* **I.M.** Índice mitótico, **MN** micronúcleos

** La suma indica tiempo de exposición más tiempo de recuperación

*** El I.M. es el porcentaje de disminución respecto al control con agua

Asimismo, podemos mencionar a otros autores que han realizado estudios con colchicina en *Allium cepa*, pero que no realizaron la cuantificación de índice mitótico o micronúcleos. Por ejemplo, Ronchi (1970) estudió la duplicación de los intercambios subcromáticos en las células de cebolla, pero sólo cuantifica las aberraciones en metafase y anafase con exposición de 2 horas con 6-metilcumarina (6-MC) más otras 2 horas de post tratamiento con colchicina 0.025%. Otro ejemplo es el estudio de Geoffriau y su equipo (1997), que se enfocan en medir los niveles de poliploidía provocada por concentraciones de 2.5, 7.5 y 12.5 mM con 24 horas continuas de exposición.

Shimamura (1939) realizó una descripción de las células y las raíces, destacando que en las raíces hay un incremento en el volumen de las células, pero no es en proporción al incremento de la cromatina al ser expuestas a colchicina, lo atribuye a una división celular anormal. Este efecto puede observarse de manera macroscópica como protuberancias en las raíces como se aprecia en la figura 1.

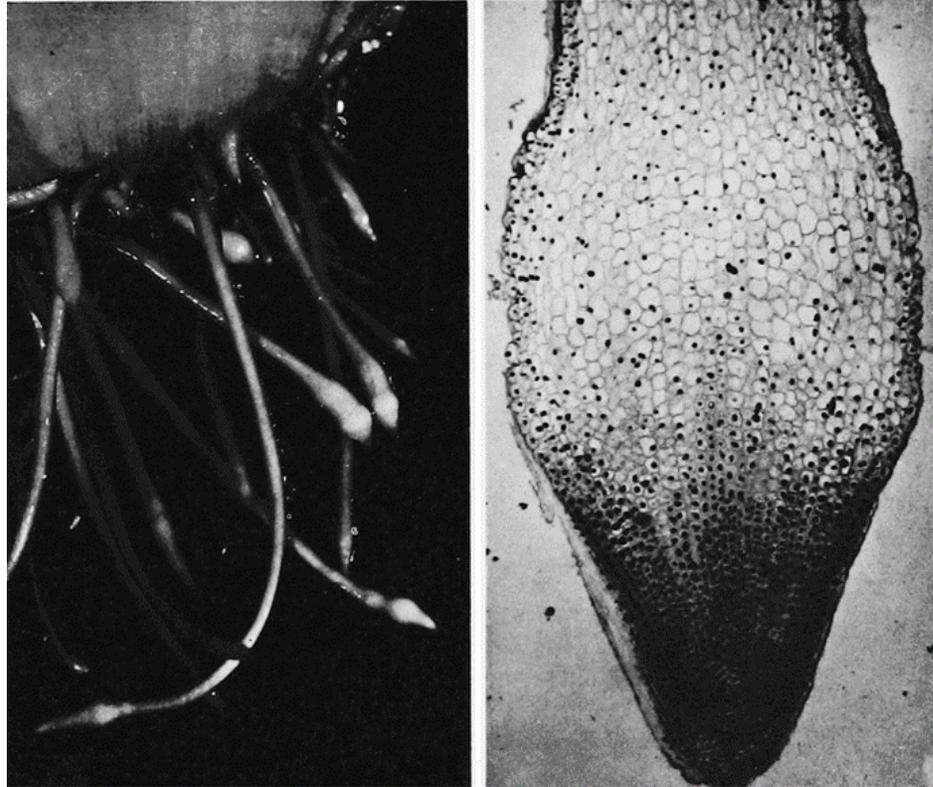


Figura 1. Raíces expuestas con colchicina. Izquierda, protuberancias macroscópicas en las raíces. Derecha corte transversal de la raíz donde se observa incremento del volumen celular. (Shimamura, 1939).

Por otro lado, la evaluación genotóxica utilizando el modelo de *Allium cepa* también ha sido utilizado para evaluar el efecto producido por nanomateriales. Para nuestros fines, nos enfocamos en nanopartículas de plata. Por lo tanto, en la tabla 2 se puede ver un comparativo de los principales resultados de estas evaluaciones, en cuanto al índice mitótico y micronúcleos como indicador genotóxico.

Como se puede observar, en todos los casos mostrados se utilizó un tiempo de exposición de 72 horas continuas y concentraciones de nanopartículas menores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Es importante resaltar que no todos los trabajos reportan las concentraciones en función del contenido de plata. Asimismo, se observa que en todos los casos hay una relación dosis-respuesta, puesto que entre menor concentración el índice mitótico se incrementa.

Tabla 2. Evaluación de AgNps en el Allium test.

Tamaño de AgNp [nm]	Recubrimiento	Concentración [µg/mL]	Tiempo [h]	No. de células	I.M.	MN/aberraciones	Referencia
35 ± 12	PVP	100	72	1000	~13	~1	(Casillas-Figueroa et al., 2020)
		75			~13	~1	
		50			~13.8	~1	
		25			~14	~0	
		15			~14.5	~0	
		10			~22	~0	
		5			~22.5	~1	
10-80	Citrato	39.94	72	500	~9	–	(Cvjetko et al., 2017)
		29.95			~9	–	
		19.97			~9	–	
		9.98			~9	–	
<100	PVP	39.94	72	500	~8	–	
		29.95			~9	–	
		19.97			~9	–	
		9.98			~9	–	

* **I.M.** Índice mitótico, **MN** micronúcleos

Continúa en la siguiente página.

Continuación tabla 2.

Tamaño de AgNp [nm]	Recubrimiento	Concentración [µg/mL]	Tiempo [h]	No. de células	I.M.	MN/aberraciones	Referencia
<10	CTAB	39.94	72	500	~7	–	(Cvjetko et al., 2017)
		29.95			~8	–	
		19.97			~9	–	
		9.98			~9	–	
4-32	CPHE	100	72	1000	0.96	9	(Yekeen et al., 2017)
		10			2.34	7	
		1			3.06	8	
		0.1			4.06	8	
		0.01			4.52	6	
8.96-54.22	CBE	100			0.96	9	
		10			2.94	3	
		1			3.84	17	
		0.1			4.2	14	
		0.01			5.72	8	

* **I.M.** Índice mitótico, **MN** micronúcleos

En el trabajo de Casillas-Figueroa y equipo (2020) se midió la longitud y cantidad de raíces; por lo que, considerando el índice mitótico respecto al control, se determinó

que incluso se promueve el crecimiento de las raíces teniendo un efecto genotóxico mínimo al cuantificar la cantidad de micronúcleos presentes.

Por su parte Cvjetko (2017), al comparar los recubrimientos de citrato, PVP y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), determinó que los tres presentaban longitudes de raíz similares, pero en cuanto al índice mitótico el CTAB fue menor que el resto, en especial con concentraciones altas. Esto último coincide con la cuantificación de plata en las raíces por medio de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), donde el CTAB tuvo mayor cantidad y el PVP menor.

El recubrimiento más frecuente de las AgNPs es el de PVP, esto porque se ha observado que ayuda a disminuir la genotoxicidad. En este sentido es importante mencionar el trabajo de Panda y colegas (2016), que realizaron la evaluación de nanopartículas de plata sin y con recubrimiento de PVP en concentraciones de 100, 80, 40, 20, 10, 5,1 mg/L exponiendo las plántulas de *Lathyrus sativus* por 3 h con 4 a 24 h de recuperación. Aunque no se realizaron los ensayos en *Allium cepa*, los resultados a destacar es que, en general, el índice mitótico disminuye significativamente con dosis por arriba de 20 mg/L. Entre la nanopartícula desnuda y el control de nitrato de plata, los efectos en el índice y aberraciones cromosómicas fueron similares, en contraste con la recubierta de PVP cuyo daño genotóxico fue menor. Asimismo, hay que destacar que el porcentaje de aberraciones cromosómicas en todos los casos fue mucho mayor que la presencia de micronúcleos.

Justificación

En el estudio de los efectos de sustancias desconocidas, resulta conveniente realizar estudios citogenéticos con la finalidad de evaluar el efecto que tiene la concentración y tiempos de exposición en un organismo vivo. Este tipo de evaluaciones se usan comúnmente para el monitoreo de contaminantes que pueden llegar a afectar el ecosistema de un organismo en particular (Bosio & Laughinghouse, 2012, Capítulo 8).

Los estudios citogenéticos permiten determinar las afectaciones a un organismo a nivel cromosómico y, en el caso de plantas superiores, tienen la función de ayudar a la identificación de mutágenos cuyas consecuencias pueden ser observadas como aberraciones cromosómicas las cuales incluyen a los micronúcleos (Kwasniewska & Bara, 2022). La elección de plantas superiores para el monitoreo ambiental se debe, entre otras razones, a su bajo costo, facilidad de manejo y almacenamiento, el tamaño y cantidad de cromosomas (Fiskesjö, 1985), además de tener buena correlación con otros sistemas como bacterias, levaduras y de forma más limitada con células de mamíferos (Grant, 1994).

Como resultado de estas ventajas, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) ha desarrollado una serie de distintas directrices enfocadas en la evaluación de sustancias en plantas, así como la medición de parámetros genotóxicos como micronúcleos y otras aberraciones cromosómicas. Por un lado, tenemos el ensayo para plantas terrestres con el número 208 Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (OECD, 2006a), donde se da la guía para evaluar el crecimiento de plantas en tierra que contenga la sustancia a evaluar para elaborar una curva de dosis-respuesta. También es posible calcular la concentración efectiva EC_{50} de acuerdo con los parámetros que se decidan medir para los fines de cada estudio y con el análisis estadístico adecuado. De manera similar se encuentra el protocolo 227 Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test (OECD, 2006b), que sigue las mismas evaluaciones solo que la sustancia a evaluar se rocía en las hojas y la planta en general en vez de estar presente en la tierra

Asimismo, se han publicado otras directrices como la 473 In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration test (OECD, 2016a) para evaluación de aberraciones cromosómicas y la 487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD, 2016c) para evaluación de micronúcleos, ambas utilizando células de mamíferos. Sin embargo, estos protocolos resultan más complejos y costosos.

Por lo tanto, para conocer el impacto de sustancias cuyo efecto citogenotóxico sea desconocido, como en las diferentes formulaciones de nanopartículas de plata, es recomendable realizar evaluaciones estandarizadas, por lo que las guías de la OCDE resultan de gran utilidad. En específico, al utilizar plantas superiores como la *Allium cepa* se reduce el costo, se facilita la identificación del EC₅₀, concentraciones y tiempos de exposición, además de asegurar que todos los resultados fueron obtenidos con un procedimiento estandarizado y reproducible.

Marco Teórico

Ensayos de genotoxicidad

En los últimos 30 años se han creado protocolos y pruebas para la investigación de los posibles efectos genotóxicos y/o cancerígenos de distintas sustancias tales como fármacos, aditivos alimentarios, plaguicidas, entre otros. Los ensayos de genotoxicidad se utilizan para estudiar las posibles interacciones de una sustancia con el material genético que, posteriormente, podría resultar en alguna aberración cromosómica. (Sponchiado, *et. al.*, 2016)

Las aberraciones cromosómicas pueden ser ocasionados por dos tipos de agentes, clastogénicos (que rompen el cromosoma) o aneugénicos (que afectan los husos mitóticos). De acuerdo con Stopper & Müller (1997), estos agentes se pueden diferenciar por la presencia de cinetocoro en la aberración cromosómica (ej. micronúcleo), en donde si se presenta es considerado un agente aneugénico y, en contraparte, si no se presenta, se consideraría un agente clastogénico.

De acuerdo con Richard J. Albertani (2000) los ensayos de genotoxicidad difieren dependiendo el punto final que se esté considerando. Los más estudiados son aberraciones estructurales y numéricas evaluadas mediante el método citogenético, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), micronúcleos (MN), daño al ADN mediante ensayos bioquímicos/electroforéticos o por intercambio de cromátidas hermanas (SCE), aductos de proteína y mutaciones de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT).

Actualmente, es indispensable realizar ensayos de genotoxicidad a los fármacos antes de su comercialización de manera global. Es necesario conocer el mecanismo del posible daño que éstos puedan causar. Aunque muchos relacionan genotoxicidad con un posible riesgo a la salud humana, esto no es necesariamente correcto, teniendo así fármacos que, para ser funcionales, es necesario que causen cierto daño genético (Snyder & Green, 2001)

Ensayos con plantas

El uso de plantas como sistemas de monitoreo para determinar posibles daños clastogénicos en organismos vivos es uno de los métodos más estudiados, donde se utiliza puntas de raíces o polen para determinar si el estímulo ocasiona aberraciones cromosómicas. La cuantificación de las aberraciones cromosómicas usando plantas tiene ventajas debido a su simpleza, confiabilidad y bajo costo (Grant, 1978).

De acuerdo con Kwasniewska & Bara (2022) los ensayos de genotoxicidad en plantas se llevan a cabo principalmente en las especies *Allium*, *Nicotiana* y *Vicia*. Además, enuncia que existen distintas técnicas de tinción para llevar a cabo estos ensayos, como son el método Feulgen, la tinción con orceína acética y la tinción de Giemsa. Estas tinciones son capaces de teñir el material genético y, por ende, pueden ayudar a identificar las aberraciones cromosómicas presentes en la célula. Cabe destacar que estas tinciones se pueden combinar con otras, para así obtener un mayor contraste, tal es el caso del verde rápido, que es capaz de teñir las paredes celulósicas.

Más recientemente se ha optado por utilizar tinciones fluorescentes como DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y naranja de acridina, esto debido a su rapidez y precisión a la hora de identificar aberraciones cromosómicas, lo cual los hace altamente recomendables para evaluaciones de genotoxicidad (Dias & et. al., 2005)

Allium test

Allium test es un bioensayo en el cual se utiliza la especie *Allium cepa* para evaluar los posibles efectos tóxicos que pueda tener alguna sustancia (Muñoz-Solarte & Guerrero-Pepinosa, 2013). Este ensayo fue introducido por Levan en 1938 cuando estudió los efectos de la colchicina en *Allium cepa*; desde entonces, se ha utilizado frecuentemente para ensayos toxicológicos. Así mismo, una de las razones que provee la utilización de *Allium cepa* son las buenas condiciones cromosómicas como un gran tamaño de cromosomas en cantidad pequeña, lo que permite una visualización más sencilla en el microscopio, así como una mejor identificación de posibles defectos cromosómicos (Fiskesjö, 1985).

Los parámetros por estudiar para determinar la genotoxicidad de un material pueden ser microscópicos o macroscópicos (JCR, 2019). En el caso de los primeros se

hace referencia a daños a nivel celular. De acuerdo con Leme & Marin-Morales (2009) el *Allium* test ha mostrado ser un ensayo muy efectivo para el análisis de daños en el ADN, proporcionando datos fidedignos cuando se estudian aberraciones cromosómicas y micronúcleos en las células meristemáticas apicales.

Cabe destacar que para una correcta evaluación de daño genotóxico se recomienda realizar la evaluación de por lo menos 3 mm de la raíz, esto por cómo se distribuyen las regiones de la raíz como se observa en la figura 2 (Ma et al., 1995).

Por lo general los estudios se enfocan en las células meristemáticas (región M) que es donde se está llevando a cabo la mitosis, sin embargo, como los micronúcleos se forman en la interfase, se van a encontrar en la zona de las células hijas (F1). Asimismo, es de importancia que se analicen las raíces por lo menos dos rondas de mitosis después del tratamiento (aproximadamente 24 horas) para que el daño que se infligió en las células meristemáticas se alcance a apreciar en la población de células F1. (Ma et al., 1995)

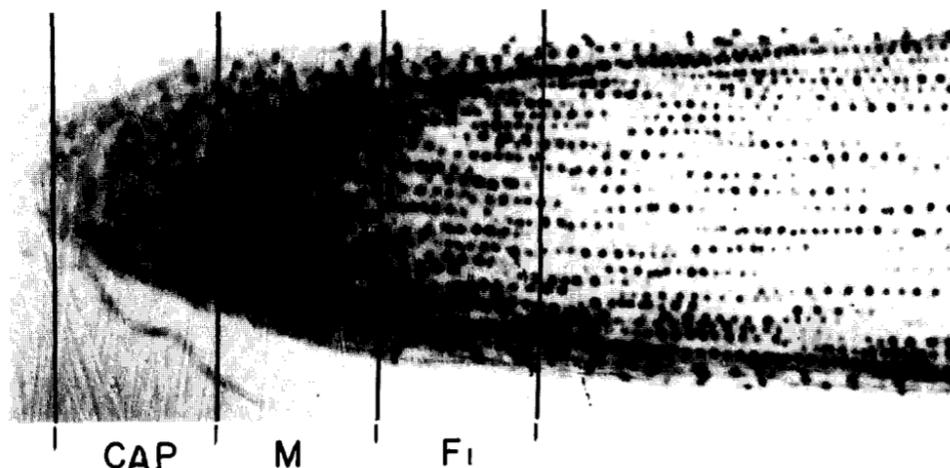


Figura 2. Microfotografía de la sección longitudinal de la raíz de *Allium cepa* mostrando las regiones de la punta de la raíz (CAP), meristemo (M) y de las células hijas (F1) (Ma et al., 1995).

En cuanto a los parámetros macroscópicos, se puede cuantificar el número y la longitud de las raíces; este último parámetro permite determinar la concentración media máxima EC_{50} al graficar las concentraciones del tratamiento en la abscisa y la longitud de la raíz en porcentaje respecto al control en la ordenada (Fiskesjö, 1985).

Otro de los parámetros observables es la turgencia, la cual describe que tan rígida se encuentra la raíz. Por lo general, un material genotóxico generará raíces duras y frágiles. El cambio de color de la raíz es otro indicativo especialmente cuando se trabaja con sales o, en casos de agentes muy tóxicos, la raíz puede tornarse café resultado de la muerte celular (Fiskesjö, 1985).

Finalmente, la forma de las raíces es otro aspecto por evaluar donde podemos clasificarla como normal, “agujas de croché” cuando la punta se curva, “formación de tumor C” que indica que está ocurriendo la C-mitosis y ruptura de las puntas de las raíces, estas formas pueden observarse en la figura 3 (JCR, 2019).

La c-mitosis es caracterizada por la inactivación del huso mitótico. Los cromosomas están dispersos al azar. Después de la división de los cromosomas, a menudo se forma un único núcleo de restitución tetraploide. Los efectos sobre el huso mitótico son dependientes de la concentración; al aplicar una disolución más diluida de la misma sustancia se puede generar una c-mitosis parcial produciendo anafases multipolares (Östergren, 1944).

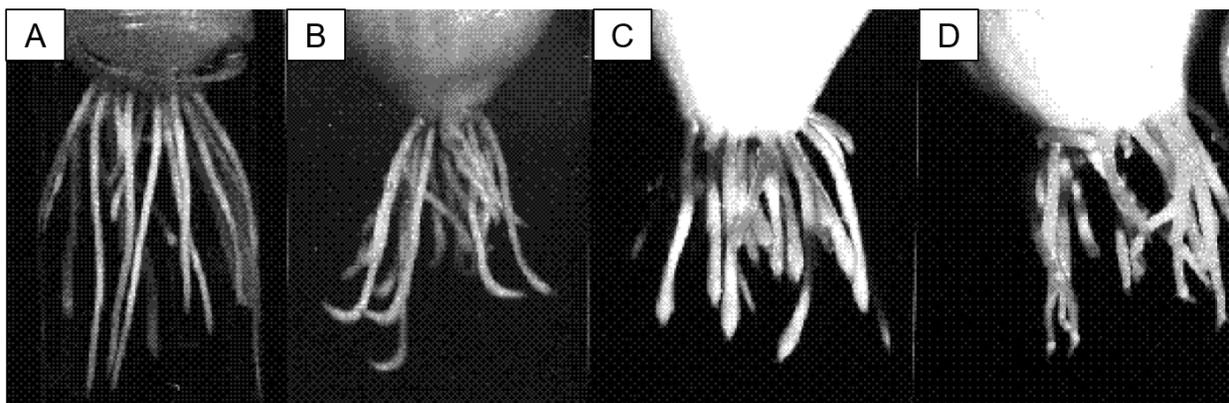


Figura 3. Clasificaciones de las raíces de *Allium cepa* **A)** raíz normal, **B)** raíz con forma de “agujas de croché”, **C)** “formación de tumor C”, **D)** ruptura de puntas (European Commission, Joint Research Centre (JRC), 2019).

Por otra parte, entre las ventajas de usar la *Allium cepa* como modelo para la evaluación genotóxica es que provee una gran cantidad de información sin el inconveniente de los dilemas éticos sobre el uso de animales y el costo de manutención (Bonciu et al., 2018) y, además, puede llegar a ser equiparable con líneas celulares de animales (Bosio & Laughinghouse, 2012, Capítulo 8). Por lo tanto, el uso del *Allium* Test

es altamente recomendado debido a su facilidad, practicidad, bajo costo y a la alta disponibilidad de la especie *Allium cepa*.

Actualmente, Organizaciones internacionales como el programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente (UNEP), la agencia estadounidense de protección ambiental (US EPA) y la Organización Mundial de Salud (OMS), aceptan el bioensayo *Allium test* para el estudio de daños citotóxicos y genotóxicos en plantas, debido a su facilidad, reproducibilidad y correlación con otros sistemas de estudio. (Aydın, G. y Liman, R., 2020)

Aberraciones cromosómicas

Micronúcleos

Los micronúcleos son morfológicamente similares a los núcleos, pero difieren en tamaño, siendo estos más pequeños que el núcleo original. Estos se originan por una deficiencia a la hora de unirse el huso mitótico con el centrómero debido a la carencia del mismo, lo que ocasiona que, ya sea un fragmento de un cromosoma, una cromátida o el cromosoma entero, no sean incluidos en el núcleo para la formación de las células hijas en la telofase y, posteriormente este es recubierto por una membrana nuclear (Fenech, M., 2011).

De igual manera, los micronúcleos también pueden ser formados por: i) cromosomas rezagados (no fueron capaces de unirse al huso mitótico), ii) la ruptura de un cromosoma dicéntrico al ser atraído a ambos polos, iii) la ruptura de un puente anafásico, iv) por cromosomas dobles diminutos al igual que las *yemas* (Shimizu, N., 2011), v) daño en el cinetocoro, vi) una poca metilación de ADN del centrómero o vii) algún falló en el sistema de control del ciclo celular.

Actualmente, los ensayos por micronúcleos son los más utilizados para la determinación de agentes mutagénicos, debido a su fácil identificación. Este modelo se ha utilizado para estudiar pesticidas, radiación ionizante, químicos y, más recientemente, nanopartículas (Kwasniewska & Bara, 2022).

Yemas

Los “nuclear buds” (*nBuds*) o yemas nucleares son un tipo de daño genético que es morfológicamente similar a los micronúcleos, solo que éstos están ligados al núcleo por material núcleo-plasmático, formando así una especie de brazo. Se cree que las yemas son precursores de los micronúcleos y suelen ser ocasionados por pequeños fragmentos de ADN extracromosomal, también llamado cromosomas dobles diminutos (Fenech, M., 2011). Estos son formados por una amplificación génica (mayor replicación de un gen de lo necesario), causando así pequeños cromosomas circulares y acéntricos (Huret JL, 2000). Así mismo, se considera que también pueden ser formados por el rompimiento del puente anafásico o, similar a los micronúcleos, por cromosomas rezagados en la anafase que, posteriormente en la telofase, son envueltos por membrana nuclear y unidos al núcleo (Lindberg, H. *et. al.*, 2007).

Puentes

Los puentes núcleo-plasmáticos son, como su nombre lo indica, un enlazamiento entre los dos nuevos núcleos. Estos son formados debido a la presencia de cromosomas dicéntricos (con dos centrómeros) (Lopez, V. *et. al.*, 2015). En dicho cromosoma se unen dos husos mitóticos de polos opuestos, lo que ocasiona que a la hora de atraer los cromosomas a los polos éste se estire dando lugar a un puente anafásico; posteriormente, este puente es cubierto por la membrana nuclear dando así a un puente núcleo-plasmático. Cabe aclarar que estos puentes desaparecen después del proceso de citocinesis (Maier. M., 2017).

Los cromosomas dicéntricos son ocasionados por dos posibles procesos; el primero es por la falta del telosoma (secuencias de ADN repetidas ricas en guanina) en los extremos de los cromosomas, lo que ocasiona que estos se puedan unir (Almeida, H., *et. al.*, 2013). El segundo, por un fallo en la reparación de las rupturas de la doble cadena de ADN, en donde los cromosomas fragmentados se unen formando un cromosoma dicéntrico (Hlatky, L., 2002).

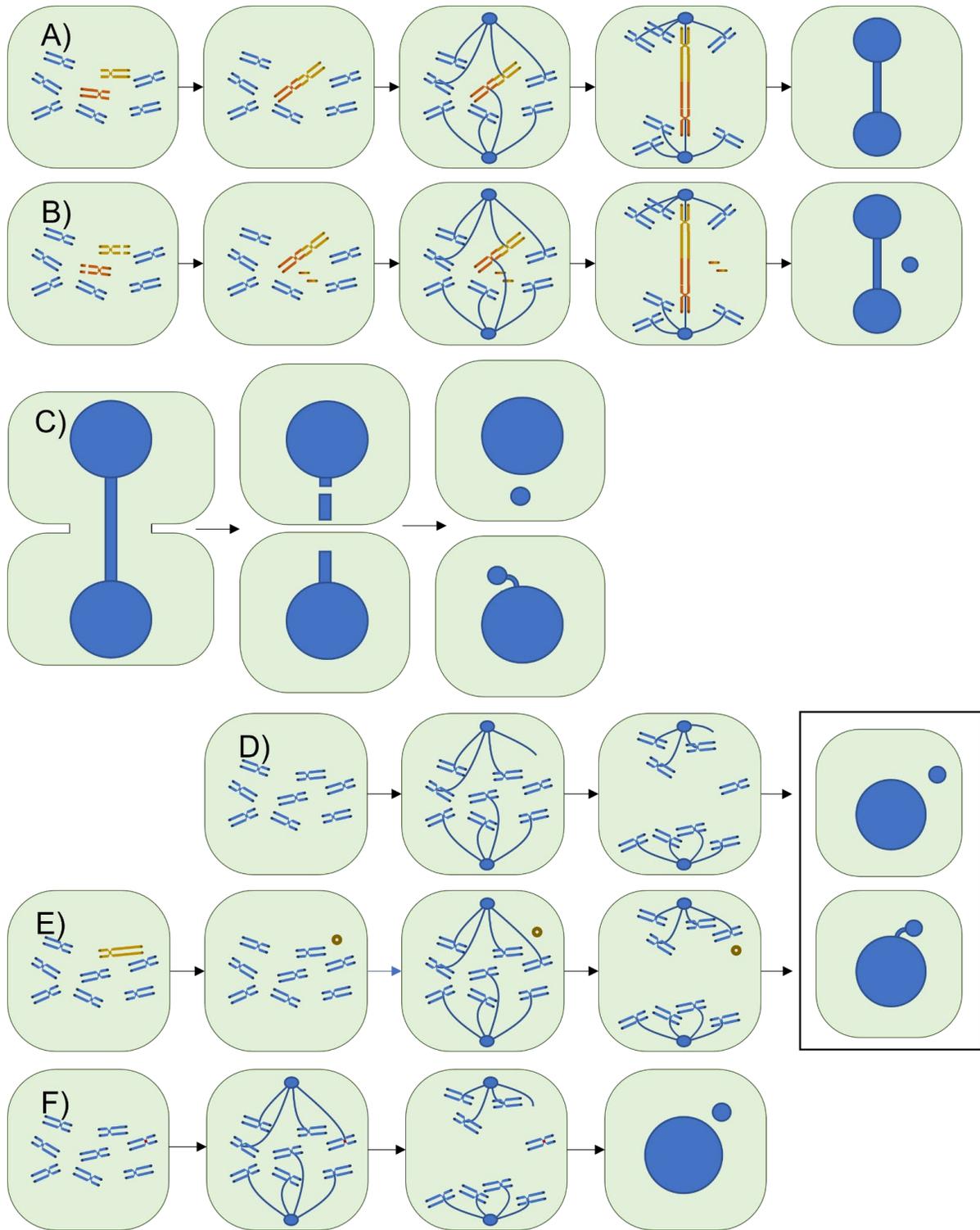


Figura 4. Puentes creados por **A)** la unión de dos cromosomas por falta de telosoma; **B)** la unión de cromosomas por falla en ruptura de ADN; **C)** Citocinesis de una célula con un puente cromosómico causando la formación de micronúcleos y/o yemas. Creación de micronúcleo o yema por **D)** Cromosoma vagabundo y **E)** Cromosomas pequeños diminutos. **F)** Creación de micronúcleo por cromosoma con daño en el cinetocoro o una poca metilación de ADN del centrómero.

Defectos cromosómicos

Dentro de esta clasificación, se consideraron todos los defectos cromosómicos observados durante alguna fase del proceso de mitosis, dentro de estos se encuentran los cromosomas vagabundos, cromosomas “pegados”, fragmentos de cromosomas, c-mitosis, entre otros (Fiskeskö, G., 1985).

De acuerdo con Morais-Leme (2009), los defectos cromosómicos pueden llegar a ser difíciles de identificar, dado que se tiene que ser un experto tanto en fases mitóticas como en defectos para poder diferenciarlos. Sin embargo, se considera necesario su estudio ya que nos podrían indicar tanto el tipo de agente genotóxico (clastogénico o aneugénico) como su posible mecanismo de acción.

Lesión nuclear

Las deformaciones nucleares se consideran como toda aquella forma “irregular” que el núcleo presente. Para ejemplificar este punto Salazar Mercado (2020) definió como lesiones nucleares a núcleos sin forma redonda que parecían tener protuberancias al estudiar el efecto de propanil en *Allium test*. Así mismo, Sabeen y su equipo (2020) estudiaron los efectos de varios metales en *Allium test* y definieron como lesión nuclear a núcleos con rasgaduras o roturas. Estos fueron los principales criterios que se tomaron para la identificación de lesiones nucleares.

Morais Leme (2008, 2009) enuncia que, dentro de esta clasificación, se pueden incluir células multinucleadas, células diminutas y células lobulares, en donde estas últimas no poseen una forma definida. Lo anterior es causado por una multipolaridad en la anafase ocasionada por un agente aneugénico, lo que ocasiona que el material genético se disperse y sea envuelto por la membrana nuclear de manera amorfa.

Materiales genotóxicos

Colchicina

La colchicina, es un fármaco antiinflamatorio utilizado principalmente para el tratamiento de ataques agudos de gota, pero también se puede utilizar para tratar la enfermedad de Behcet, condritis, síndrome del intestino irritable, estomatitis aftosa severa y pericarditis. (Kundu & Ray, 2017). De acuerdo con Eigsti & Dustin (1955, Capítulo 2) la colchicina es

un agente antimitótico, que provoca afectaciones en la metafase, y provoca la presencia de aberraciones cromosómicas.

La colchicina es utilizada como un agente aneuploidógeno, por lo que impide la formación del huso mitótico durante la mitosis, causando el rezago de los cromosomas (Raigosa M., 2002) y la posterior formación de defectos cromosómicos como micronúcleos y células polinucleadas (Serrano-Garcia, et. al., 2001).

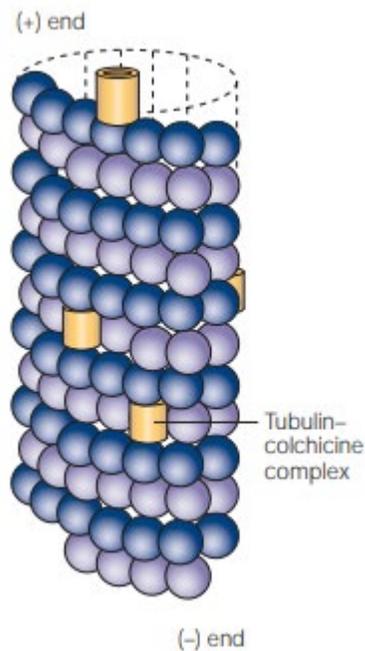


Figura 5. La colchicina forma un complejo con la tubulina y se copolimeriza en la red del microtúbulo, suprimiendo la dinámica del microtúbulo (Jordan & Wilson, 2004).

Dentro de la célula, la colchicina se puede enlazar con dímeros libres de tubulina, causando un bloqueo en la polimerización de los microtúbulos (véase fig. 5), la inhibición de procesos dependientes de los microtúbulos y alteraciones en el citoesqueleto (Slobodnick et al., 2018). La concentración de este fármaco es un factor determinante en cuanto a los efectos producidos; una baja concentración causa la detención de la polimerización de microtúbulos y en concentraciones altas causa la despolimerización de estos (Garcia, 2018). Así mismo, se ha demostrado que la colchicina puede detener el ciclo celular en metafase (Hastie, 1991).

Nanopartículas de plata

Uno de los nanomateriales más conocidos son las nanopartículas de plata, cuyas propiedades fisicoquímicas las hacen ideales para aplicaciones biológicas. Se ha encontrado que poseen propiedades antitumorales, antifúngicas, antivirales y antimicrobianas, en el caso de la última se ha encontrado efectividad para ambos tipos de bacterias Gram positiva o negativa (Cameron et al., 2018). La capacidad de las AgNPs para afectar a las células se puede atribuir a su tamaño, ya que dependiendo de este puede atravesar la membrana celular y en el interior de las células realizar la liberación de iones Ag^+ (McShan et al., 2014).

La internalización de las nanopartículas de plata se ha descrito como un comportamiento de caballo de Troya donde logran atravesar la membrana celular sin ser detenidos por la selectividad de la membrana e ingresan por mecanismos de difusión, endocitosis e incluso proteínas de membrana (Wang et al., 2013). Con las nanopartículas internalizadas, el daño celular está atribuido a la liberación de los iones plata, así como la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), este mecanismo puede observarse en la figura 6 (McShan et al., 2014).

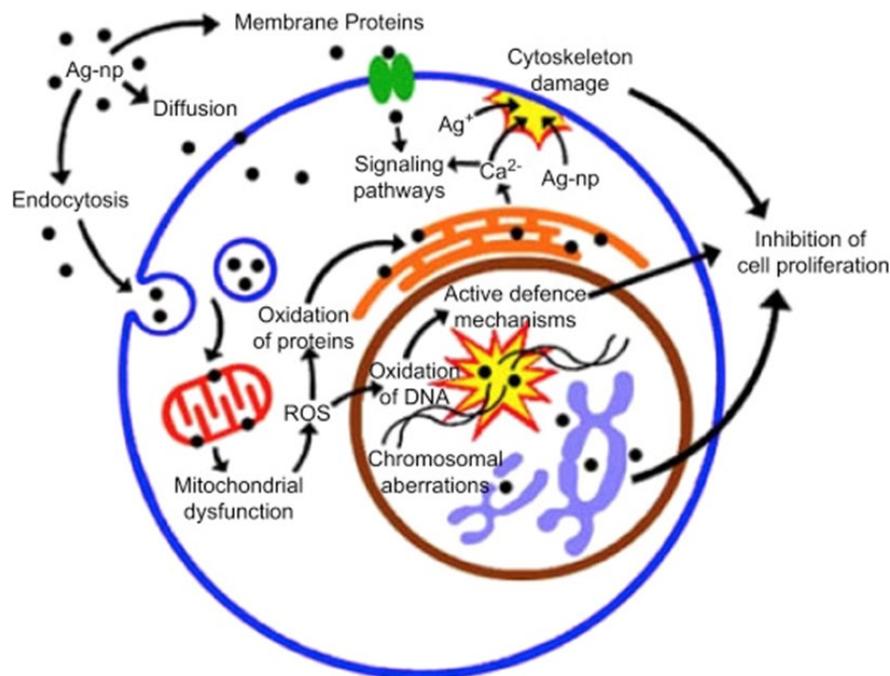


Figura 6. Vías de internalización de nanopartículas de plata y efectos en las células (McShan et al., 2014).

Existe una relación entre el tamaño de las nanopartículas y la cantidad de iones liberados, entre menor sea la nanopartícula más iones serán liberados debido a que la relación entre volumen y área superficial será mayor (McShan et al., 2014). Asimismo, se ha identificado que la carga y el recubrimiento de las nanopartículas van a influir en la cantidad de iones liberados. Otro factor que influye en la respuesta celular de las nanopartículas es la relación entre la cantidad de metal de la nanopartícula y la cantidad del recubrimiento (Cruz-Ramírez et al., 2021).

Entre los recubrimientos más comunes para nanopartículas de plata se encuentran biomoléculas como proteínas específicas (Valenzuela-Salas et al., 2021) o polímeros como la polietilenimina (PEI) o PVP (Auclair et al., 2019), esto con la finalidad de reducir su citotoxicidad o permitir una internalización más precisa.

Polivinilpirrolidona (PVP)

La polivinilpirrolidona (PVP) también conocida como povidona, es un polímero de origen sintético (Hiremath et al., 2019, Capítulo 8). Su polimerización puede realizarse en bulto, suspensión o solución, siendo esta última la más popular usando peróxido de hidrógeno como iniciador, cuya concentración es determinante para el peso molecular del polímero (Haaf et al., 1985). El peso molecular del PVP depende del grado de polimerización, el cual es expresado con un valor K que va de los 10 hasta 120. Las propiedades fisicoquímicas, así como la variedad de longitudes de las ramificaciones que tenga el polímero estarán relacionadas con el valor K (Hiremath et al., 2019, Capítulo 8).

La PVP cuenta con grupos funcionales hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que le permite ser soluble en agua y en una gran variedad de disolventes orgánicos. En cuanto a la forma se describe como una bobina o espiral la cual puede tener dimensiones de 1 hasta 100 nm dependiendo del peso molecular, esto es de importancia dependiendo de la aplicación que se le quiera dar (Haaf et al., 1985). Una de las aplicaciones donde es importante considerar el tamaño es como excipiente en varios medicamentos administrados por vía oral. En este caso se requiere un tamaño menor a 7 nm (diámetro de los capilares de riñones humanos) para que así pueda ser excretado por vía renal, por lo tanto, el PVP debe tener un valor K menor de 25 (Haaf et al., 1985).

Otros ejemplos de aplicaciones es su uso como expansor de plasma sanguíneo en pacientes con traumatismo, en forma de composito con yodo o povidona para uso

como desinfectante en material o telas quirúrgicas, en pleurodesis debido a su bajo costo y eficacia, y finalmente, como ayuda en la solubilización e inhibición de recristalización de fármacos en forma de jarabes o cápsulas de gelatina blanda (Kumbar et al., 2014, Capítulo 1).

En cuanto al uso del PVP en la síntesis de nanopartículas metálicas, se asocia como estabilizador y ayuda a controlar la forma en la síntesis de las nanopartículas. En el caso específico de las nanopartículas de plata, se ha encontrado que el uso de PVP determina la forma, siendo el valor de K y la concentración del polímero factores que modifican la forma desde cubos hasta octaedros (Koczur et al., 2015).

Objetivos

Generales

Determinar las condiciones de concentración y tiempo de exposición de *Allium cepa* a la colchicina para usarla como control positivo de daño genotóxico.

Evaluar el efecto genotóxico de las nanopartículas de plata con recubrimiento de polivinilpirrolidona mediante el uso del modelo de *Allium test*.

Específicos

- Determinar el índice mitótico y daño genotóxico (micronúcleos, puentes, yemas, aberraciones cromosómicas) en el modelo de *Allium cepa* para la colchicina en concentraciones de 1.25, 0.125, 0.0125 y 0.00125 mM a 4+20, 24, 4+68 y 72 horas de exposición.
- Realizar un ajuste matemático para determinar concentraciones y tiempos de exposición idóneos para tener índice mitótico alto y presencia de micronúcleos en el modelo de *Allium cepa* expuesta a colchicina.
- Determinar el índice mitótico y daño genotóxico (micronúcleos, puentes, yemas, aberraciones cromosómicas) en el modelo de *Allium cepa* para las AgNPs Argovit formulaciones 1 y 4 en concentraciones de 100, 75, 50, 25, 15, 10 y 5 µg/mL 72 horas continuas de exposición.
- Comparar el efecto genotóxico entre las dos formulaciones de AgNPs.
- Realizar mediciones de la cantidad y longitud de las raíces en los ensayos de colchicina y AgNPs para determinar el EC₅₀ para cada sustancia.

Hipótesis

El grado de polimerización del polivinilpirrolidona usado como recubrimiento de las nanopartículas de plata Argovit influirá en el índice mitótico y daño genotóxico ocasionado a las células de raíces de *Allium cepa*.

Metodología

Determinación de control positivo.

De acuerdo con lo analizado en la Tabla 1, se determinó utilizar las concentraciones de sugeridas por Nelson (1972), 1.25, 0.125 y 0.0125 mM; además, se agregó una concentración menor (0.00125 mM) para contar con cuatro concentraciones en escala logarítmica para tener un mejor panorama de cómo es el efecto de la colchicina en *Allium cepa*.

En cuanto al tiempo de exposición, se seleccionaron tiempos de 4 horas de exposición y 20 de recuperación en agua, así como 24 h continuas, con la finalidad de hacer comparables nuestros resultados con los observados en la literatura. Sin embargo, también se decidió evaluar a tiempo de 4+68 y 72 h continuas para, de esta forma, poder tener mismos tiempos de exposición cuando se coloque como control de las AgNPs, que son realizadas a 72 h (Tabla 2).

Crecimiento y cultivo de las cebollas

Las cebollas fueron obtenidas de un local comercial y se seleccionaron las que tenían un bulbo aproximado de entre 1-1.5 cm de diámetro, se cortaron las hojas y las raíces, para el caso de las raíces se cortaron lo más cercano al bulbo, pero sin dañar el primordio, se colocaron en tubos de ensayo y dependiendo el ensayo se dejaban crecer en agua o se sumergían en la solución a estudiar. Se colocaron 5 ejemplares por cada tratamiento.

Las cebollas fueron colocadas en la parte superior y posterior de un estante para su cultivo, esto para evitar la menor entrada de luz posible, cabe aclarar que este experimento se llevó a cabo en invierno, a temperatura de entre 20-22 °C, a nivel del mar y con un clima muy seco templado.

Montaje del ensayo

Se realizaron tres montajes de ensayos, dos de colchicina y uno de nanopartículas. El primero fue con concentraciones seleccionadas de colchicinas de 1.25, 0.125, 0.0125 y 0.00125 mM a tiempos de 4+20, 24, 4+68 y 72 h. Luego se determinaron otras concentraciones de colchicina a evaluar para el segundo ensayo a 0.05 mM a 72 h y de

0.48 mM a 4+68h. En estos dos ensayos se utilizó únicamente agua destilada como control negativo. Cabe aclarar que las muestras de 24 h fueron previamente cultivadas en agua destilada durante 24 h y posteriormente se les colocó el estímulo.

Finalmente, el tercer ensayo se realizó con las nanopartículas de plata. Se realizó con las formulaciones 1 y 4 de nanopartículas de plata Argovit a concentraciones finales de 5, 10, 15 ,25, 50, 75, y 100 µg/mL (considerando el contenido de plata metálica). De acuerdo con Cruz-Ramírez y colaboradores (2021), estas nanopartículas poseen un diámetro promedio de 16.4 ± 8.0 nm y de 16.4 ± 8.1 nm, para las formulaciones 1 y 4 respectivamente. En cuanto al contenido de plata, se tiene 1.14 ± 0.02 y 1.19 ± 0.01 (%w/w), y el contenido de PVP 19.62 ± 0.3 y 20.92 ± 0.42 (%w/w), respectivamente. Las propiedades fisicoquímicas son muy similares como se observa en la tabla 3, sin embargo, la principal diferencia radica en el tipo de PVP utilizado, para generar la formulación 1 se utilizó PVP K-15, mientras que para la formulación 4 fue PVP K-30.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de AgNP1 y AgNP4 (Cruz-Ramírez et al., 2021).

Propiedades	AgNP1	AgNP4
Diámetro promedio (nm)	16.4 ± 8.0	16.4 ± 8.1
Distribución de tamaños en TEM (nm)	5-40	5-40
PVP	K-15	K-30
Diámetro hidrodinámico $\varnothing_{\text{hydro}}$ (nm)	448.7	483.2
Índice de polidispersión (PDI)	0.813	0.555
Potencial zeta ζ (mV)	-0.872	-0.464
Plasmón de resonancia de superficie (λ)	415	406, 549
Análisis TGA		
Ag metálica (%w/w)	1.14 ± 0.02	1.19 ± 0.01
PVP (%w/w)	19.62 ± 0.30	20.92 ± 0.42
H ₂ O (% w/w)	79.24 ± 0.45	77.89 ± 0.80
Morfología	Esférica	Mayormente esférica

Así mismo, se pusieron como controles positivos de PVP K-15 con concentración de 1721 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el caso de la AgNP 1 y de PVP K-30 a 1758 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la AgNP 2. Estas concentraciones fueron determinadas con base a la cantidad de PVP contenida en la respectiva nanopartícula. Además, se utilizó otro control positivo con AgNO_3 a una concentración de plata igual a la concentración más alta de AgNPs evaluada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cabe destacar que para este ensayo se utilizó como controles positivos (C+) colchicina a 0.125 mM en 4+68 h, (C++) colchicina a 0.00125 en 72 h y como control negativo (C-) agua destilada.

Adicionalmente, se realizaron dos concentraciones extras de colchicina de 0.05 y 0.0005 mM a 72 h continuas, y una concentración de 0.05 mM con una exposición de 4 h más 68 h de recuperación, con el fin de encontrar una condición que se ajustara más a nuestros fines.

Medición de cantidad y longitud de raíces

Para la medición de las raíces, se contó el número de raíces y se determinó la longitud de estas cada 24 h al igual que su longitud, la cual fue medida mediante el uso de un vernier. Las mediciones fueron realizadas por dos personas con la finalidad de reducir el sesgo en la medición.

Ensayo de inhibición de crecimiento de raíces

Pasadas 72h, las raíces se midieron tanto de los controles de colchicina como la de las nanopartículas para determinar el EC_{50} , en donde se consideró el valor de EC_{50} a la concentración que retiene el crecimiento un 50% comparado con la longitud de las raíces del C-.

Fijación y congelamiento

Una vez pasados los tiempos de exposición, se procede a fijar las raíces. Para el procedimiento de fijación, se cortaron las puntas de las raíces con una longitud aproximada de entre 3 a 5 milímetros, posteriormente se sumergieron las raíces en una solución de ácido acético-metanol 3:1 previamente preparada con la finalidad de detener el proceso de división celular y se guardó por 12 h en el congelador a 4°C.

Pasado el tiempo establecido se trasvasaron las raíces a tubos eppendorf que contenían 500 µL de metanol al 70% y se colocaron en el congelador con una temperatura 4 °C, donde se quedaron almacenadas hasta su tinción y observación.

Tinción

Primeramente, se colocaron en un vidrio de reloj y se lavaron las raíces con un poco de agua destilada para rehidratarlas. Posteriormente se colocaron por 10 minutos para hidrolizar la pared celular en HCl 5M previamente calentado en baño maría. Una vez pasado el tiempo, se lavaron las raíces en agua destilada para retirar el exceso de HCl.

Luego se agregó orceína acética al 2% para teñir el material genético y se dejó reposar por 20 minutos, acto seguido, se lavaron las raíces con ácido acético al 45% (v/v) y se eliminó el excedente con papel secante. Posteriormente, se agregó el colorante verde rápido para teñir las paredes primarias vegetales. Pasados 20 min se lavó nuevamente con ácido acético al 45% (v/v).

Conteo

Para el conteo se colocaron las raíces teñidas en un portaobjeto y se colocó una gota de ácido acético al 45% (v/v), se colocó el cubreobjetos y se hizo un aplastamiento y extendido de la raíz. Se contaron 1000 células por cada raíz (una raíz por cada cebolla) y se identificaron las distintas fases celulares, así como defectos nucleares como son *yemas*, aberraciones cromosómicas, micronúcleos, puentes y deformaciones nucleares. Finalmente, se calculó el índice mitótico y el porcentaje de daño al material genético de cada una de las muestras.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó una base de datos en el software IBM SPSS Statistics 26, en donde se calculó el índice mitótico (IM) y el porcentaje de daño al material genético mediante las siguientes fórmulas:

$$IM = \frac{profase + metafase + anafase + telofase}{No. cel.} \times 100$$

$$\% \text{ de daño} = \frac{\text{yemas} + \text{puentes} + \text{defectos cromosómicos} + \text{lesiones nucleares}}{\text{No. cel.}} \times 100$$

Ambas fórmulas fueron obtenidas con base en el trabajo publicado por Aydın & Liman (2020) para la evaluación de células de raíces de cebollas.

Una vez teniendo la base de datos completa, se eligieron 3 de los 5 ensayos para tener un ensayo por triplicado más homogéneo, esto se realizó con el fin de disminuir la varianza entre los datos.

Este análisis primero fue realizado para determinar el control positivo con colchicina, luego con las concentraciones de colchicina seleccionadas, se procedió a montar el ensayo con nanopartículas.

En cuanto a el análisis de significancia, primero se comprobó una distribución normal de los datos, para posteriormente aplicar una prueba Anova de una vía, y luego como análisis post-hoc, se aplicó la prueba de Tukey, para determinar la significancia entre los tratamientos y controles.

Microscopía de fluorescencia

Debido a observaciones realizadas en las concentraciones más altas, se determinó realizar observaciones con naranja de acridina como tinción para observar las células en microscopia de fluorescencia excitando el fluoroforo a una longitud de onda de 470 nm, con la finalidad de descartar que las observaciones de puntos negro son resultado de la tinción de orceína acética y verde rápido.

Rayos X

Se realizó una placa de rayos X a las muestras teniendo como control negativo una cebolla cultivada en agua con la finalidad de determinar si las nanopartículas presentaban bioacumulación en alguna zona de la cebolla. Este análisis se llevó a cabo con la ayuda de Gerardo Cerda González en el Centro de Diagnóstico Radiológico de Ensenada.

Resultados

Ensayos con colchicina

Parámetros macroscópicos

Las raíces se contaron y midieron cada 24 h hasta cumplir el tiempo de tratamiento con las concentraciones evaluadas (1.25, 0.125, 0.0125 y 0.00125 mM). De forma macroscópica, las raíces de todas las concentraciones de colchicina sometidas a 24 h de exposición presentaban una apariencia normal como se observa en la figura 7, es decir, coloraciones y una flexibilidad similar a la que tienen al crecer en el control negativo.

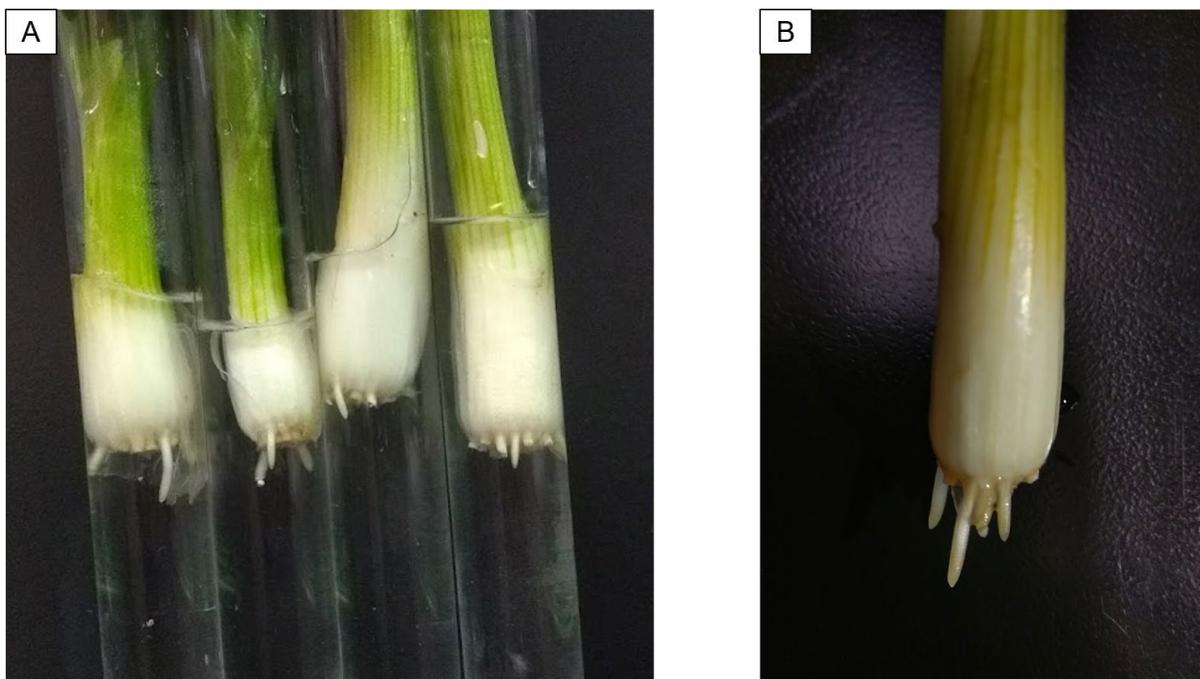


Figura 7. Cebollas expuestas por 24 h a una concentración de colchicina 0.0125 mM. **A)** Cebollas en los tubos de ensayo y **B)** acercamiento para identificar las condiciones de las raíces.

Sin embargo, en el caso de las cebollas expuestas por 72 horas sin recuperación, comenzaron a presentar protuberancias en las raíces a partir de las 48 h de exposición. Entre mayor la dosis de colchicina, eran más notorios y frecuentes encontrar las protuberancias, las raíces presentan formación de tumor-c según la clasificación de la

European Commission, Joint Research Centre (JRC) (2019). Asimismo, en cuanto al bulbo se observó una ligera consistencia mucilaginosa y desprendimiento de las capas más externas del bulbo, como se puede apreciar en la figura 8.

El tumor-c es producido por el cambio en la dirección de crecimiento de las células al estar en contacto con colchicina. En lugar de crecer en la dirección longitudinal, las células comienzan a crecer en todas las direcciones, generando un redondeamiento de las raíces. Hay un cambio en la morfología de las células, pero no en el número de estas (Östergren, 1944).

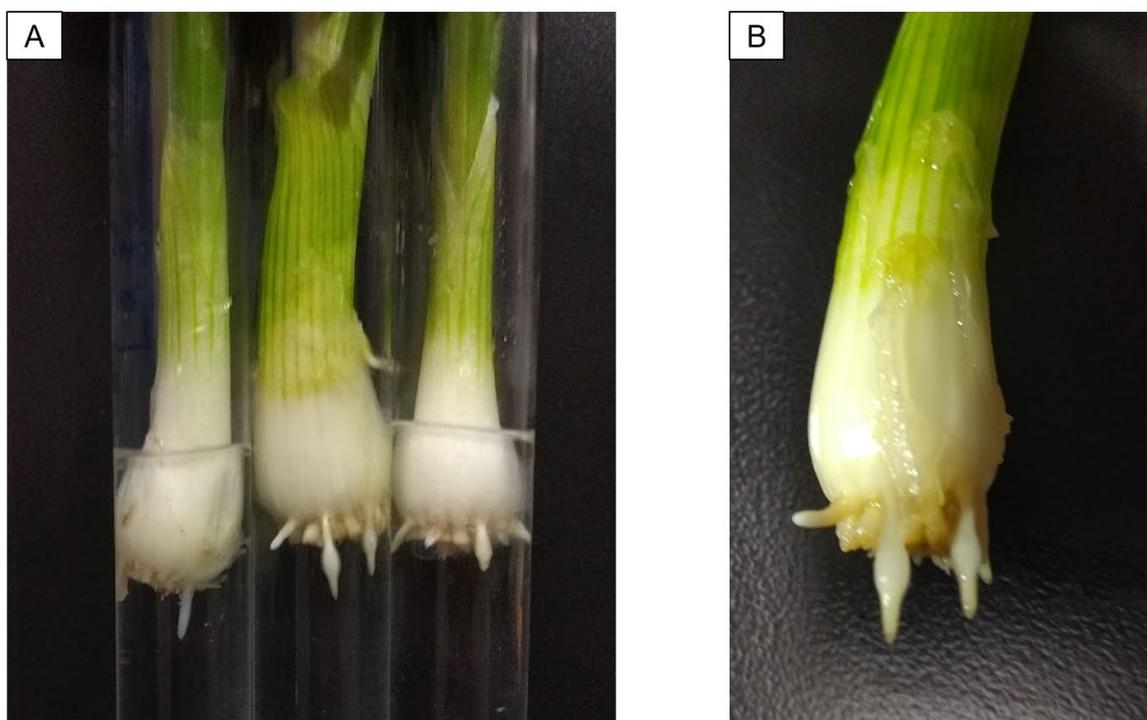


Figura 8. Cebollas expuestas por 48 h a una concentración de colchicina 0.125 mM. **A)** Cebollas en los tubos de ensayo y **B)** acercamiento para identificar los defectos de las raíces.

En cuanto a las cebollas expuestas a colchicina a 0.00125 mM por 4 h con 68 h de recuperación, algunas llegaron a presentar un aspecto ligeramente mucilaginoso y desprendimiento de capa apreciable en la figura 9 (señalados con la flecha roja). Sin embargo, solo algunas raíces de la concentración más alta (1.25 mM) presentaron una ligera deformación. Cabe aclarar que entre mayor fue la concentración de colchicina, la rigidez de la raíz también aumentaba.

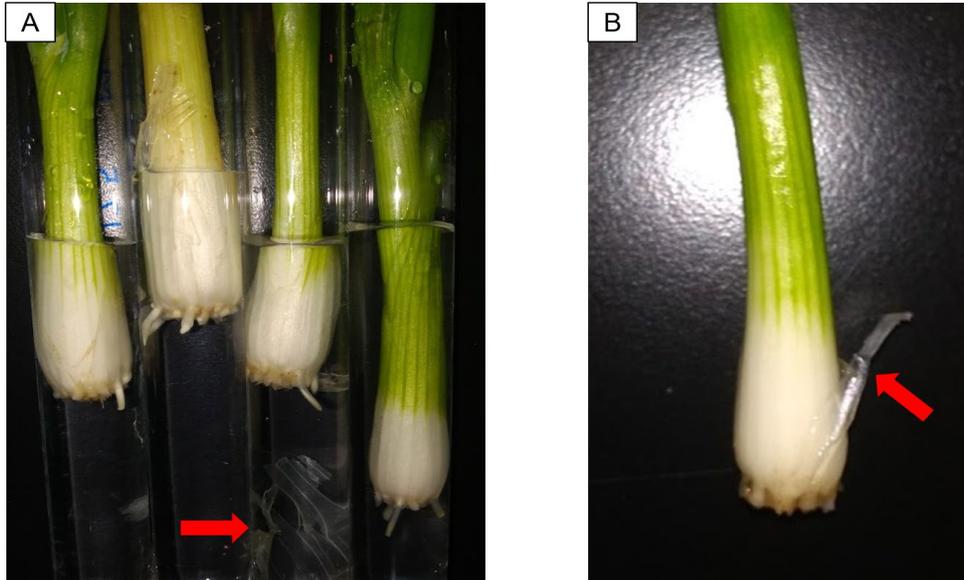


Figura 9. Cebollas expuestas por 4 h con 68 h de recuperación a una concentración de colchicina 0.00125 mM. Las flechas señalan los desprendimientos de capa en las **A)** cebollas en los tubos de ensayo y **B)** acercamiento para identificar el desprendimiento de las capas.

Por otro lado, a partir de la cuantificación y medición de las raíces de cada tratamiento, se obtuvo el valor promedio, así como su respectiva desviación estándar. En la figura 10 se observan los resultados para tratamiento de 24 horas, con una línea punteada roja se hace referencia a los resultados obtenidos con el control de agua destilada.

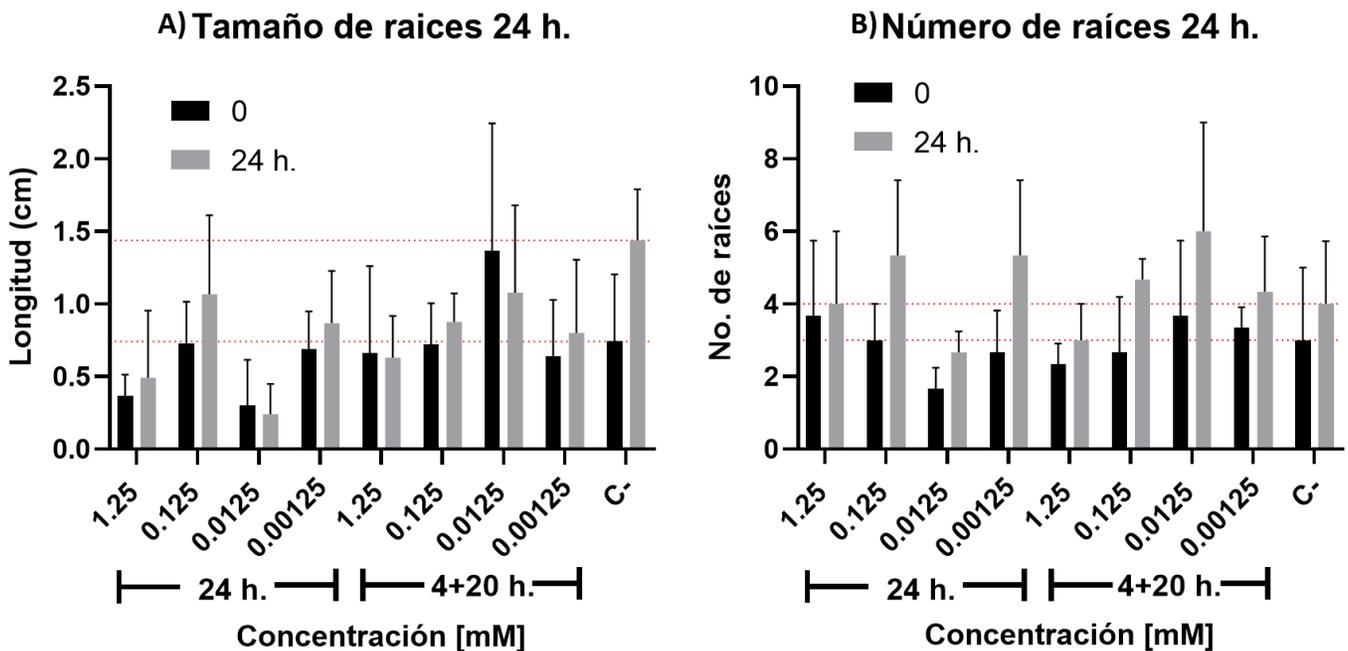


Figura 10. Gráficas que expresan la **A)** longitud y **B)** número de raíces 24 h de exposición.

Como se puede observar en los gráficos anteriores, en los ensayos a 24 h de exposición, todas las muestras presentaron un crecimiento menor en cuanto a longitud promedio comparado con el control negativo (Figura 10 A). Por otra parte, las concentraciones de 0.125 y 0.00125 mM tanto en exposición continua como aguda presentaron un mayor número de raíces, al igual que la concentración de 0.0125 con exposición aguda, la cual presentó el mayor número de raíces, 6 en promedio (Figura 10B).

De manera similar se obtuvieron los datos de las cebollas expuestas por 72 h continuas y 4 mas 68 horas de recuperación, donde las mediciones se llevaron a cabo cada 24 horas como se observa en la figura 11.

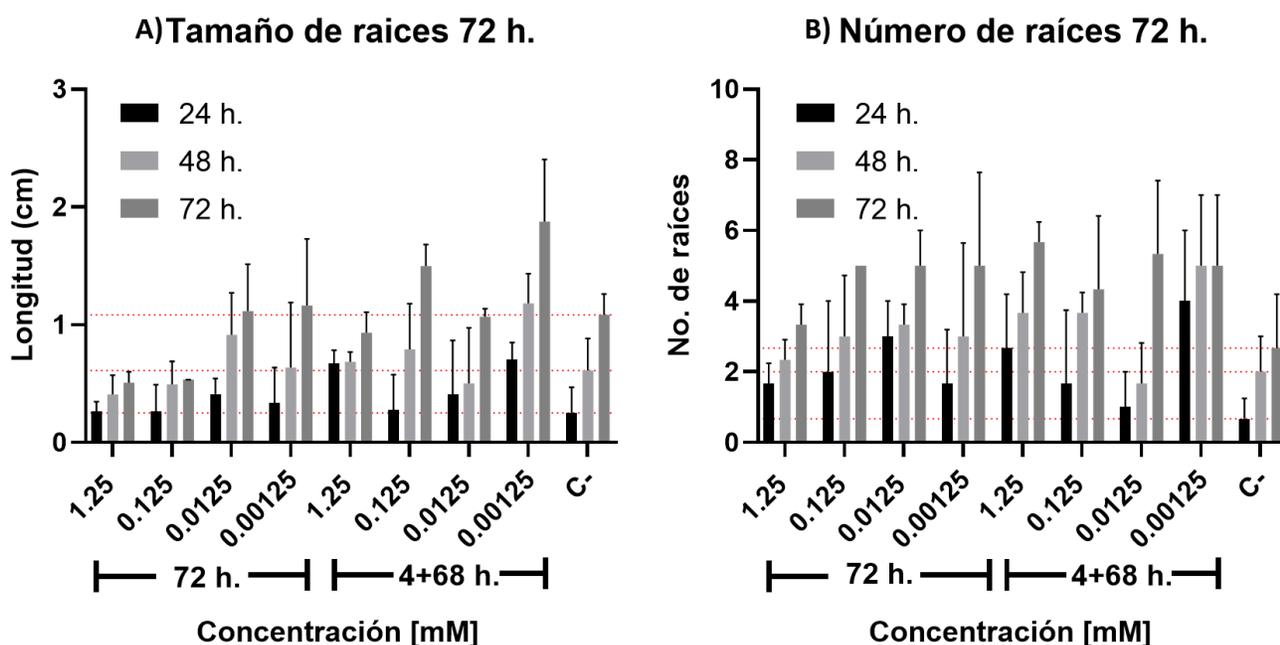


Figura 11. Gráficas que expresan la **A)** longitud y **B)** número de raíces 72 h de exposición.

Es de mencionar que en las primeras 24 horas de los ensayos a 72 h, las concentraciones 1.25 y 0.00125 mM de exposición aguda obtuvieron una longitud de más del doble respecto al C-, mientras que las otras concentraciones, independientemente del tiempo de exposición, tuvieron una longitud ligeramente mayor

promedio con respecto al C- (Barras negras, Figura 11A). Para la segunda medición (48h), nuevamente las concentraciones 1.25, 0.125 y 0.00125 mM de exposición aguda presentan una longitud promedio mayor que el control, de igual manera las concentraciones 0.0125 y 0.00125 mM de exposición continua (Barras gris claro, Figura 11A). En la última medición (72 h, barra gris oscuro, figura 11A), las concentraciones s 1.25 y 0.00125 mM de exposición aguda, como también las concentraciones 0.0125 y 0.00125 mM con exposición continua mostraron longitudes mayores al control.

La tendencia en la longitud de las raíces de cebolla expuestas a diferentes concentraciones de colchicina con un periodo de recuperación, nos podrían indicar la presencia de un comportamiento de hormesis, la cual es una propiedad de los fármacos que nos indica que a bajas concentraciones se encuentra una efecto beneficioso (crecimiento de raíces) y a altas concentraciones un efecto dañino, esto se puede observar en la figura 11, en donde se aprecia que a bajas concentraciones hay una estimulación del crecimiento de las raíces e incluso la concentración de 0.125 mM obtuvo un IM mayor al C-, por lo que no solo hubo estimulación del crecimiento de la raíz, sino también una mayor proliferación celular, confirmando dicho comportamiento.

Por otra parte, en el primer conteo de raíces (24 h) se encontró que en todas las concentraciones de colchicina se presentaba una mayor cantidad de raíces que en el control negativo (Figura 11B). En la segunda medición (48 h) solamente las concentraciones de 1.25 mM de exposición continua y 0.0125 mM en exposición aguda tuvieron una cantidad menor de raíces respecto al promedio (Figura 11D, barra gris claro). Finalmente, después de 72 h de exposición, se observó que la concentración de 1.25 mM en exposición aguda fue la única con valores menores al control (Figura 11 B, barra gris oscuro). Además, la concentración de 0.125 mM en exposición aguda tuvo la misma cantidad de raíces que el control.

Una vez medidas las raíces de todas las muestras a 72h, se procedió a graficar la concentración contra el porcentaje de crecimiento para determinar el EC₅₀ de cada compuesto evaluado, como se muestra en la siguiente figura:

EC₅₀ de colchicina exposición continua y con recuperación

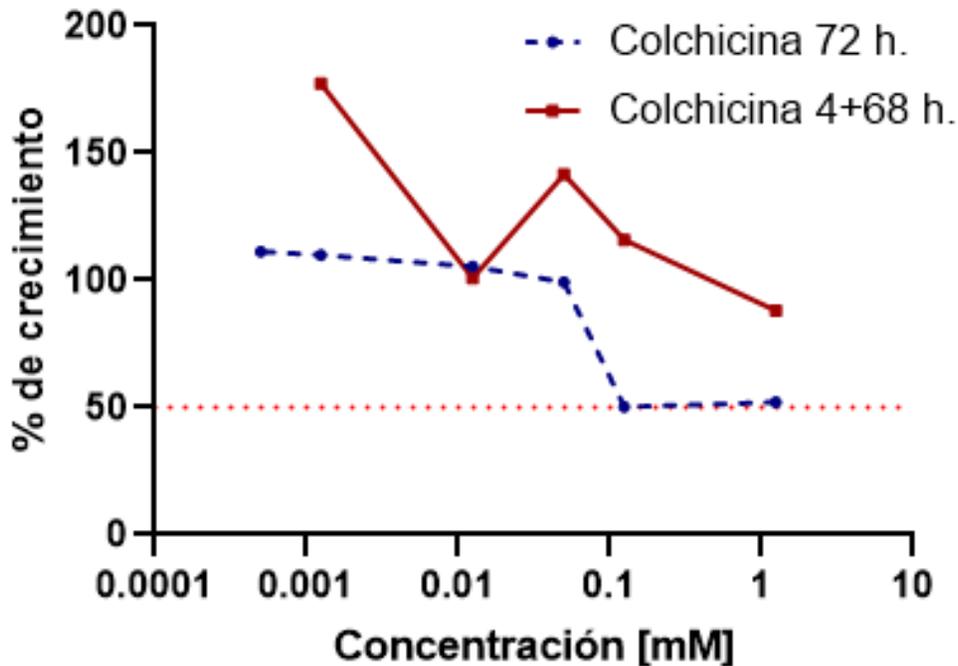
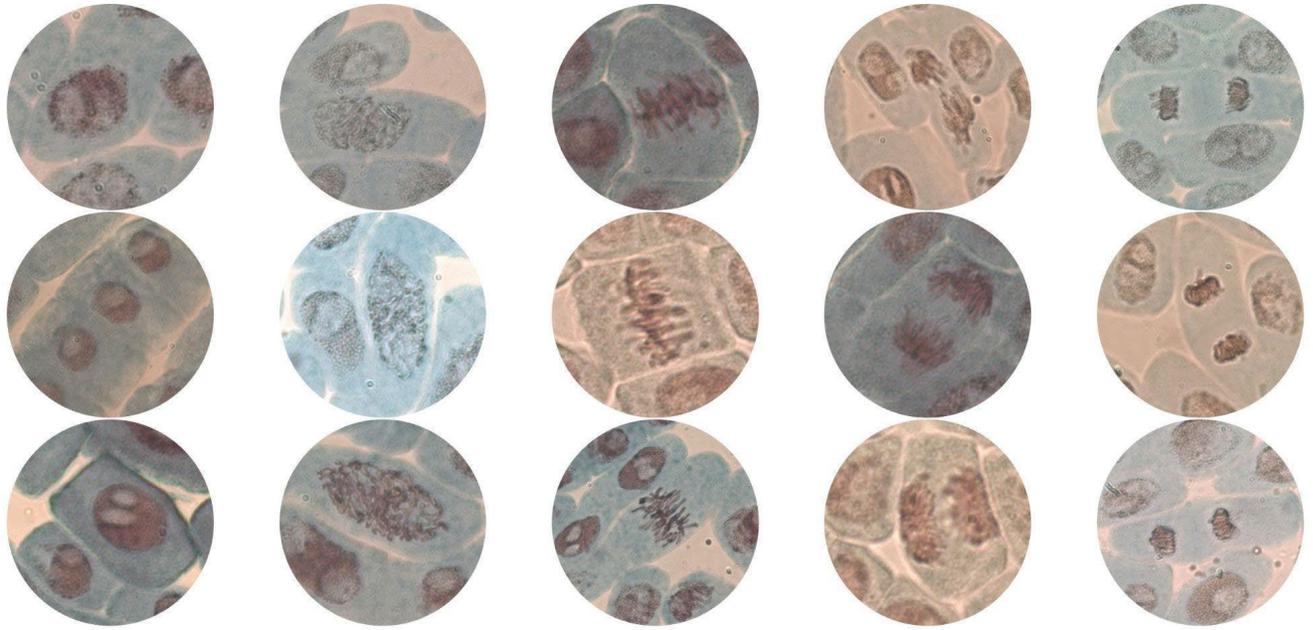


Figura 12. EC₅₀ de colchicina después de 72 h de exposición y después de 4 h de exposición con 68 h de recuperación. La línea roja punteada indica el 50% de crecimiento.

Como se puede apreciar en la figura 11, el EC₅₀ de colchicina con una exposición continua se encuentra en 0.125 mM con 50.33% de inhibición. Por otro lado, los datos obtenidos de las muestras de colchicina con exposición aguda no fueron suficientes como para poder identificar una concentración que produzca la inhibición de crecimiento en un 50%.

Parámetros microscópicos

Con base en lo observado en el microscopio, se identificaron las fases del ciclo celular y las aberraciones cromosómicas, como se muestra en la figura 12. Dicha figura muestra también el criterio tomado para la cuantificación de las fases celulares.



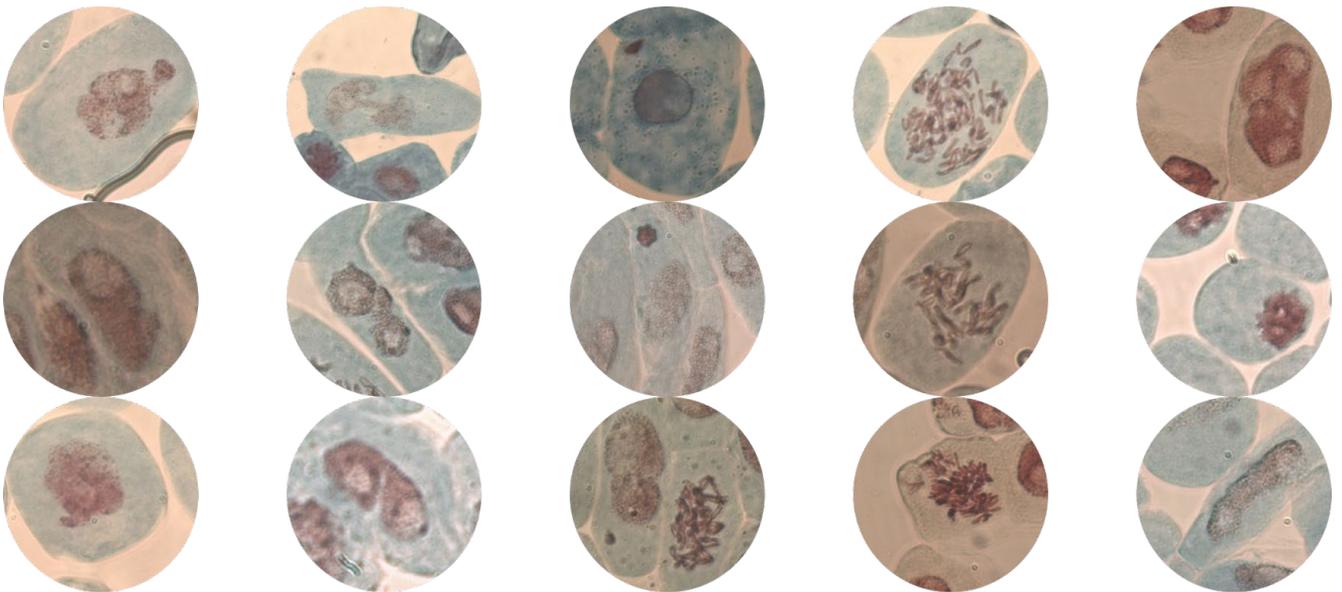
Interfase

Profase

Metafase

Anafase

Telofase



Yemas

Puente núcleo-plasmáticos

Micronúcleos

Defectos cromosómicos

Lesiones Nucleares

Figura 13. Ejemplificación de las fases del ciclo celular y aberraciones cromosómicas.

Una vez teniendo un criterio de identificación de fases celulares y de aberraciones cromosómicas, se procedió a contar 1000 células. Utilizando las fórmulas previamente estipuladas, se procedió a calcular el I.M. (tabla 4) y el porcentaje de daño (tabla 5) de las muestras de colchicina en exposición continua y aguda con y sin tiempo de recuperación.

Tabla 4. Índice mitótico en *Allium cepa* con una exposición continua de colchicina de 72 y 24 horas y una exposición de 4 horas con un tiempo de recuperación de 68 y 20 horas.

Concen- tración	Tiempo					
	72 h	24 h	4 +68 h	4 +20 h	Control 72 h	Control 24 h
1.25 uM	0.86 ± 0.32	1.36 ± 0.45	0.83 ± 0.25	2.73 ± 1.88	-	-
0.125 uM	1.1 ± 0.34	1.7 ± 0.91	5.83 ± 0.77	1.77 ± 1.10	-	-
0.0125 uM	3.93 ± 0.50	3.86 ± 2.06	3.9 ± 1.13	5.17 ± 4.02	-	-
0.00125 uM	4 ± 0.3	3.33 ± 1.58	3.86 ± 2.06	1.40 ± 1.39	-	-
0	-	-	-	-	6.2	5.83 ± 1

Tabla 5. Porcentaje de daño en *Allium cepa* con una exposición continua de colchicina de 72 y 24 horas y una exposición de 4 horas con un tiempo de recuperación de 68 y 20 horas.

Concen- tración	Tiempo					
	72 h	24 h	4 +68 h	4 +20 h	Control 72 h	Control 24 h
1.25 uM	15.93 ± 4.49	3.5 ± 0.72	6.8 ± 3.11	7.90 ± 7.2	-	-
0.125 uM	8.4 ± 1.04	8.76 ± 2.13	2.7 ± 0.86	3.60 ± 2.30	-	-
0.0125 uM	1.06 ± 0.40	2.83 ± 2.34	1.43 ± 0.37	2.37 ± 0.45	-	-
0.00125 uM	1.3 ± 0.7	1.56 ± 0.35	1.73 ± 0.77	3.33 ± 0.85	-	-
0	-	-	-	-	0.7 ± 0.1	0.83 ± 0.35

Con dichos datos se elaboraron gráficas para una comparación más visual de las características de este ensayo con colchicina como se ve en la figura 14.

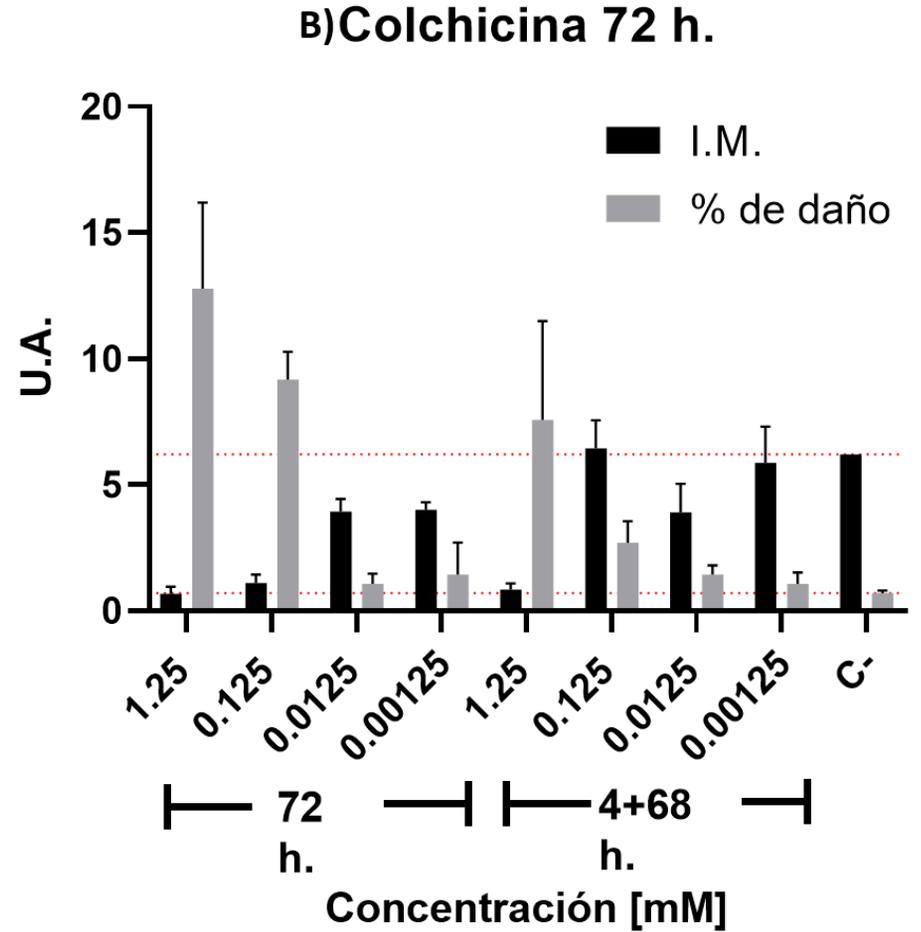
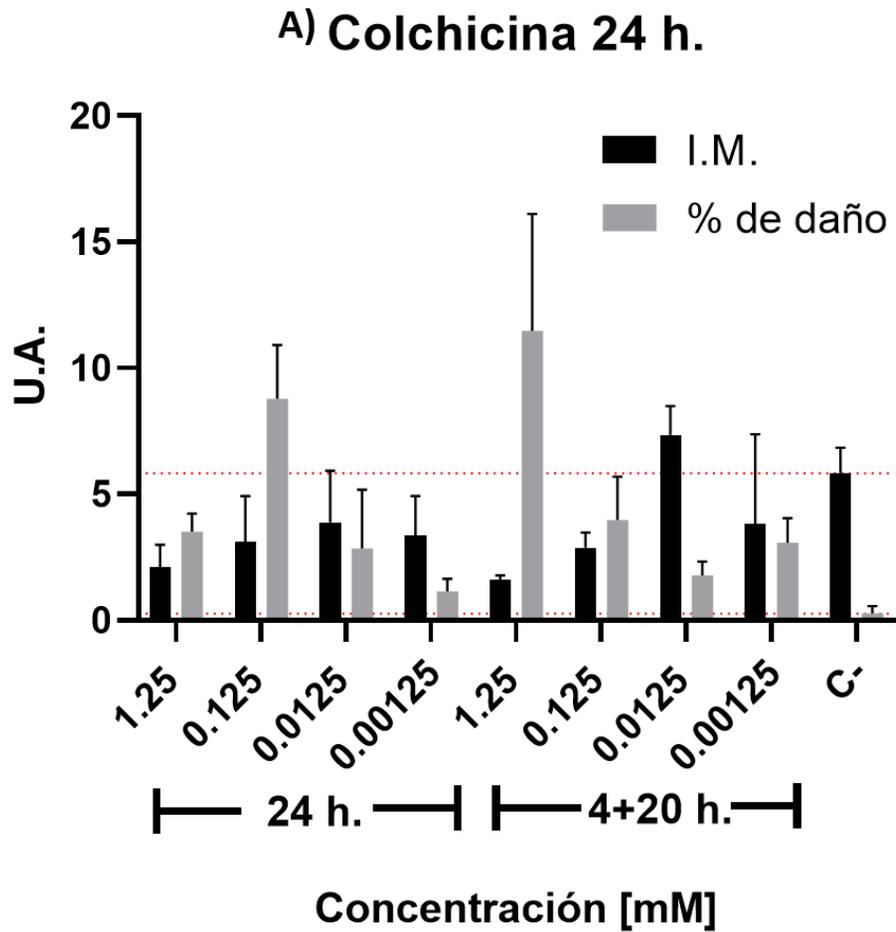


Figura 14. Índice mitótico y porcentaje de daño de muestras expuestas a diferentes concentraciones de colchicina por **A)** 24 y **B)** 72 h con y sin recuperación.

Asimismo, se desglosó la cantidad de células encontradas en cada una de las fases mitóticas como se muestra en la figura 15 para 24 horas de exposición continua y con recuperación y en la figura 16 para 72 horas continuas y con recuperación.

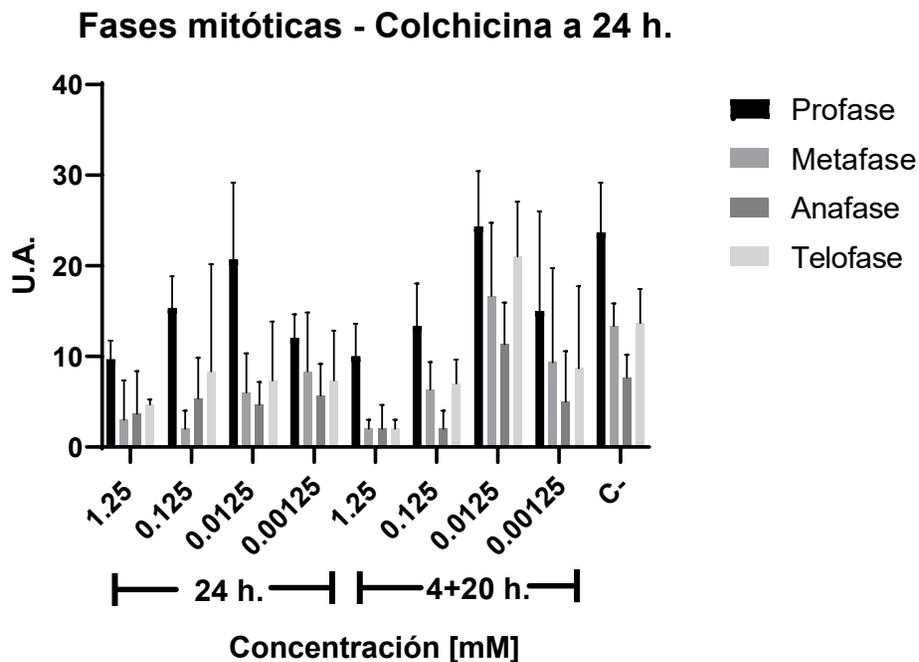


Figura 15. Células en cada fase mitóticas en *Allium cepa* expuestas a colchicina por 24 horas continuas, y 4 horas de exposición más 20 de recuperación.

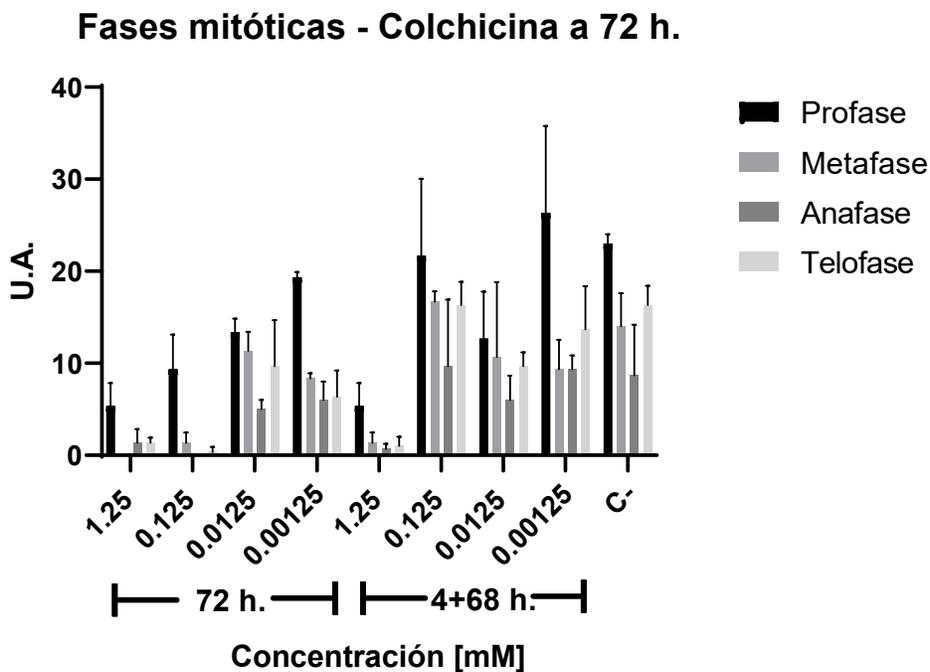


Figura 16. Células en cada fase mitóticas en *Allium cepa* expuestas a colchicina por 72 horas continuas, y 4 horas de exposición más 68 de recuperación.

Podemos observar que para todos los casos de exposición a colchicina se observa que la mayoría de las células se encuentran en profase; mientras que la anafase es la menos frecuente.

Asimismo, es de destacar que, en concentraciones bajas de colchicina, independientemente de los tiempos de exposición, se observa una mayor frecuencia de células en profase respecto al control negativo con agua.

Por su parte también se desglosan los diferentes tipos de daños que se generaron para tiempos de exposición de 24 horas continuas y con recuperación en la figura 17, así como a 72 horas continuas y con recuperación en la figura 18.

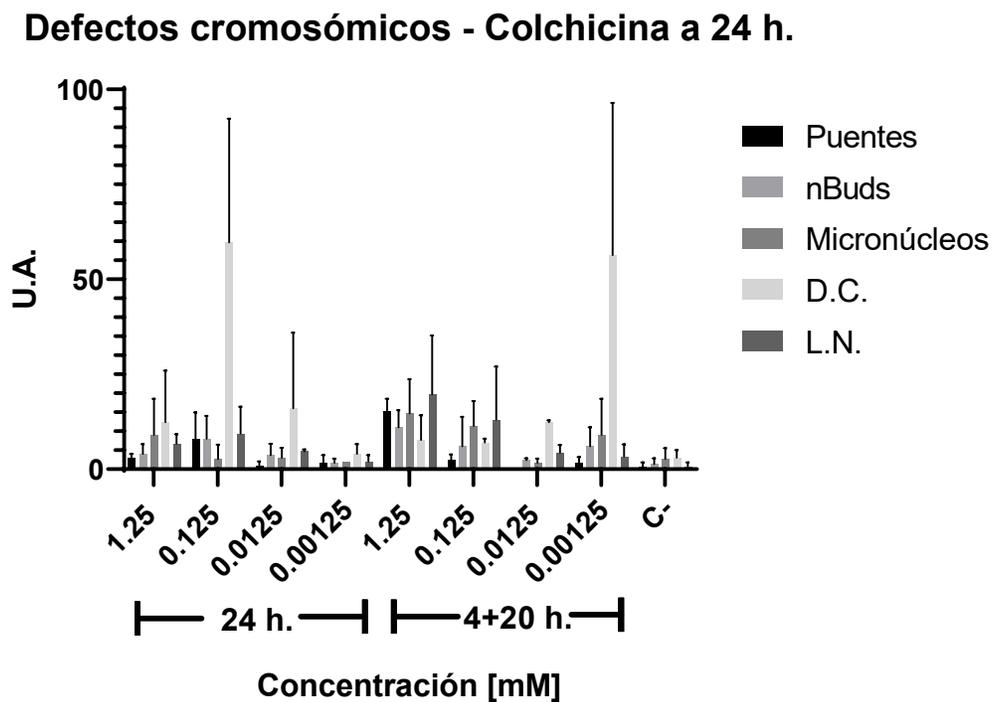


Figura 17. Porcentajes de defectos cromosómicos presentados en *Allium cepa* expuestas a colchicina por 24 horas continuas y 4 horas de exposición y 20 de recuperación.

Defectos cromosómicos - Colchicina 72 h.

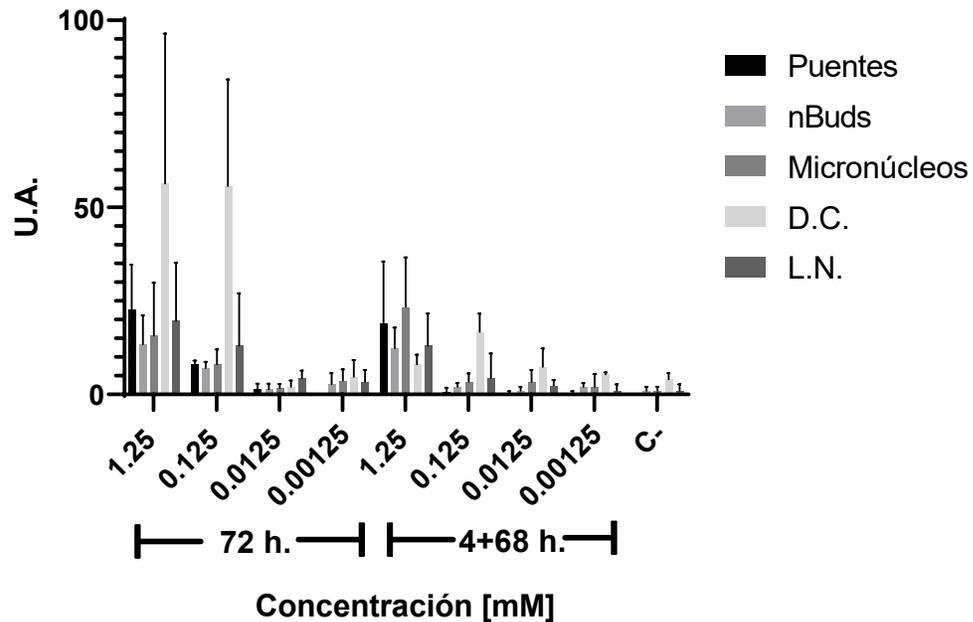


Figura 18. Porcentajes de defectos cromosómicos presentados en *Allium cepa* expuestas a colchicina por 72 horas continuas y 4 horas de exposición y 68 de recuperación.

Puede apreciarse que el defecto más frecuente han sido las deformaciones nucleares (D.C.) donde estas predominan en concentraciones altas para exposiciones prolongadas de 72 horas. En el caso de tiempos con recuperación ya sea de 4+20 o de 4+68, es evidente que para la concentración más alta se elevó de manera notoria la cantidad de puentes presentes y de micronúcleos. Asimismo, es de notar que aún en el control con agua se puede llegar a generar una muy pequeña cantidad de defectos.

Para determinar la influencia de la concentración y el tiempo de exposición en el índice mitótico, así como la cantidad de micronúcleos y el porcentaje de daño presente, se realizó una evaluación estadística con una prueba Anova de dos vías. Los valores de la significancia estadística de los resultados observados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Valores de significancia de prueba Anova de dos vías con los parámetros evaluados de concentración y tiempo en el conteo de células, los tratamientos fueron de 1.25, 0.125, 0.0125 y 0.00125mM a exposición de 24 y 72 h continuas y 4 de exposición más 20 o 68 h de recuperación.

	I.M.	Micronúcleos	% de daño
Concentración	.000*	.000*	.000*
Tiempo	.061	.737	.089
Concentración X Tiempo	.011*	.702	.242

*Considerando $p < 0.05$

Como se puede observar en la tabla 3, la concentración de colchicina tiene una significación mucho menor a 0.05, por lo que se determina que el índice mitótico y cualquier defecto tiene una relación directa con las diferentes concentraciones evaluadas. De manera similar el índice mitótico se encuentra relacionado con la combinación de los factores de concentración y tiempo. Sin embargo, es necesario recalcar que el tiempo no tiene relación con ninguno de los parámetros medidos (índice mitótico, micronúcleos, porcentaje de daño), lo cual es un indicativo de que la exposición aguda o continua a la colchicina tiene los mismos efectos.

En el caso de los ensayos con colchicina, con los datos obtenidos se realizaron funciones de ajuste (polinomial de grado 2) y se encontró que los puntos en donde se encontraba el mayor índice mitótico y la mayor cantidad de micronúcleos son 0.05 mM para el caso de la exposición crónica y de 0.48 mM para la exposición aguda a 72 h. Sin embargo, de acuerdo con lo observado, se tiene la hipótesis que una concentración menor a 0.00125 mM en exposición crónica a 72 h, podría representar un mayor índice mitótico y una mayor cantidad de micronúcleos. Por lo tanto, se realizó otro ensayo con concentraciones de 0.05 y 0.0005 en exposición crónica y 0.5 en exposición aguda; contrario a lo esperado no presentaron mejores resultados que las concentraciones inicialmente evaluadas.

Con base en los datos anteriores, se propone utilizar la concentración 0.125 mM a 4 h + 68 h (C++) o exposición continua a 0.00125 mM por 72 h (C+) debido a que son las que presentan un porcentaje de daño considerablemente mayor al control y no presentan una inhibición tan drástica en el índice mitótico. Además, al ser ensayos de 72 h, es más favorable para la comparación con los ensayos de nanopartículas.

Ensayos con AgNPs

Parámetros macroscópicos

En los ensayos con nanopartículas se utilizaron al PVP y al AgNO_3 como controles, por lo que su apariencia también será descrita para funcionar como punto de comparación.

Polivinilpirrolidona (PVP)

Las raíces de las cebollas expuestas a PVP (K-15 y K-30) se observó que presentaban una rigidez notable y, por ende, eran frágiles al manipularlas. Sin embargo, tenían una apariencia visual normal, ya que no presentaban deformaciones de ningún tipo como puede observarse en la figura 19.



Figura 19. Cebollas expuestas a PVP K-15 por **A)** 24, **B)** 48 y **C)** 72 horas, así como a PVP K-30 a **D)** 24, **E)** 48 y **F)** 72 horas.

Asimismo, cabe destacar que no se observaron otro tipo de cambios en el bulbo o en las hojas de la cebolla, por lo que por parámetros macroscópicos las afectaciones solo son a nivel de raíz.

Nitrato de plata (AgNO_3)

El cambio de las cebollas a lo largo de 72 horas expuestas al nitrato de plata puede observarse en la figura 20. Con este control las raíces no presentaron deformaciones ni cambios en la textura de la raíz; en cuanto al color se mantuvo igual que el control con agua a excepción de una raíz que comenzó a tomar un ligero color café hacia las 48 h de exposición.



Figura 20. Cebollas expuestas a AgNO_3 por **A)**24, **B)** 48 y **C)**72 h.

En cuanto a los bulbos se observó un ligero desprendimiento de capas en la mayoría de las cebollas durante las primeras 24 h de exposición, sin embargo, en observaciones posteriores no se notó esta afectación.

AgNP1

En el caso de la formulación 1 de AgNPs, se encontraron diferencias notables dependientes de la concentración en los parámetros macroscópicos. En las 4 concentraciones más bajas (5,10,15,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentaron una apariencia casi similar al control con agua tanto en las raíces como en el bulbo, como se aprecia en la figura 21. Las raíces presentaban en su mayoría coloración blanquecina y una turgencia similar a la del agua, sin embargo, se volvían ligeramente más frágiles entre mayor la concentración. En cuanto al bulbo, algunas cebollas presentaron ligero desprendimiento de las capas externas a partir de las 48 h de exposición y en contados casos una

aparición mucilaginosa tras pasar las 72 h de exposición. A pesar de ello, mantenían un color blanco y el tallo verde crecía con normalidad.



Figura 21. Cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de **A)25, B) 15 C)10 y D) 5** µg/mL.

En contraste encontramos diferencias notables con las concentraciones mayores de 50 µg/mL, las cuales pueden ser observadas en la figura 22. Ahí se aprecia un oscurecimiento de coloración en las raíces, así como desprendimiento de capas superiores y un notable cambio en su longitud. Cabe mencionar que, a pesar de la coloración y afectación en el desarrollo de las raíces, no se observó un cambio importante en la forma o la consistencia, por lo que se puede estimar que no hay ninguna afectación estructural.



Figura 22. Cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de **A)**100, **B)** 75 y **C)**50 $\mu\text{g/mL}$.

En cuanto a los bulbos de estas tres concentraciones superiores, presentaron una especie de moretones desde las 24 h de exposición, siendo más notorios con el paso del tiempo, así como el oscurecimiento general del bulbo apreciable en la figura 23.

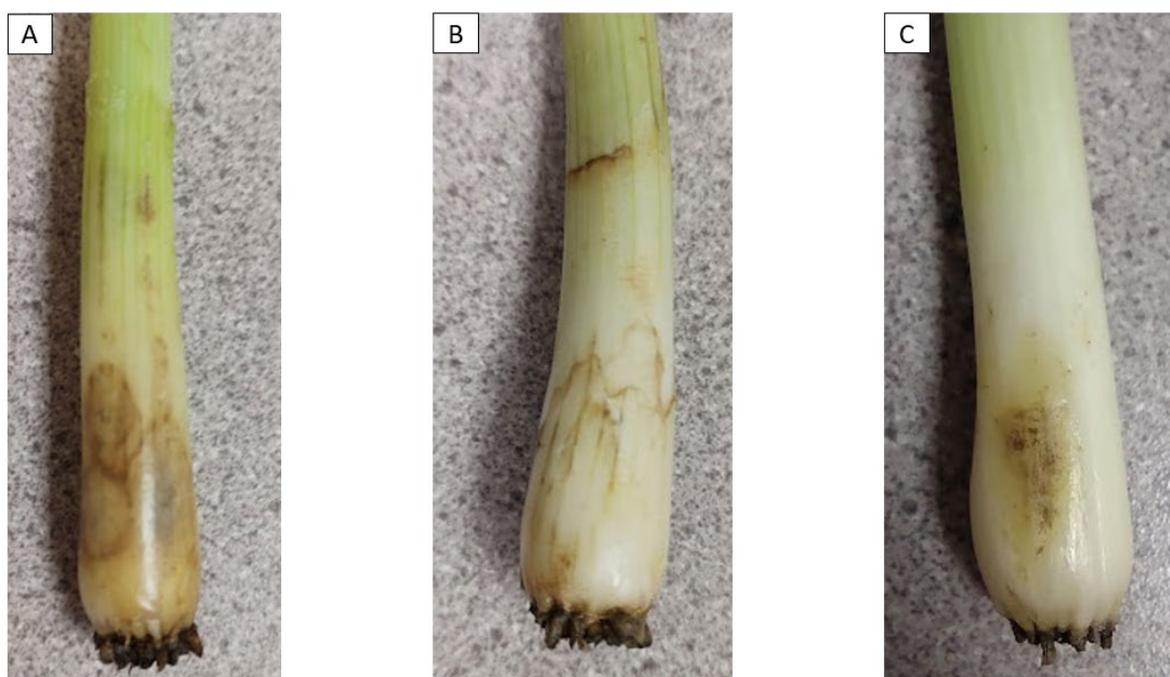


Figura 23. Acercamientos a defectos de cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de **A)**100, **B)** 75 y **C)**50 $\mu\text{g/mL}$.

En el caso de la concentración más alta, incluso se observaron que las capas superiores presentaban algo similar a huecos en algunas zonas que, además, presentaban un cambio notorio de coloración como en la figura 24A. La tonalidad oscura

parecía que iba en dirección del xilema de la planta. Por ello se decidió realizar cortes longitudinales (figura 24B) y transversales (figura 24C), encontrando de esta forma que el daño apreciado es superficial, y que en su interior el bulbo está aparentemente sano.



Figura 24. Cebollas expuestas a AgNP1 por 72 h a concentraciones de 100 µg/mL **A)** acercamiento a defectos en el bulbo, **B)** corte longitudinal y **C)** corte transversal.

En cuanto a las medidas de longitud y cantidad de raíces fueron tomadas cada 24 h. Con estos datos, se compararon las 7 concentraciones distintas con la concentración máxima de PVP (1721 µg/mL) y plata (100 µg/mL) contenida en la concentración más alta de AgNPs. También se compararon estos resultados con 2 controles de colchicina, 0.125 mM a 4 h + 68 h (C++) y 0.00125 mM por 72 h (C+) como se muestra en la figura 25.

Longitud y número de raíces por exposición a AgNP1

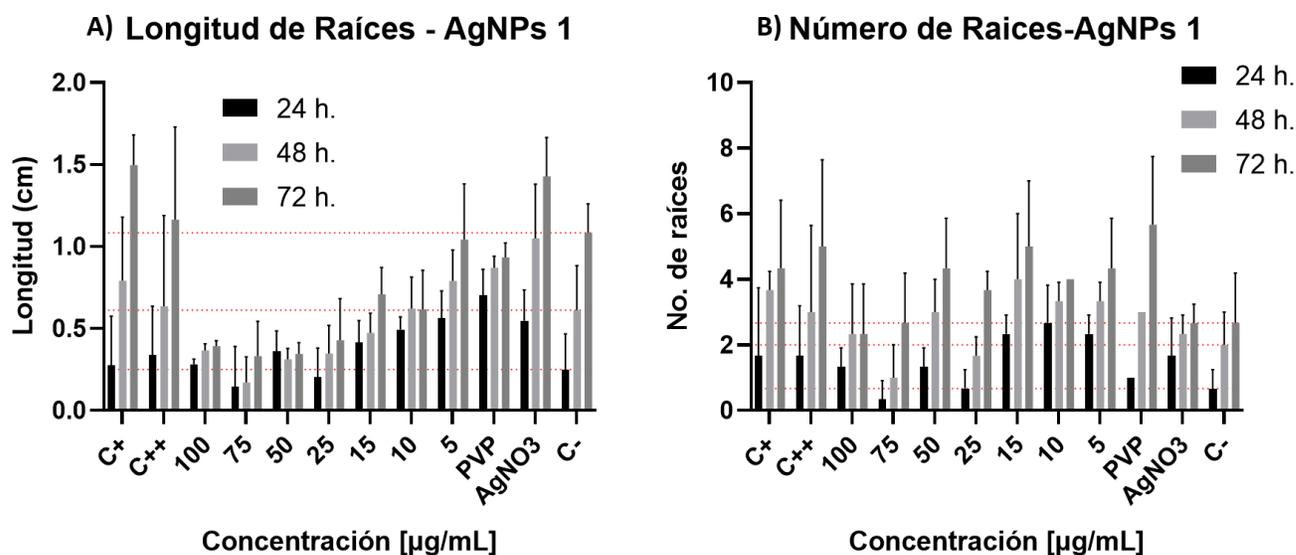


Figura 25. A) Longitud y **B)** número de raíces después de 24, 48 y 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs formulación 1. En donde, C+ representa el control positivo de colchicina [0.00125 mM] a 72 h continuas; C++, el control positivo de colchicina [0.125 mM] con una exposición de 4 h y 68 h de recuperación; y C- el control negativo con agua destilada.

Como se puede observar en la figura 24, ninguna de las concentraciones de AgNPs ni el control con PVP supera la longitud de las raíces observadas en el C- después de 72 h. Por el contrario, las muestras de AgNO₃ como ambos controles positivos obtuvieron longitudes mayores comparado con C-. Por otro lado, las concentraciones en el intervalo de 50 a 5 µg/mL de AgNPs formulación 1 obtuvieron una mayor cantidad de raíces que el control con agua.

AgNP4

De manera similar a la formulación 1, las cebollas expuestas a AgNP4 sufrieron mínimas afectaciones en concentraciones menores a los 25 µg/mL. En la figura 26 se observa que mantiene una coloración blanca y solo las concentraciones de 15 y 25 µg/mL llegan a presentar desprendimiento de las capas superiores y una un aspecto ligeramente mucilaginoso en el bulbo. En cuanto a las raíces, se mantuvo el color y un crecimiento aparentemente similar al control con agua, la consistencia de las raíces era flexible y en un estado aparente de salud.



Figura 26. Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 horas a concentraciones de **A)**25, **B)** 15 **C)**10 y **D)** 5 µl/mL.

Sin embargo, en las concentraciones más altas que van de los 50 a los 100 µg/mL se observaron afectaciones como es apreciable en la figura 27. Primeramente, las raíces tuvieron un crecimiento notoriamente menor a cualquier otro estímulo. A pesar de ello, es de destacar que se observaba la generación de más raíces nuevas, aunque cortas para las tres concentraciones, adquiriendo en su mayor parte coloraciones oscuras y unas pocas raíces totalmente blancas. Por su parte, en todos los casos el bulbo comenzó a presentar moretones, un aspecto ligeramente mucilaginoso y ligero desprendimiento de capa desde el primer día de exposición.



Figura 27. Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 h a concentraciones de **A)**100, **B)** 75 y **C)** 50 µg/mL.

Entre las particularidades a destacar relacionadas con las concentraciones altas de formulación 4, podemos mencionar el daño sufrido en el tallo de las cebollas, donde se apreciaba la adquisición de una coloración oscura y no uniforme (figura 28B), así como lesiones en el bulbo como si se hubiera raspado la capa superior (figura 28A). Empero, al realizar los cortes longitudinales y transversales (figura 28C y 28D), no se hallaron afectaciones, estimando que solo es una lesión externa.

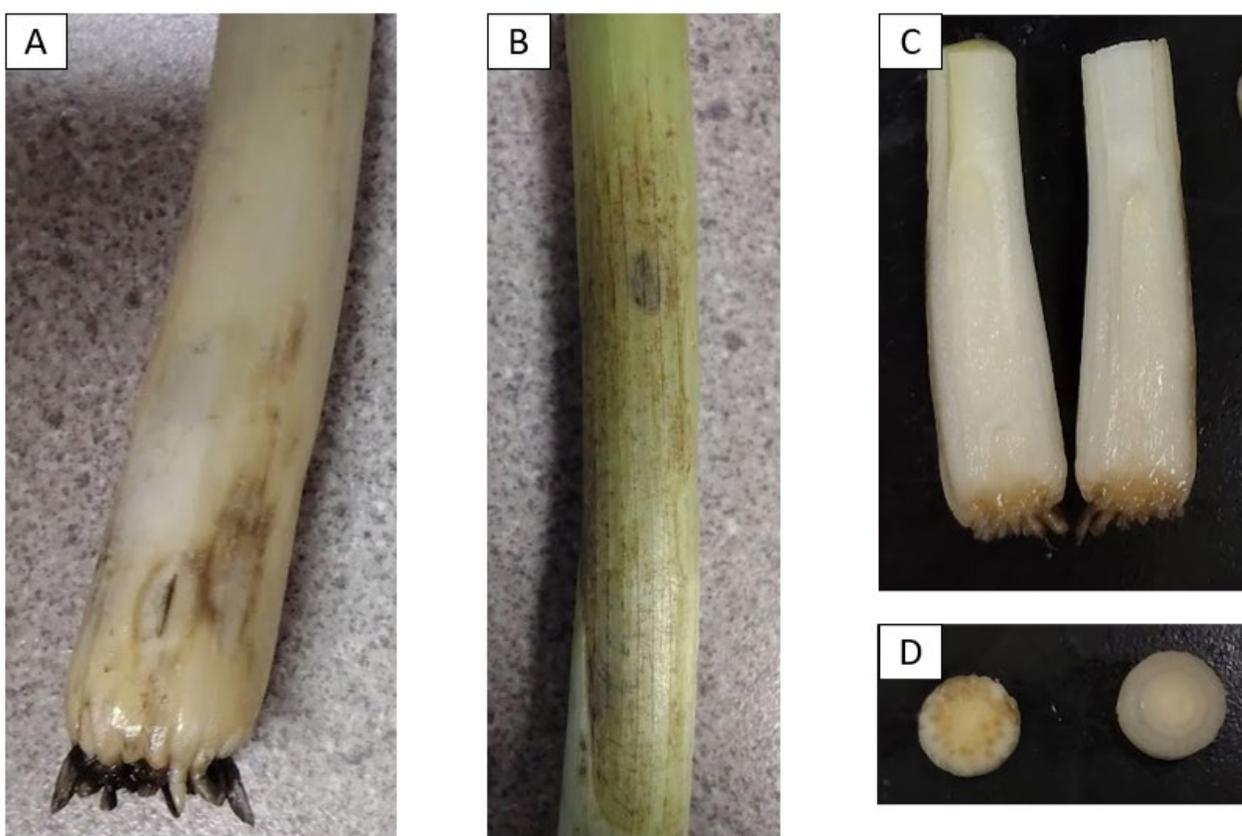


Figura 28. Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 horas a una concentración de 100 µg/mL **A)** acercamiento a defectos en el bulbo, **B)** defectos en el tallo, **C)** corte longitudinal y **D)** corte transversal del bulbo.

Otros de los daños observados es la forma que adquirirían la base de las raíces nuevas, ya que tendían a “envolver” a las raíces más viejas del centro y, por ende, presentar una ligera curvatura hacia el interior como puede notarse en la figura 29.



Figura 29. Cebollas expuestas a AgNP4 por 72 h a concentración de **A)**100 y **B)** 50 µg/mL defecto en raíces “envolventes”.

Después de medir la cantidad y longitud de las raíces cada 24 h por un periodo de 72 h, se realizó el promedio de los datos obtenidos y, al igual que con la AgNP 1, se compararon las 7 concentraciones evaluadas con el efecto producido por la concentración máxima de PVP (1721 µg/mL) y plata iónica (100 µg/mL) contenida en la concentración más alta de AgNPs, C+ y C++. La figura 30 muestra la compilación de los resultados.

Longitud y número de raíces por exposición a AgNP4

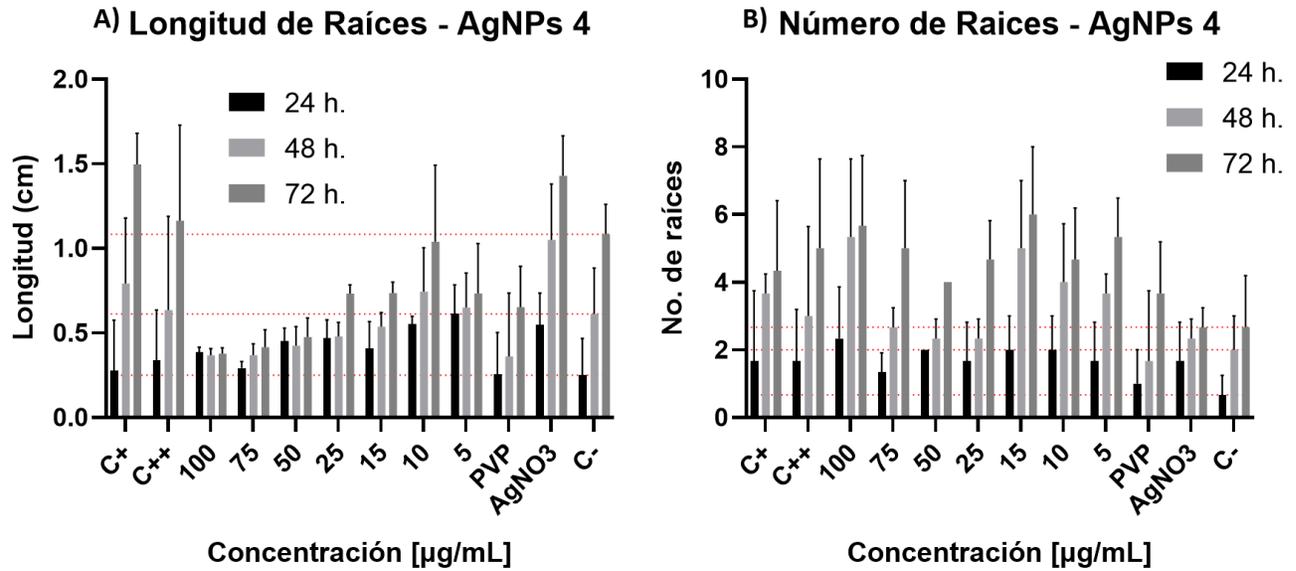


Figura 30. A) Longitud y **B)** número de raíces en 24, 48 y 72 h de exposición a diferentes concentraciones de AgNPs formulación 4. En donde, C⁺ representa el control positivo de colchicina [0.00125 mM] a 72 h. continuas; C⁺⁺, el control positivo de colchicina [0.125 mM] con una exposición de 4 h. y 68 h. de recuperación; y C⁻, el control negativo con agua destilada.

Finalmente, con los datos de crecimiento de las raíces después de la exposición a las dos formulaciones de nanopartículas, se realizó el cálculo del EC₅₀ como se observa en la figura 31.

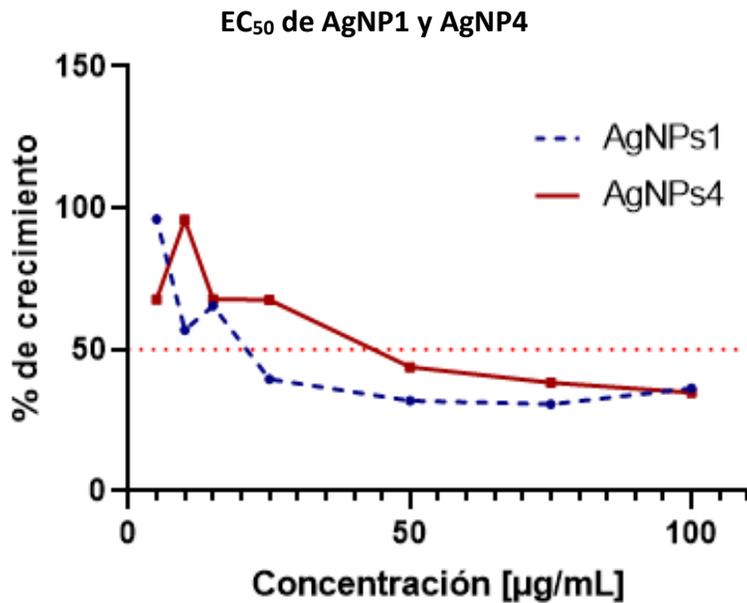


Figura 31. EC₅₀ después de 72 h de exposición continua a diferentes concentraciones de las formulaciones 1 y 4 de las AgNPs.

En el caso de las nanopartículas, se puede inferir que el valor de EC_{50} se encuentra, en el intervalo de las concentraciones de 15 y 25 $\mu\text{g/mL}$ para AgNP1, cuyos valores de porcentaje de inhibición son 34.52% y 60.40% respectivamente. En este caso, es importante mencionar que, si bien se espera que la concentración inhibitoria media de crecimiento se encuentre dentro de ese intervalo, el valor más próximo obtenido a inhibir el 50% del crecimiento se encuentra en la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ con un EC_{50} de 43.09%. Por otro lado, para el caso de la AgNPs 4 se observa que el valor EC_{50} exacto se encuentra dentro del intervalo de concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, con una inhibición del 32.43% y 56.19% respectivamente, en donde ésta última, fue el punto más cercano a la concentración inhibitoria media de crecimiento.

Parámetros microscópicos

La comparación de los parámetros microscópicos se realizó para todos los controles y formulaciones de AgNPs, por lo que, una vez terminado el ensayo, se procedió a contar las fases mitóticas y las aberraciones cromosómicas. Con base en esos datos, se calculó el índice mitótico y el porcentaje de daño, como se muestra en la figura 32 para la AgNP1 y en la figura 33 para la AgNP4.

Índice mitótico y porcentaje de daño de raíces expuestas a AgNP1

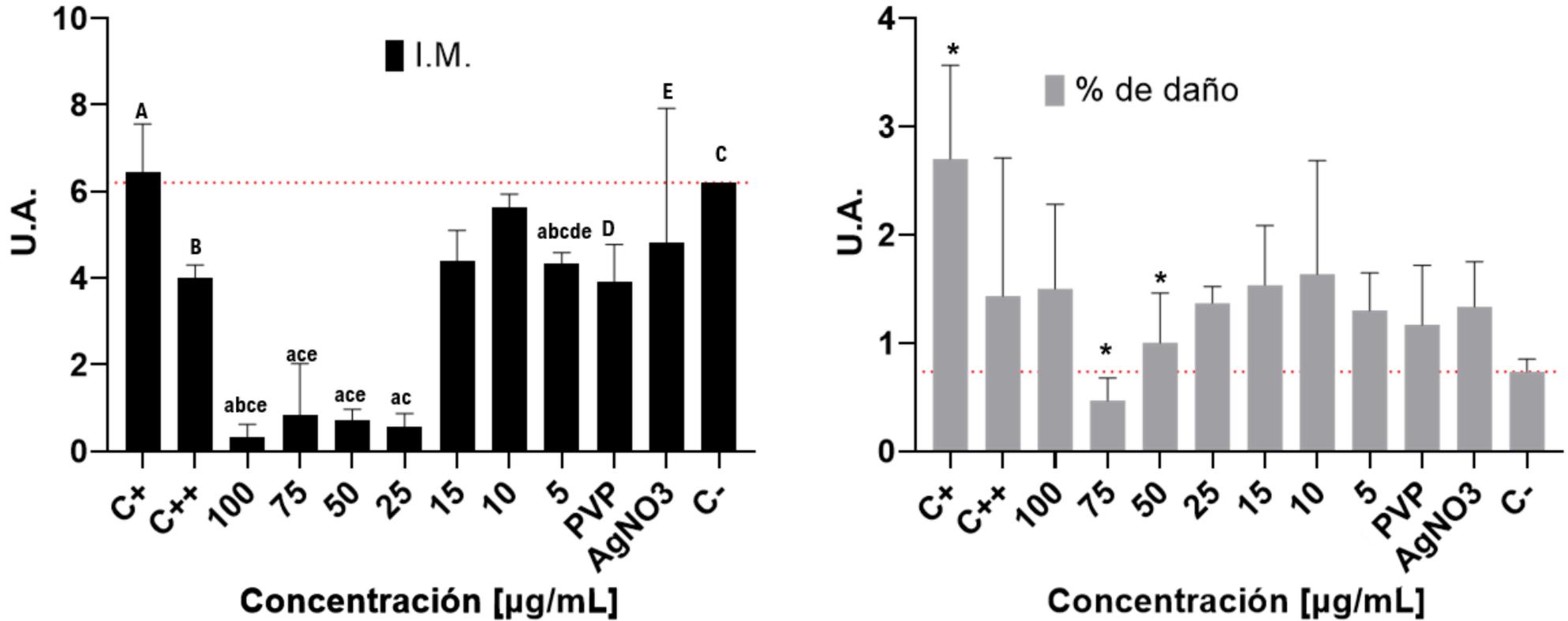


Figura 32. Comparaciones de índice mitótico y porcentaje de daño para AgNP1. Las letras minúsculas indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control correspondiente con letra mayúscula: C+ (A), C++ (B), C- (C), PVP (D) y AgNO₃ (E). Los * indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de daño. Se considera p<0.05

Índice mitótico y porcentaje de daño de raíces expuestas a AgNP4

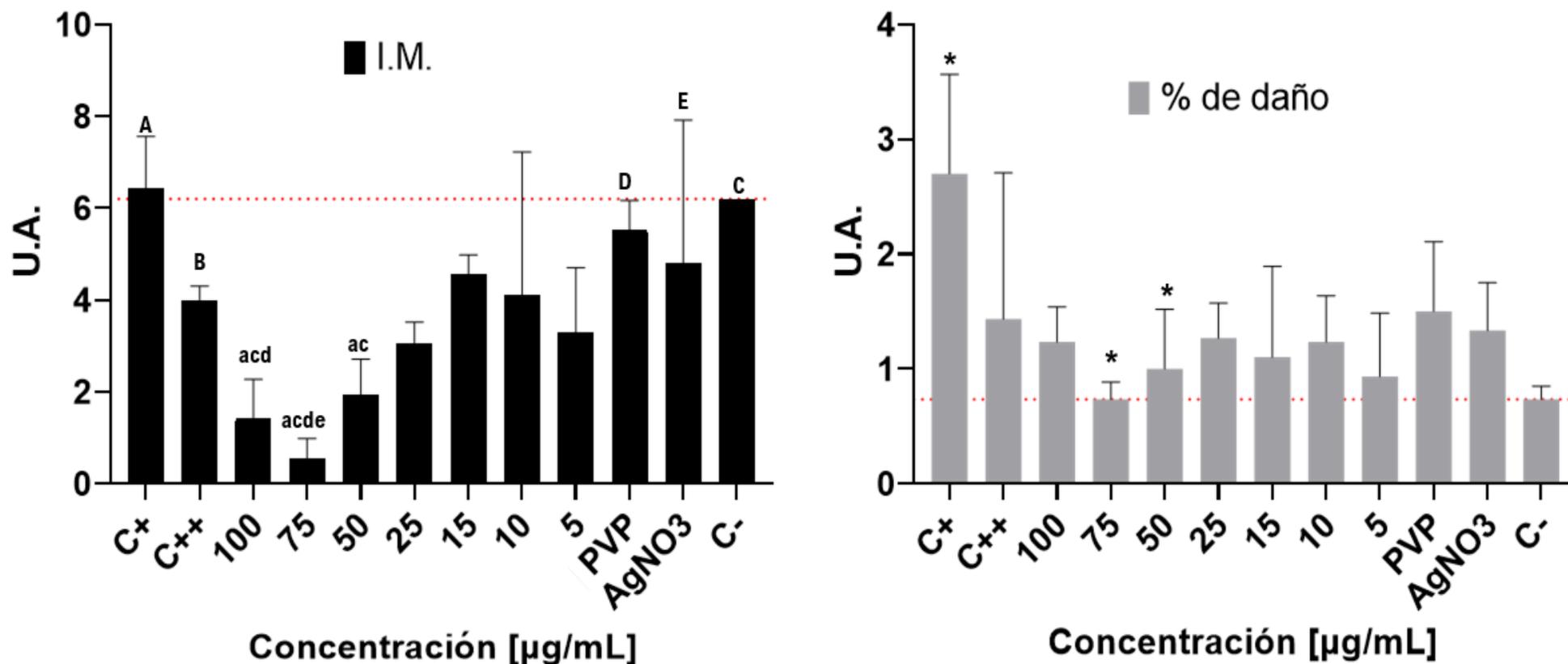


Figura 33. Comparaciones de índice mitótico y porcentaje de daño para AgNP4. Las letras minúsculas indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control correspondiente con letra mayúscula: C+ (A), C++ (B), C- (C), PVP (D) y AgNO₃ (E). Los * indican los tratamientos que presentan diferencias estadísticamente significativas para el porcentaje de daño. Se considera $p < 0.05$

En la figura 29 y 30 se puede observar que ninguna concentración de AgNPs de la formulación 1 o la 4 obtuvieron un índice mitótico mayor al control negativo. Esto también se puede observar para AgNO_3 y ambos PVP (K-15 y K-30). En contraparte, casi todas las muestras tuvieron porcentajes de daño mayores al control negativo exceptuando la concentración de $75 \mu\text{g/mL}$ para ambas nanopartículas, en donde, para AgNP1 el daño es de 39.48%, mientras que en la AgNP4 es exactamente igual que a su control negativo.

De manera más específica podemos observar en la figura 34 que se encuentran las células encontradas en cada una de las fases mitóticas, así como los porcentajes de cada tipo de daño cromosómico para la AgNP1 en la figura 35.

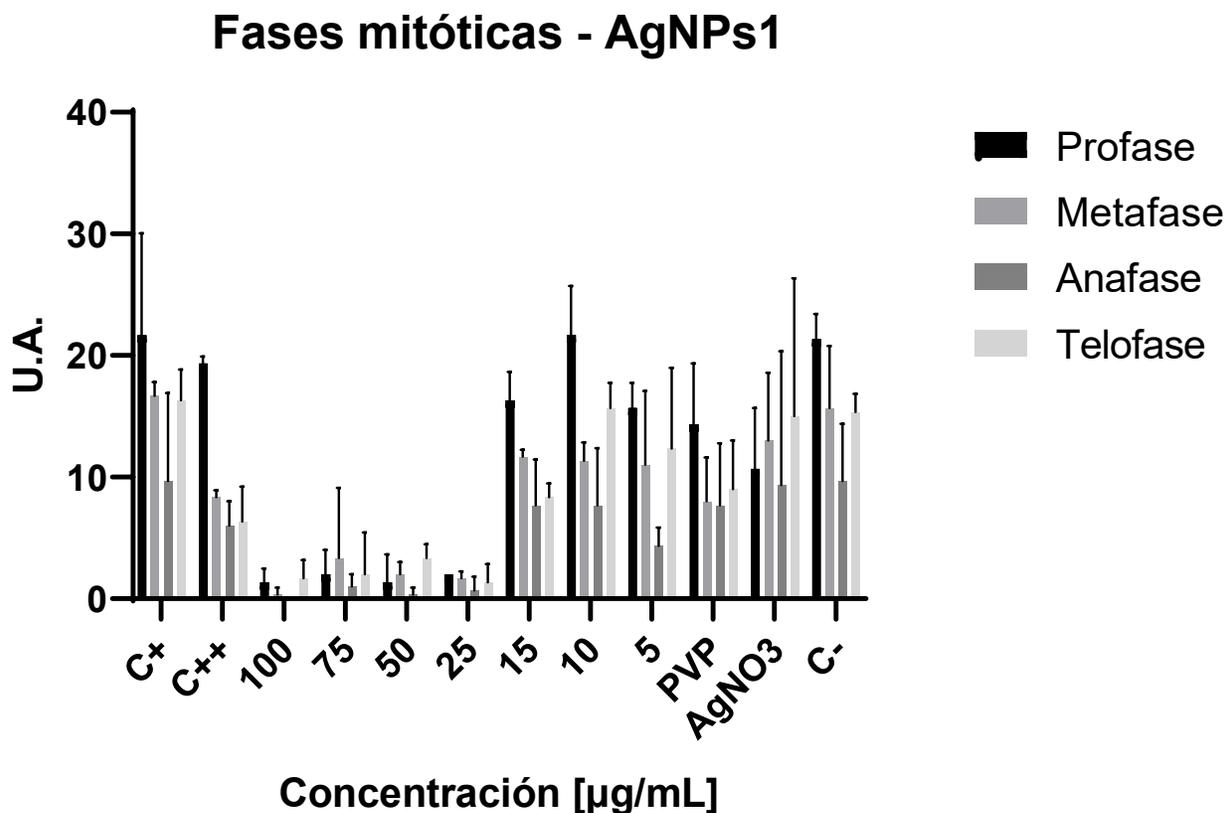


Figura 34. Fases mitóticas en *Allium cepa* expuestas a AgNPs 1 por 72 h.

Defectos cromosómicos - AgNPs1

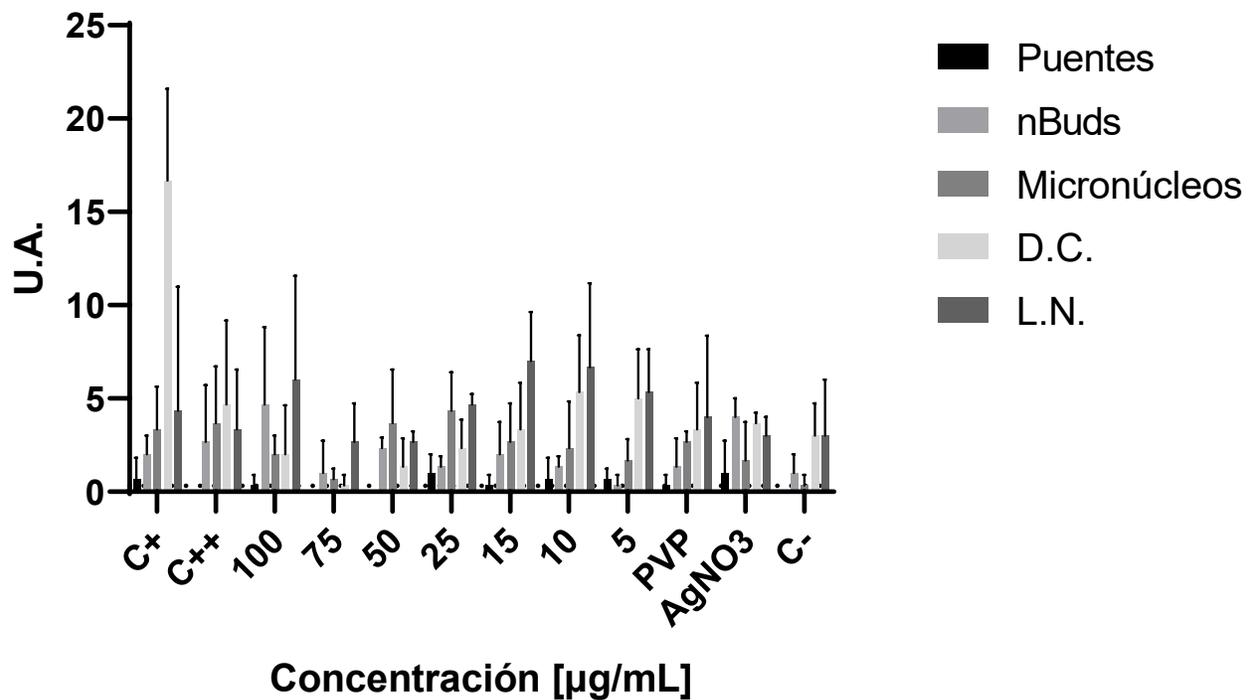


Figura 35. Defectos cromosómicos en *Allium cepa* expuestas a AgNPs 1 por 72 h.

Se observa que de manera similar a la colchicina y control con agua (C-), las AgNPs en concentraciones de 15 µg/mL presentan una mayor frecuencia de células en profase respecto a otras fases; sin embargo, en concentraciones de AgNPs mayores en telofase y en anafase.

En cuanto a los defectos cromosómicos, las nanopartículas presentan con mayor frecuencia lesiones nucleares para todas las concentraciones; además de que es casi nula la presencia de puentes. Además, podemos mencionar que de manera cualitativa los micronúcleos presentes en células expuestas a AgNPs fueron más pequeños que aquellos observados con la colchicina.

Mientras que para la AgNP4 la cantidad de células en cada fase mitótica en la figura 36 y los porcentajes de cada tipo de daño se aprecian en la figura 37.

Fases mitóticas - AgNPs4

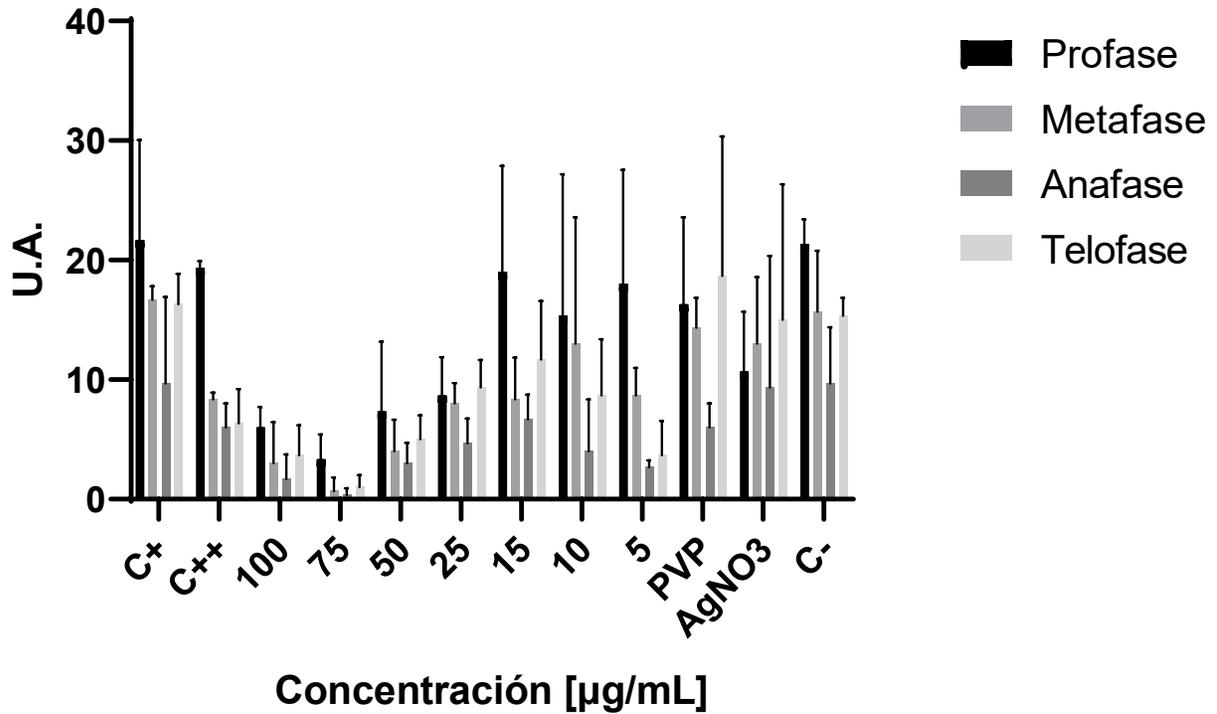


Figura 36. Fases mitóticas en *Allium cepa* expuestas a AgNPs 4 por 72 h.

Defectos cromosómicos - AgNPs4

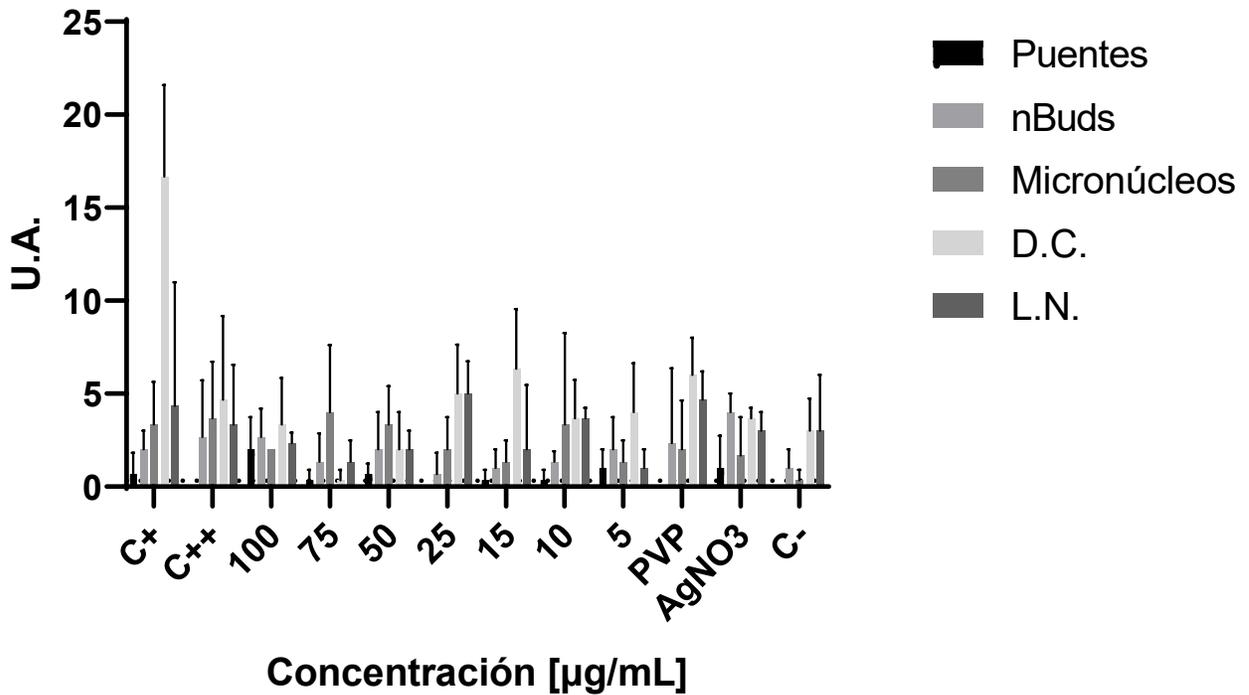


Figura 37. Defectos cromosómicos en *Allium cepa* expuestas a AgNPs 4 por 72 h.

Es de notar que para todas las concentraciones de AgNP4 al igual que con la colchicina, la profase fue la fase mitótica más recurrente, seguida por células en telofase.

Además, para los porcentajes de daños cromosómicos no hay una generalización para todas las concentraciones, pero se aprecia que los defectos cromosómicos y las lesiones nucleares son los daños que predominan.

En cuanto al análisis estadístico, se realizó una prueba Anova de una vía, considerando ambas nanopartículas y nuestros controles, encontrándose que en la cantidad de micronúcleos no hay diferencias significativas entre grupos, sin embargo, en el porcentaje de daño y en el índice mitótico si se encontraron diferencias significativas, considerando un nivel de significancia menor a 0.05.

Se realizó la prueba de Tukey para hacer una comparación múltiple entre las distintas concentraciones de nanopartículas y los controles, con el fin de comparar el daño generado. Los resultados se pueden observar en la figura 32 y 33 donde aquellos que presentan diferencias de medias significativas son comparados con las letras usando mayúsculas para indicar contra qué control (A →C+, B→C++, C→C-, D→PVP, E→AgNO₃) presentan estas diferencias, o cifras en detalles pueden ser consultadas en los anexos 1 y 2.

De manera general, se observa que no hay diferencias significativas de AgNP1 con respecto al control con PVP K-15 para los valores de índice mitótico en cualquiera de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, en concentraciones de AgNP1 de 25 µg/mL y superiores, existen diferencias significativas respecto al control con agua y con colchicina de 0.00125mM (C+).

Por su parte, se obtuvo que no hay diferencias significativas de ninguna concentración respecto al control de colchicina a 0.125mM (C++) para los índices mitóticos de AgNP4. Mientras que para los controles de agua y colchicina a 0.00125 mM (C+) hay diferencias significativas a partir de concentraciones de 50 µg/mL y superiores.

En cuanto al porcentaje de daño, en la mayoría de los casos no hubo diferencias significativas con respecto a los controles de agua (C-), PVP, AgNO₃ y colchicina a 0.125 mM exposición con recuperación (C++) para ambas formulaciones.

En contraste, en el caso del porcentaje de daño para la AgNP1 existen diferencias estadísticamente significativas (marcadas con * en la figura 33) entre el control de

colchicina a 0.00125 mM a exposición continua (C+) y las concentraciones de 75 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanopartículas.

De manera similar, para la formulación de AgNP4 existen diferencias significativas en el porcentaje de daño entre la colchicina a 0.00125mM (C+) y las concentraciones de AgNP4 de 75 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Debido a que las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones AgNP 1 y 4 son prácticamente iguales, se realizó una comparativa entre las concentraciones de ambas formulaciones para determinar si el recubrimiento de PVP puede influir en el índice mitótico o el daño generado, esta comparación puede observarse en la figura 38.

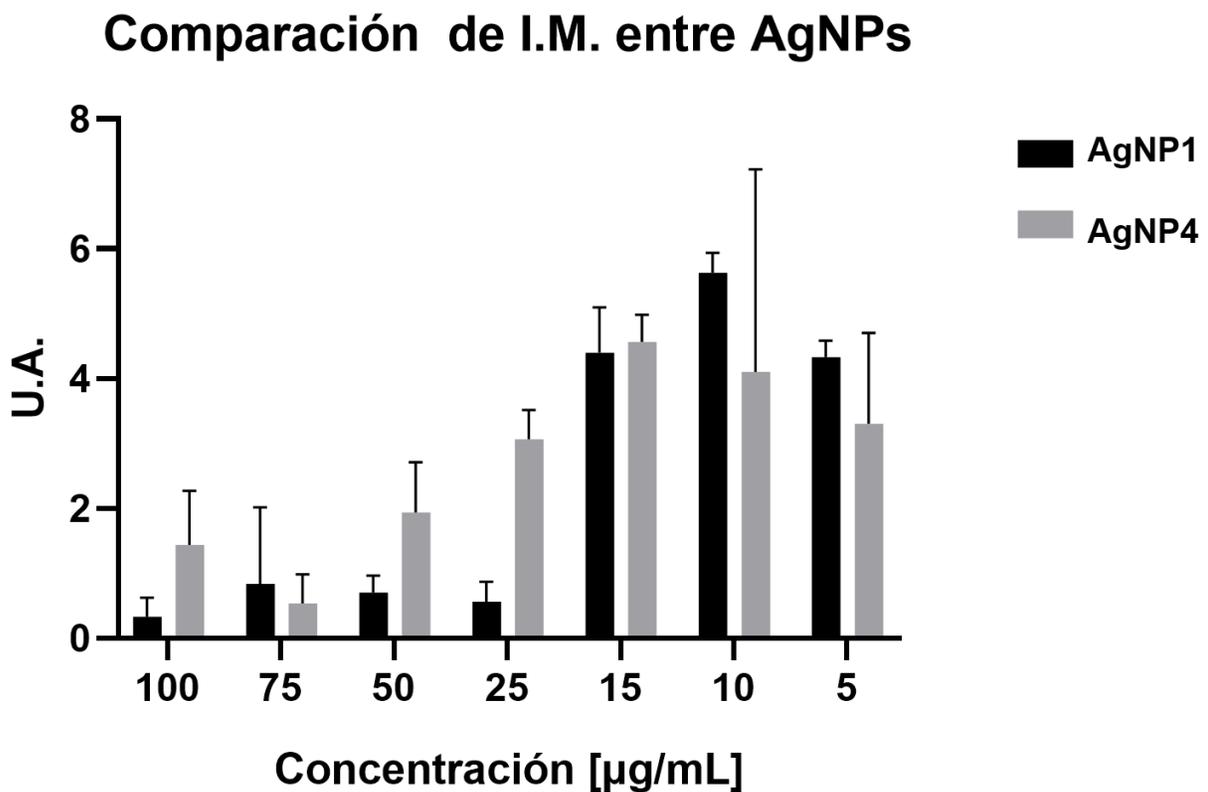


Figura 38. Índice mitótico de las nanopartículas 1 y 4.

Al realizar la prueba post-hoc de Tukey para comparar ambas formulaciones de nanopartículas se encontró que para concentraciones iguales no hay diferencias significativas en el índice mitótico.

Sin embargo, al comparar el índice mitótico para las dos formulaciones, podemos encontrar que en el caso de la formulación 1 a concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es el punto en el cual presenta diferencias estadísticamente diferentes con una mayor gama de concentraciones de la formulación 4 (100,75 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la formulación 1 presenta diferencias significativas con la concentración 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las AgNP4.

De igual forma, para la formulación 4 la concentración de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es la que presentó diferencias significativas con una mayor variedad de concentraciones de la formulación 1 (100,75,50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Adicionalmente, en la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la AgNP4 se observan diferencias significativas respecto a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la formulación 1.

Asimismo, se realizó la comparación de porcentaje de daños entre ambas formulaciones de nanopartículas, como se puede observar en la figura 39.

Comparación de porcentaje de daño entre AgNPs

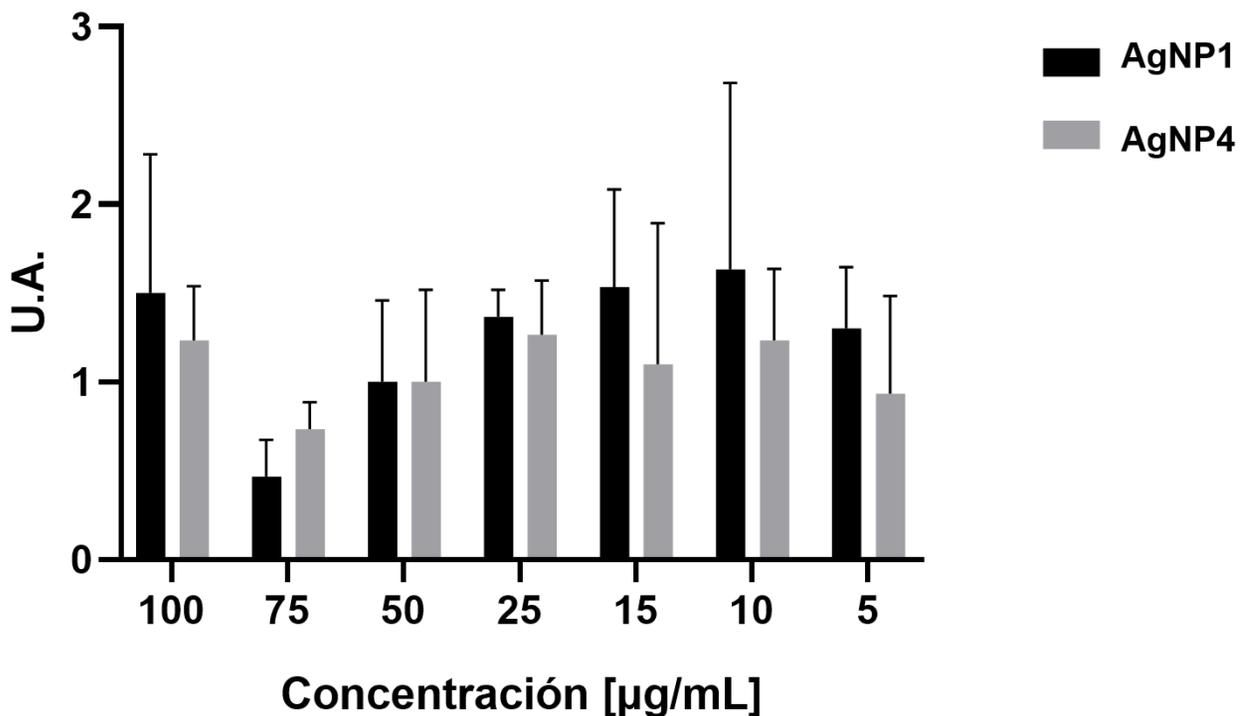
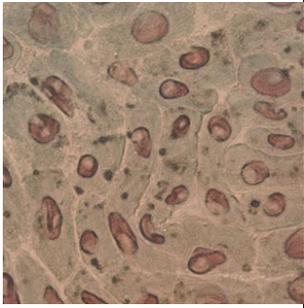
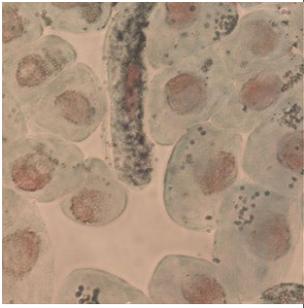
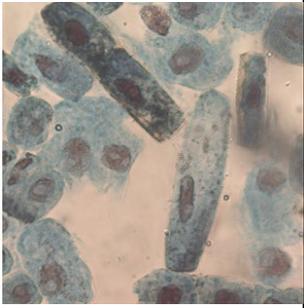
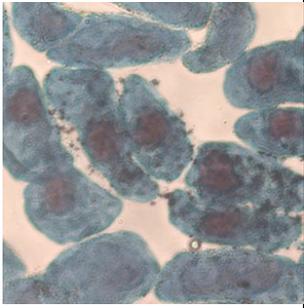
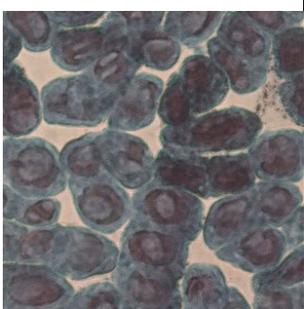
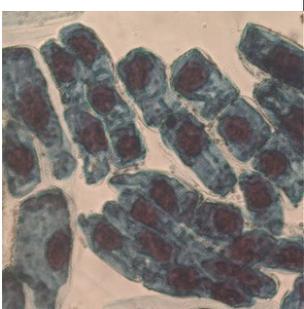
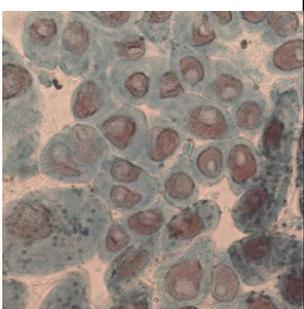


Figura 39. Porcentaje de daño de las nanopartículas 1 y 4.

Como se puede apreciar, en cuanto al porcentaje de defectos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna concentración de las dos formulaciones de nanopartículas, los datos a detalle pueden consultarse en el anexo 4.

Por último, es importante mencionar que se encontraron notorios aglomerados dentro y fuera de las células en las concentraciones de 100, 75, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs 1 y 100, 75 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs 4. Cabe aclarar que concentraciones más bajas que las anteriormente señaladas no presentaban aglomeraciones significativas o simplemente su existencia es nula. La tabla 7 muestra fotografías representativas de la acumulación de material en las células de raíz de cebolla expuestas por 72 h a AgNP1 y AgNP4.

Tabla 7. Imágenes con aglomerados dependientes del tipo de nanopartícula y la concentración.

		Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			
		100	75	50	25
AgNPs 1					
	AgNPs 4				

Además, cabe recalcar que la presencia de estos aglomerados era en aquellas raíces que presentaban una coloración oscura, en las raíces blancas (aun siendo de las mismas condiciones de exposición) las aglomeraciones eran poco notorias.

Por ello se decidió analizar las laminillas mediante microscopía de fluorescencia, donde las raíces negras de las concentraciones más altas de nanopartículas de plata se tiñeron con naranja de acridina, con la finalidad de descartar que los aglomerados fueran errores de tinción, obteniendo las imágenes de la figura 40.

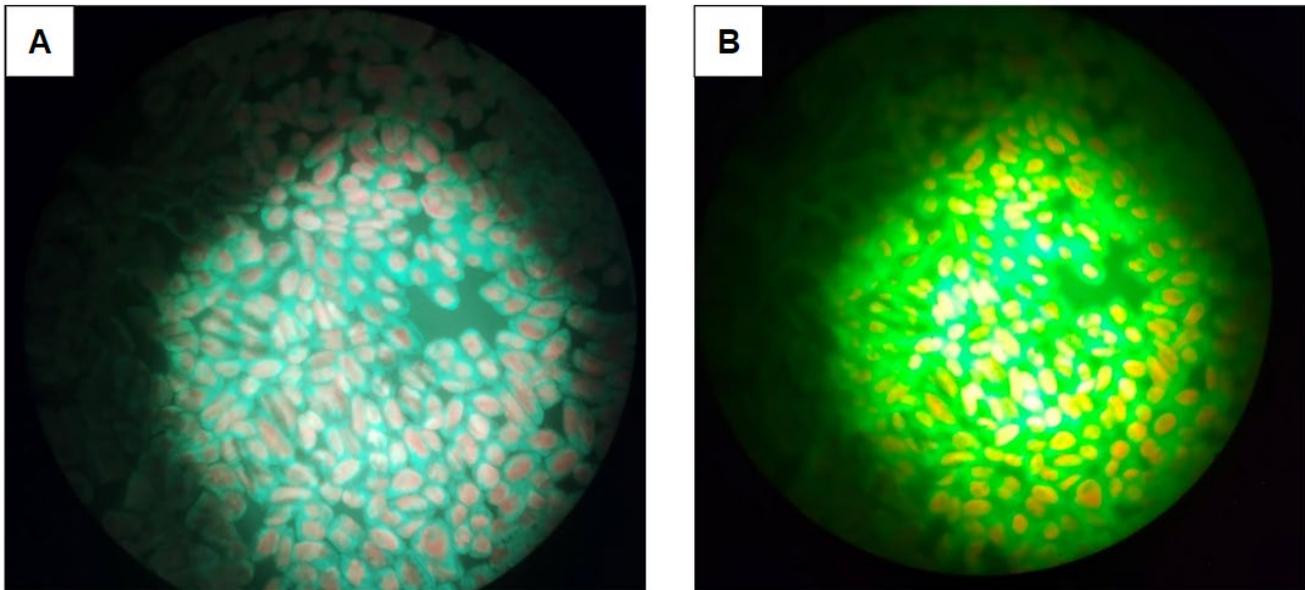


Figura 40. Fotografías de raíces negras de AgNP1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en aumento x40, observado con **A)** luz blanca y **B)** en fluorescencia a $\lambda_e = 470 \text{ nm}$.

Los aglomerados no presentaban fluorescencia, por lo que se descartó error de tinción y se buscaron otras formas para comprobar la naturaleza de los aglomerados.

En consecuencia, se realizó una placa de rayos X de las cebollas que presentaron una mayor cantidad de estos aglomerados utilizando como referencia un algodón impregnado con AgNPs, esto con el fin de corroborar la presencia de plata metálica en las cebollas. La radiografía se presenta en la figura 41, en donde los puntos más brillantes en la parte superior de la imagen corresponden a las tachuelas utilizadas para sujetar las cebollas.

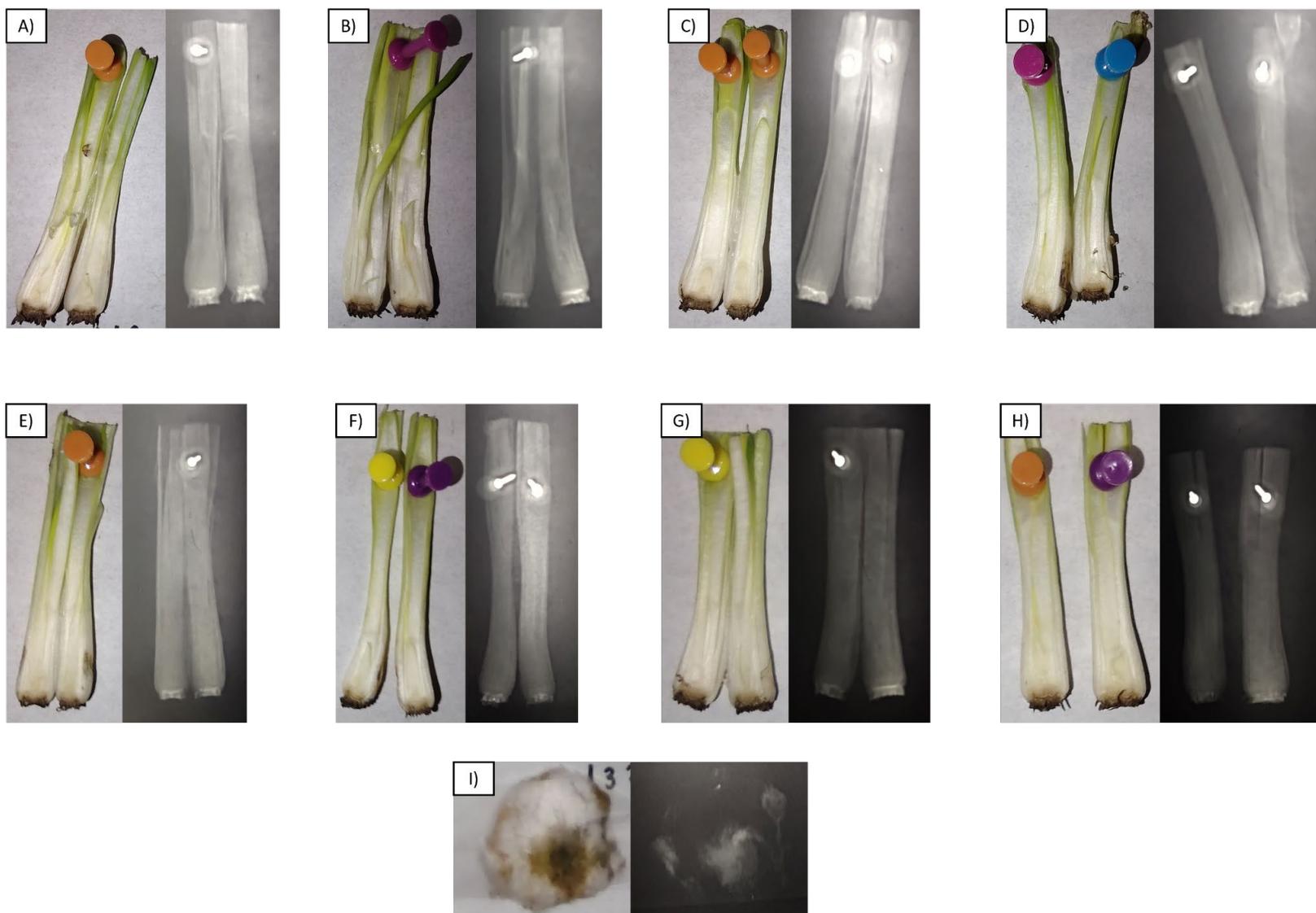


Figura 41. Radiografía de cebollas expuestas a AgNPs 1 con concentraciones de: **A)** y **B)** 100; **C)** y **D)** 75; y **E)** y **F)** 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y AgNPs 4 con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En donde **I)** muestra el algodón impregnado con AgNPs 1 y su respectiva radiografía utilizado como control de identificación de plata metálica.

Como se puede apreciar en la Fig. 41-I, las nanopartículas pueden observarse como las zonas más brillantes de la radiografía, lo cual nos indica la presencia de plata metálica. Dicho esto, al comparar las cebollas con su correspondiente radiografía, se puede apreciar que las partes que presentan una mayor coloración, similar a la de las nanopartículas, poseen un mayor brillo, lo que fortalece la hipótesis acerca de la presencia de aglomerados de nanopartículas las cebollas. Es importante mencionar que las raíces fueron enjuagadas con agua destilada, por lo que las nanopartículas solo pueden encontrarse en el interior de las cebollas.

Análisis de resultados

De acuerdo con Fiskesjö, G. (1985), la tenacidad de las raíces es un indicador de la turgencia; una raíz frágil es sinónimo de toxicidad. En este trabajo se encontró que las AgNPs y la colchicina aumentaban la rigidez en función de la concentración; conforme disminuye la concentración de las sustancias evaluadas, la rigidez de las raíces también disminuye, siendo muy similar a la del C-. Lo anterior nos indica que se presentan cambios fisiológicos que ocasionan variaciones en la ósmosis de las células de las raíces. Esto se corroboró con observaciones en el microscopio a las concentraciones más altas evaluadas de cualquier sustancia, las células eran más grandes en estos casos que las células expuestas a las concentraciones más bajas. Además, se observó pérdida de la integridad morfológica, pasando a ser más redondas en lugar de cuadradas, esto se aprecia en la figura 42.

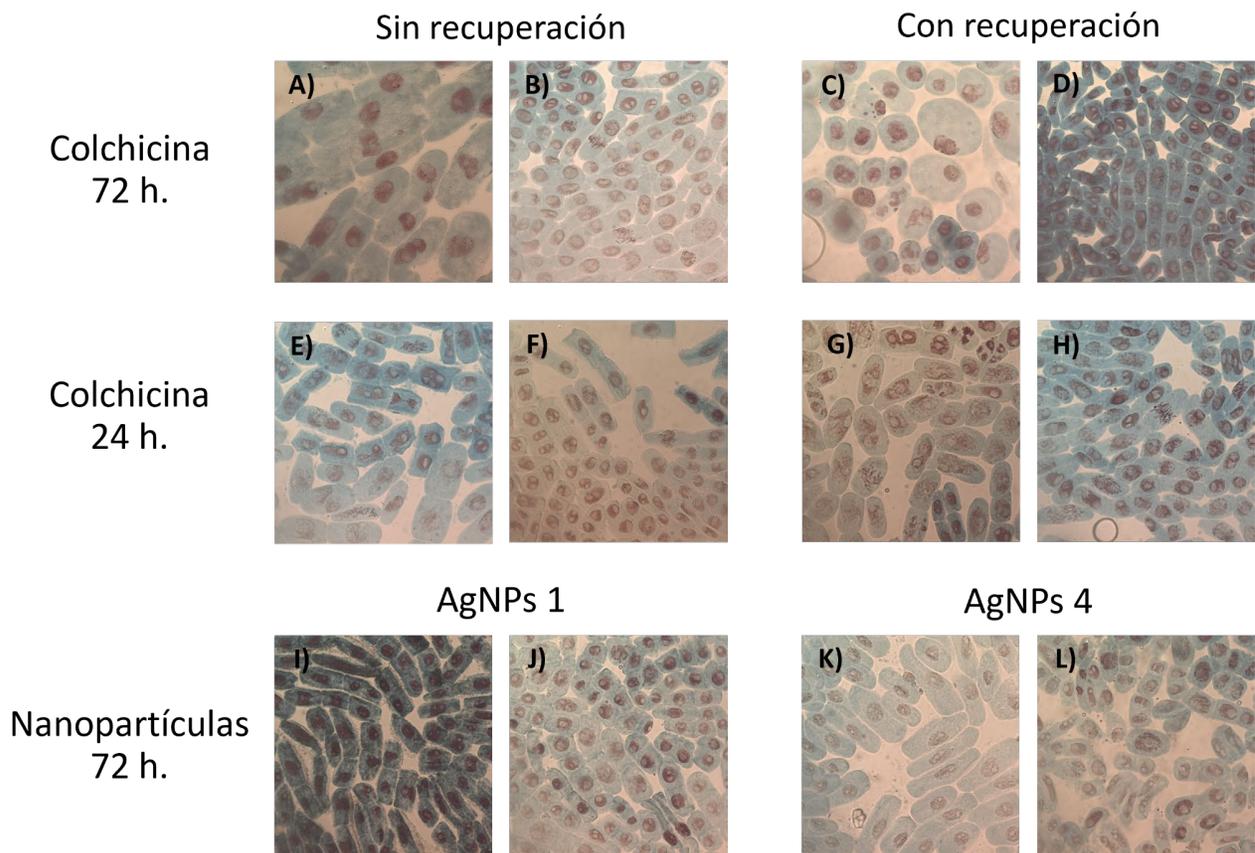


Figura 42. Comparación de tamaños de células expuestas a colchicina con una concentración de 1.25 mM: **A)**, **C)**, **E)**, y **G)** y 0.00125mM: **B)**, **D)**, **F)**, y **H)** 0.00125mM. Los paneles I-L muestran la comparación de tamaños de células expuestas a concentraciones de 100 µg/mL de **I)** AgNPs 1 y **K)** AgNPs 4 y 5 µg/mL de **J)** AgNPs 1 y **L)** AgNPs 4.

Aunque el tamaño de las células está asociado al grosor de la raíz, se apreció de manera constante el incremento del tamaño de las células conforme mayor era la concentración de la sustancia estudiada, siendo más notorio en las muestras con colchicina. Es necesario destacar que las células que poseen un mayor tamaño se encontraban en raíces que poseían un tumor-C, similar a lo descrito por Shimamura (1939). Por otro lado, el mismo autor enuncia que otro indicador de genotoxicidad es la coloración, lo cual explica la ligera coloración amarillenta en las concentraciones de colchicina más elevadas. Fue justo en estas condiciones experimentales donde se encontró un mayor porcentaje de daño al material genético. En las concentraciones más altas de AgNPs evaluadas, las raíces poseían un color café oscuro más intenso conforme más elevada fuera la concentración. Aunque en este caso, la suspensión de AgNPs concentrada ya posee una coloración café.

De acuerdo con Leme (2008), un agente aneugénico es capaz de crear múltiples polos para la división celular, lo que ocasiona que se creen C-metafases, la cual puede ocasionar células multinucleadas y una gran cantidad de micronúcleos. Lo anterior se observó principalmente en las concentraciones elevadas de colchicina en todas las condiciones, teniendo mayor frecuencia las muestras expuestas 4 h a la concentración 1.25 mM con 20 h de recuperación, como se muestra en la figura 43.

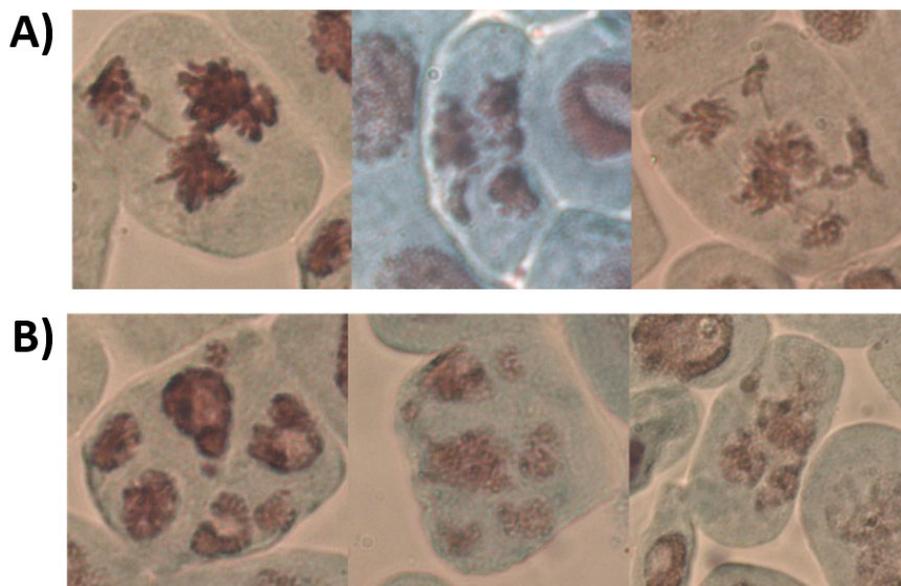


Figura 43. Células de cebolla expuestas a colchicina [1.25 mM] por 4 h con 20 h de recuperación en donde **A)** se muestran múltiples polos antes de la división celular y **B)** se observan células polinucleadas y polimicronucleadas.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por Kundu & Ray (2017), y Chakraborty et al., (2021), utilizar colchicina como control positivo a una concentración de 0.4 mg/mL produce una reducción en el I.M. y un aumento en aberraciones cromosómicas (principalmente metafase-c), al igual que una inhibición en el tamaño de las raíces. Lo anterior coincide con los datos obtenidos en el presente trabajo, mostrando una concordancia con la longitud de las raíces medidas después de 24h de exposición (que es el tiempo más cercano al que ellos estudiaron). Sin embargo, se puede apreciar que, a 72 h de exposición el comportamiento cambia, por lo que se podría decir que existe una dependencia del tiempo para la inhibición del crecimiento de las raíces.

Además, cabe mencionar que todas las muestras de 72 h. obtuvieron un mayor número de raíces que el C- y, a 24 h. solo las concentraciones de 0.00125 mM sin recuperación y 1.25 mM con recuperación obtuvieron un número menor de raíces que el C-.

En cuanto al valor EC_{50} , no se encontró ninguna comparación directa en la literatura, sin embargo, de acuerdo con Bosio (2012) los resultados obtenidos por *Allium test* podrían ser equiparables con ciertas líneas celulares. Dicho lo anterior, Norieva (2020) encuentra que el EC_{50} de la colchicina estudiada en la línea celular A549 es de 30 nM y, si lo comparamos con nuestro resultado, el valor obtenido por Norieva es 41.66 veces menor al nuestro. Si comparamos el valor de EC_{50} obtenido de los experimentos de exposición a colchicina (1.24 μ M) con otros compuestos estudiados mediante la técnica *Allium test*, encontramos que nuestro valor es igual al del compuesto MNNG (Metil-nitro-nitrosoguanidina) obtenido por Fiskesjö (1997, capítulo 11), siendo este de 12 μ M. Cabe destacar que éste compuesto ha sido identificado como un agente carcinógeno y mutágeno.

Por otro lado, debido a que no se pudo determinar el EC_{50} de la colchicina con recuperación, se considera que éste puede ser un factor crucial a la hora del diseño de un experimento, se recomienda hacer un ensayo con un intervalo de concentraciones más amplio hacia concentraciones más altas. Asimismo, como se aprecia en la figura 12, la gráfica de colchicina con recuperación parece tener un posible comportamiento de hormesis, lo cual queda pendiente para estudiar en trabajos futuros.

Con base en la prueba ANOVA de dos vías realizada, se tiene que no hay diferencia significativa entre el tiempo de exposición, pero si hay significancia en cuanto a la concentración. Esto indica que, independientemente del tiempo en el que se lleve a cabo el ensayo, la concentración va a ser la determinante para la obtención de cierto I.M. y porcentaje de daño. Así mismo, también se encontró significancia en cuanto al valor de I.M. con respecto al tiempo y la concentración, por lo que, para la determinación de un control positivo con colchicina, es necesario tener en cuenta una concentración que se ajuste a los parámetros que se quieran obtener.

Para el caso particular del índice mitótico se tienen que tomar en consideración ambos parámetros. Cabe recalcar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al conteo de micronúcleos, por lo que si sólo se tomara en cuenta este parámetro (como se sugiere en varios protocolos) podríamos concluir erróneamente que no hay daño genotóxico a las células. Sin embargo, hay que recordar que otro tipo de aberraciones pueden presentarse y ser un indicativo más preciso de los efectos que están ocurriendo a las células.

Dicho lo anterior y con base en Fiskesjö, G. (1995), consideramos que los ensayos genotóxicos de *Allium test* deberían llevarse a cabo en un periodo de 2 a 6 días, en donde las cebollas deben estar expuestas de manera continua tanto a los controles como a las sustancias a evaluar, que, en este caso corresponde a la concentración 0.00125 mM con un valor de I.M. de 4, 1.43% de aberraciones cromosómicas y una presencia de micronúcleos del 0.36% comparado con el control negativo.

En la actualidad no hay una parametrización estándar de aberraciones cromosómicas. La aberración más estudiada son los micronúcleos que, si bien, son lo que tienen mayor potencial de ser identificados y son un daño irreversible, consideramos que no se deben excluir los demás defectos debido a que pueden ser precursores de micronúcleos (en el caso de puentes, yemas y defectos cromosómicos). Además de lo anteriormente mencionado, es necesario tener en cuenta el tiempo de exposición y la longitud de la raíz, estos al menos deben ser 24 h (dos ciclos de replicación) y 3 mm de longitud para poder observar aberraciones cromosómicas (Ma et al., 1995). Por lo que se considera que la clasificación que se utiliza en el presente trabajo podría ser de ayuda para futuros ensayos de genotoxicidad, independientemente si algunas aberraciones

tienen más posibilidad de ser reparadas, todos y cada una son un indicio de daño genotóxico.

Un dato por resaltar es que, tanto el AgNO_3 como varias concentraciones de ambas nanopartículas poseen un número elevado de puentes, lo cual es un indicador de los agentes clastogénicos (Ateeq, 2002). Se especula que iones plata liberados por ambas formulaciones (AgNP1 y AgNP4) causan la ruptura de los cromosomas, provocando así la generación de cromosomas dicéntricos, lo cual explica una mayor presencia de puentes con respecto a C-, C++ y PVP. Además, de acuerdo con McShan (2014), las nanopartículas de plata inhiben la proliferación celular, lo cual se comprueba debido a que en todas las concentraciones de ambas nanopartículas se obtuvieron valores de índice mitótico menor al encontrado para C-.

Para comprobar que las nanopartículas poseen un carácter clastogénico, en teoría, los micronúcleos encontrados en las células expuestas a nanopartículas deberían ser más pequeños que los encontrados en las células expuesta a colchicina, debido a que los micronúcleos creados por rupturas de cromosomas poseen una menor cantidad de material genético y, por ende, un menor tamaño.

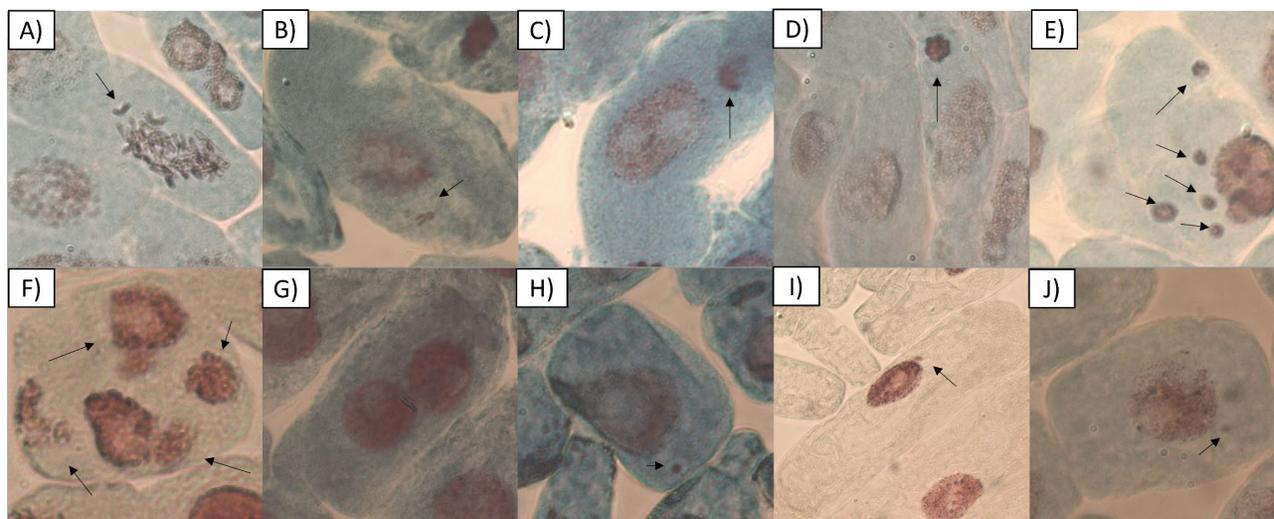


Figura 44. Los defectos encontrados en muestras expuestas a colchicina [1.25 mM] en diferentes tiempos con y sin recuperación son **A)** cromosoma vagabundo en C-metafase; **B)** cromosoma vagabundo antes de convertirse en micronúcleo; **C)** y **D)** micronúcleo; **E)** célula con múltiples micronúcleos; **F)** célula polinucleada; **G)** célula binucleada; **H)** micronúcleos producidos por AgNPs 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Micronúcleos producidos por AgNPs 4 a **I)** 100 y **J)** 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Como se aprecia en la figura anterior, los micronúcleos creados por la colchicina (Fig. 44 C-D) efectivamente son más grandes que los generados por las nanopartículas (Fig. 44 H-J), incluso se alcanzaron a apreciar los característicos cromosomas vagabundos (Fig. 44 A-B). Además, al ser la colchicina un agente aneugénico, se pudieron observar otras aberraciones cromosómicas peculiares como células con múltiples micronúcleos (Fig. 44 E) y células bi- y polinucleadas (Fig. 44 F-G).

Este método para discernir entre un agente clastogénico y aneugénico mediante el tamaño de los micronúcleos ha sido ampliamente utilizado. Prueba de esto son los trabajos de Yamamoto (1980), Vanderkerken (1989), Torous (1998) y Miller (1992). Así mismo, estos autores concuerdan que los micronúcleos producidos por agentes aneugénicos poseen un mayor tamaño que aquellos causados por agentes clastogénicos. Sin embargo, Stopper & Müller (1997) consideran que este método no es tan fiable debido a que un agente clastogénico a altas concentraciones podría causar un mayor número de rupturas de cromosomas y, al tener una mayor cantidad de fragmentos, estos se podrían unir provocando micronúcleos más grandes, por lo que sugieren analizar la presencia de señales del cinetocoro en los micronúcleos. De esta manera se podría afirmar si el micronúcleo fue formado por cromosomas acéntricos o por cromosomas vagabundos.

Considerando la discusión anterior, se sugiere realizar un ensayo más específico en donde se mida el tamaño promedio de los micronúcleos causados tanto por un agente clastogénico como un aneugénico a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Posteriormente, realizar otro ensayo para verificar la existencia o inexistencia de cinetocoros en los micronúcleos presentes en las células expuestas a ambos agentes. Lo anterior con el fin de confirmar la correlación que tiene el tamaño de los micronúcleos con el agente genotóxico a estudiar.

Así mismo, los resultados del presente trabajo se pueden comparar con los resultados obtenidos por el Dr. Casillas, ya que el experimento se llevó a cabo con concentraciones iguales, condiciones de laboratorio muy similares y con nanopartículas de plata. Sin embargo, es necesario considerar que las propiedades fisicoquímicas de las AgNPs difieren significativamente en algunos parámetros con respecto a las empleadas en este experimento (Tabla 8).

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas utilizadas por Casillas (2020) (AgNP A) y las empleadas en este trabajo (AgNP1 y AgN4).

Propiedades:	AgNP 1	AgNP 4	AgNP A
Distribución de tamaño por TEM (nm)	5-40	5-40	1-90
Diámetro hidrodinámico (nm)	448.7	483.2	70
Potencial Z (mV)	-0.872	-0.464	-5
Plasmón de resonancia (λ)	415	406.549	420
Plata metálica (% w/w)	1.14 \pm 0.02	1.19 \pm 0.01	1.2
PVP (%w/w)	19.62 \pm 0.30	20.92 \pm 0.42	18.8
Morfología	Esférica	Esférica	Esférica

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los obtenidos por el Dr. Casillas podemos observar que las AgNPs estudiadas en el presente trabajo inducen una inhibición de la elongación de las raíces. La AgNPs A solo inhibe el crecimiento de las en las dos concentraciones más altas (100 y 75 $\mu\text{g/mL}$), mientras que ninguna concentración de AgNPs 1 o AgNPs 4 logró alcanzar una elongación promedio igual o mayor al C- después de 72 h de exposición.

Por otro lado, en cuanto a la cantidad de raíces, se presenta un comportamiento muy similar en las 3 formulaciones de AgNPs. Todas las concentraciones de AgNPs 4 y AgNPs A presentaron un número mayor de raíces después de 72 h de exposición con respecto al C-. En cambio, AgNPs 1 presentó un menor número de raíces en las concentraciones de 100 y 75 $\mu\text{g/mL}$.

Al comparar el IM se encontró una gran discrepancia entre los resultados con AgNPs A y las formulaciones estudiadas en este trabajo. AgNPs A produce índices mitóticos mayores que el control negativo en todas las concentraciones, mientras que AgNPs 1 y AgNPs 4 presentaron índices mitóticos menores que el control negativo en todas las concentraciones, lo que nos indica un mayor daño fitotóxico para estas dos últimas formulaciones respecto a AgNPs A.

Para finalizar, todas las concentraciones de AgNPs A evaluadas presentaron una menor cantidad de micronúcleos comparado con el C-, mientras que en las AgNPs 1 y AgNPs 4 se presenta todo lo contrario, pues ninguna de las concentraciones evaluadas presentó una cantidad de micronúcleos menor al C-. El mayor aumento de micronúcleos se encontró en 25 µg/mL con 1312.12% ($\bar{x}=4.33$) para AgNP 1 y con 75 µg/mL para AgNP 4 con 1212.12% ($\bar{x}=4$) con respecto al control negativo ($\bar{x}=0.33$); lo cual coincide con lo hallado en la Anova de dos vías donde se encontró que existe una relación entre la concentración y la cantidad de micronúcleos (Tabla 6).

Por otro lado, Yekeen y su equipo en 2017 realizaron un experimento donde evaluaron los efectos genotóxicos de nanopartículas a concentraciones de entre 0.01 a 100 µg/mL, sintetizadas mediante cáscara de mazorca de cacao biogénica (CPHE-AgNPs) y grano de cacao (CBE-AgNPs) en *Allium cepa*. Las nanopartículas poseen forma esférica y un tamaño de 4 a 32 nm para CPHE-AgNPs y de 8.96 a 54.22 nm para CBE-AgNPs. En el trabajo mencionado se obtuvieron índices mitóticos menores al C- en todas las concentraciones de ambas AgNPs en los distintos tiempos de estudio (24, 48 y 72 h). También observaron una disminución paulatina conforme aumentaba la concentración de AgNPs, teniendo así una dependencia entre el IM y la concentración de AgNPs. La disminución del IM se observa en los resultados obtenidos con AgNP1 y AgNP4. Sin embargo, no se presenta el efecto dependiente de la concentración. En AgNP1 se presenta una disminución abrupta de IM después de 15 µg/ml presente, mientras que en AgNP4 el efecto sobre IM es muy similar en concentraciones de 5 a 25 µg/ml siendo la disminución más evidente a los 75 µg/ml. Estos resultados hablan de la diferencia en fitotoxicidad para cada formulación en el modelo *Allium cepa*.

Los valores de EC₅₀ para CPHE-AgNPs y CBE-AgNPs fueron 1.369 µg/mL y 3.17 µg/mL, respectivamente. Esos resultados se encuentran muy por debajo de los intervalos propuestos para AgNPs 1: 15-25 mg/mL y AgNPs 4: 25-50 µg/mL. Además, es importante considerar que los valores para CPHE-AgNPs y CBE-AgNPs se refieren a la formulación completa, mientras que los valores para AgNP1 y AgNP4 corresponden solo a la plata metálica contenida en cada formulación. Si se considera el valor de la formulación completa para AgNP1 y AgNP4 los intervalos son todavía mayores: 273.15-455.26 µg/mL y 464.49-928.99 µg/mL, respectivamente. Estos resultados nos indican la influencia del

recubrimiento en la inhibición del crecimiento de las raíces, por lo que se puede concluir que las AgNPs recubiertas con PVP requieren una mayor concentración para inhibir el crecimiento de las raíces a la mitad y por tanto, son entre 10.95 a 18.26 y 18.26 a 36.52 comparando con CPHE-AgNPs y; entre 4.73 a 7.88 y 7.88 a 15.77 comparando con CBE-AgNPs veces menos fitotóxicas para *Allium cepa* respectivamente.

Por otro lado, Pesnya en el 2013 realizó un ensayo de genotoxicidad en *Allium cepa* de AgNPs (10-30 nm) recubiertas con quitosano (2-3 nm) utilizando concentraciones de 1, 2.5, 5 y 50 µg/mL. En este trabajo se encontró que todas las concentraciones estudiadas de esta formulación de AgNPs producía un I.M. mayor al del control, resaltando que en la concentración de 50 µg/mL hubo un aumento de casi el doble. Los resultados reportados por Pesnya difieren completamente con los resultados obtenidos en el presente estudio, lo cual puede deberse al tipo de recubrimiento, teniendo así que las AgNPs recubiertas de quitosano promueven la proliferación celular, mientras que el PVP inhibe la proliferación celular dependiendo del tamaño del polímero usado como recubrimiento.

En cuanto a aberraciones cromosómicas, Pensya (2013) estudió la presencia de micronúcleos, defectos cromosómicos y puentes núcleo plasmáticos. En general, solo encontró cambios significados con respecto al control en la concentración de 50 µg/m en todos los tipos de daño. Por el contrario, en este trabajo las AgNPs recubiertas con PVP presentan un porcentaje de daño mayor que el C- desde la concentración más baja, con la excepción de la concentración de 75 µg/mL en ambas formulaciones, ya que obtuvieron un porcentaje igual o menor de aberraciones cromosómicas que el C-.

Adicionalmente, creemos pertinente considerar las zonas en donde se realiza el conteo de células, ya que de acuerdo con Ma y colaboradores (1995), las células con daño genético se encontraron en la zona F1, zona en donde se encuentran las células hijas después de dos ciclos de replicación (a 3 mm de la punta). Frecuentemente en los trabajos con *Allium test* solo consideran los primeros 2 mm, en donde se encuentran las células meristemáticas en plena replicación celular, por lo cual los conteos de índice mitótico o daño pueden llegar a variar entre autores.

En cuanto a la evaluación estadística de los parámetros microscópicos evaluados, podemos inferir varias propiedades de las nanopartículas. En el caso de AgNP 1

podemos considerar que el PVP K15 puede influir en la duplicación celular afectando el índice mitótico, ya que fue el único control con el que todas las concentraciones de nanopartículas no mostraron diferencias significativas. En cuanto al control con agua es posible mencionar que concentraciones menores de 25 µg/mL de la nanopartícula no tienen diferencias estadísticamente significativas, concluyendo que en concentraciones bajas la AgNP1 no alteran el índice mitótico.

Asimismo, para AgNP 1 se observó que no existían diferencias significativas de las concentraciones con respecto a los controles en el porcentaje de daño, por lo que se infiere que AgNP1 no presenta un daño genético significativo.

La similitud en la respuesta observada para todas las concentraciones de AgNP1 con el control de PVP K-15 y la baja cantidad de daño (en especial con el control con agua) se puede sugerir que en AgNP1, el PVP K-15 cumple una función de reducción de daño genotóxico.

Por otro lado, en el caso de AgNP 4, el control con el que todas las concentraciones de esta formulación no presentaron diferencias significativas en el índice mitótico fue la colchicina a 0.00125 mM (72 h, C++); de igual forma, en el porcentaje de daño no tuvo diferencias significativas.

Respecto a los controles con agua y colchicina a 0.125 mM (4+68 h, C+), comienzan a existir diferencias significativas en concentraciones de AgNPs de 50 µg/mL en adelante, es decir, en altas concentraciones de AgNP 4 el índice mitótico se reduce notablemente. Sin embargo, como no hay diferencias significativas en el porcentaje de daño genético generado, podemos estimar que solo se ven reducidos los ciclos de división hasta que la cebolla encuentre condiciones más favorables para desarrollarse, lo cual coincide con lo observado en el crecimiento de las raíces, ya que se aprecia que hubo una gran proliferación, pero no crecimiento.

Una característica que comparten ambas formulaciones de nanopartículas está relacionada con el porcentaje de daño, puesto que únicamente a concentraciones de 75 y 50 µg/mL, las nanopartículas presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control de colchicina a 0.125 mM (4+68 h, C++), por lo que podemos asumir que el índice mitótico es afectado para estas concentraciones, el daño generado es significativamente menor que el daño provocado por el control de colchicina. En este

punto hay que tomar en cuenta que un gran daño citotóxico puede enmascarar el daño genotóxico.

Posteriormente, comparando las dos formulaciones de AgNPs a sus distintas concentraciones, concluimos que sus efectos a concentraciones iguales no son estadísticamente diferentes. Empero, al comparar concentraciones altas con bajas entre ellas, se determina que la concentración a la que hay mayor diferencia significativa es entre 10 $\mu\text{g/mL}$ para AgNP 1 y 15 $\mu\text{g/mL}$ para AgNP 4. En contraste, para el porcentaje de defectos no había diferencias significativas entre ambas formulaciones, estimando de esta manera que el daño generado es igual para las dos nanopartículas.

En cuanto parámetros macroscópicos como el crecimiento, podemos determinar que la AgNP1 promueve más el crecimiento de las raíces que la AgNP4; ya que a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ las raíces expuestas a AgNP1 crecen un 96.48% del total de crecimiento respecto al control con agua, en contraste con la AgNP4 que a 10 $\mu\text{g/mL}$ es su máximo crecimiento a 96.20% del total del control con agua.

Como se sabe, las radiografías son pruebas médicas para la observación de materia densa, como son los huesos y los metales. Al realizar una radiografía a un algodón embebido en la AgNP 1, se puede comprobar la existencia de plata metálica en las formulaciones de nanopartículas dado el brillo que esta presentó. Por ende, al realizar una radiografía a las cebollas, se confirmó que justo en donde las cebollas presentaban coloración existía un brillo similar, confirmando la presencia de nanopartículas en dichas zonas de la muestra.

Finalmente, se puede decir que la microscopía de fluorescencia con naranja de acridina es más útil para diferenciar aberraciones cromosómicas (principalmente micronúcleos) ya que, a diferencia de la tinción verde rápido-orceína acética, no hay confusión entre micronúcleos con partículas del tinte que no se alcanzaron a lavar, lo cual también es recomendado por Dias (2005), Kwasniewska & Bara (2022) y Miller (1992). Sin embargo, a la hora de conteo de células, creemos que es más conveniente utilizar la tinción de orceína acético u orceína acético-verde rápido, debido a que es más fácil diferenciar entre células y provoca menor fatiga ocular.

Conclusiones

Trabajo actual

Se concluye que la *Allium cepa* expuesta a colchicina va a ver disminuido su índice mitótico y aumentará la cantidad de daños cromosómicos conforme se aumente la concentración, sin embargo, el tiempo de exposición no es un factor determinante. Asimismo, si se desea utilizar a la colchicina como un control positivo para la evaluación en cebollas la exposición a 0.125 mM por 4 h más 68 h de recuperación, o una concentración de 0.00125 mM a 72 h continuas son ideales por mantener un buen índice mitótico y además presentar una cantidad adecuada de daño que sirva como referencia de genotoxicidad. Adicionalmente es de destacar que para la colchicina el EC₅₀ con una exposición continúa se encuentra en 0.125 mM con 50.33% de inhibición.

Por su parte la AgNP formulación 1 tiene un comportamiento de índice mitótico y porcentaje de daño similar al control PVP K-15, por lo que podemos estimar que el recubrimiento de la nanopartícula no produce daños citogenotóxicos. Su valor de EC₅₀ se encuentra entre 15 y 25 µg/mL.

Asimismo, la formulación 4 de AgNPs mostró un comportamiento estadísticamente similar a la colchicina a 0.00125 mM (72 h), por lo que de forma aparente presentan similitudes en cuanto a los efectos que provocan. Adicionalmente se considera que aún en concentraciones altas no se provoca un daño genotóxico, sino solo se observa la reducción de la división celular. El valor de EC₅₀ se encuentra entre 25 y 50 µg/mL.

Se concluye que el uso de ambas formulaciones de nanopartículas de plata no genera daños genotóxicos en *Allium cepa* a concentraciones menores a 100 µg/mL. Además, las AgNPs evaluadas en este trabajo son agentes clastogénicos debido al tamaño de sus micronúcleos y la mayor frecuencia de puentes, los cuales son indicadores de rupturas de cromosomas.

Entre ambas formulaciones, estadísticamente representan el mismo riesgo de generación de daños; pero en el índice mitótico la AgNP 1 es más favorecedora. Sin embargo, considerando factores macroscópicos se concluye que AgNP 4 es menos dañina dado que presenta en general, un mayor crecimiento de raíces, tanto en número como en longitud, además posee un intervalo de EC_{50} mayor, al igual que un IMC promedio mayor y un promedio de porcentaje de daño menor, lo cual es directamente atribuido a su recubrimiento (PVP-K30).

Finalmente, se comprobó mediante una placa de Rayos X la presencia de aglomerados de AgNPs en las raíces que presentaban una coloración café, correspondientes a las concentraciones de: 100, 75, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$ para el caso de AgNPs 1 y; 100, 75 y 50 $\mu\text{g/mL}$ para el caso de AgNPs 4.

Trabajo futuro

En cuanto a la determinación del EC₅₀ del fármaco colchicina, se recomienda utilizar un intervalo de concentraciones más amplio hacia mayores concentraciones en muestras con recuperaciones (4 + 68 h) para obtener un valor más certero.

Se recomienda realizar un estudio más sistemático relacionado con la determinación del tamaño de los micronúcleos generados por los agentes a evaluar para determinar si un agente es clastogénico o aneugénico. A su vez, se recomienda que se lleve a cabo un ensayo donde se corrobore la presencia de cinetocoros en los micronúcleos mediante la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) con sondas de ADN que se unen a secuencias de ADN centroméricas Stopper & Müller (1997).

Se considera determinar de manera más precisa el EC₅₀ para las nanopartículas, por ello sería importante la evaluación de concentraciones entre 15 y 25 µg/mL para la formulación 1 (incluso menores a los 10 µg/mL) y para la formulación 4 entre 25 y 50 µg/mL.

Si bien se encontró que la formulación 1 de AgNP posee un comportamiento similar de índice mitótico y porcentaje de daño con respecto a la colchicina a 0.00125 mM (72 h), es recomendable realizar una evaluación más profunda respecto a daños genotóxicos diferentes a los micronúcleos, para poder determinar si su mecanismo de acción es similar.

En cuanto a la evaluación de las nanopartículas, se infiere que el recubrimiento de PVP (así como su grado específico de polimerización) ayuda a reducir el porcentaje de daño, por lo que sería conveniente realizar un ensayo con una nanopartícula de plata con propiedades iguales a las formulaciones pero sin recubrimiento, así como con grados de polimerización mayor del PVP, ya que se vio que el K-30 es más favorecedora y sería de utilidad determinar si entre mayor el valor de K hay una menor genotoxicidad de las nanopartículas.

Finalmente, como se ha mencionado por autores como Bonciu (2018) la evaluación de daño genotóxico en plantas superiores puede ser un precedente para la realización de estudios en animales, por lo que se sugiere comparar los efectos de estas formulaciones de nanopartículas con los efectos en otras células animales para determinar el grado de extrapolación que pueden tener los estudios realizados en plantas. En específico se sugiere seguir con protocolos de la OCDE como el *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test* (OECD, 2016b), para la evaluación de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos, ya que de esta forma se podría tener una mejor estandarización de la evaluación de este tipo de nanomateriales.

Anexos

Anexo 1. Comparación entre controles y diferentes concentraciones de AgNPs formulación 1 por medio de la prueba de Tukey.

Tabla A1. Comparación por Test de Tukey de los parámetros medidos respecto a las distintas concentraciones de la AgNP1.

		AgNp 1 [$\mu\text{g/mL}$]						
		100	75	50	25	15	10	5
Índice Mitótico	C+	.000*	.000*	.000*	.000*	.838	1.000	.802
	C++	.050*	.166	.123	.090	1.000	.972	1.000
	C-	.000*	.000*	.000*	.000*	.934	1.000	.912
	PVP K-15	.065	.204	.154	.114	1.000	.952	1.000
	AgNO ₃	.005*	.023*	.016*	0.11	1.000	1.000	1.000
Micro núcleos	C+	1.000	.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	C++	1.000	.978	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	C-	1.000	1.000	.943	.789	.999	1.000	1.000
	PVP K-15	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	AgNO ₃	1.000	1.000	1.000	.994	1.000	1.000	1.000

*Considerando $p < 0.05$

Continúa en la siguiente página.

Continuación de tabla A1.

		AgNp 1 [$\mu\text{g/mL}$]						
		100	75	50	25	15	10	5
Índice de Daño	C+	.607	.006*	.027*	.147	.554	.758	.355
	C++	1.000	.988	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	C-	.996	1.000	1.000	1.000	.998	.980	1.000
	PVP K-15	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	AgNO ₃	1.000	.954	.999	1.000	1.000	1.000	1.000

*Considerando $p < 0.05$

Anexo 2. Comparación entre controles y diferentes concentraciones de AgNPs formulación 4 por medio de la prueba de Tukey.

Tabla A2. Comparación por Test de Tukey de los parámetros medidos respecto a las distintas concentraciones de la AgNP4.

		AgNp 4 [$\mu\text{g/mL}$]						
		100	75	50	25	15	10	5
Índice Mitótico	C+	.001*	.000*	.005*	.106	.912	.652	.178
	C++	.489	.083	.821	1.000	1.000	1.000	1.000
	C-	.002*	.000*	.010*	.178	.972	.802	.283
	PVP K-30	.016*	.001*	.060	.559	1.000	.993	.720
	AgNO ₃	.106	.010*	.301	.952	1.000	1.000	.988
Micro núcleos	C+	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	C++	1.000	1.000	1.000	1.000	.999	1.000	.999
	C-	1.000	.880	.978	1.000	1.000	.978	1.00
	PVP K-30	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	AgNO ₃	1.000	.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

*Considerando $p < 0.05$

Continua en la siguiente página.

Continuación de tabla A2.

		AgNp 4 [$\mu\text{g/mL}$]						
		100	75	50	25	15	10	5
Índice de Daño	C+	.235	.004*	.033*	.271	.173	.124	.073
	C++	1.000	.969	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	C-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	PVP K-30	1.000	.758	.993	1.000	1.000	1.000	1.000
	AgNO ₃	1.000	.909	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

*Considerando $p < 0.05$

Anexo 3. Comparación del índice mitótico entre diferentes concentraciones de AgNPs formulaciones 1 y 4 por medio de la prueba de Tukey.

Tabla A3. Comparación del índice mitótico entre ambas formulaciones de AgNPs.

		AgNP 1 [$\mu\text{g/mL}$]						
		100	75	50	25	15	10	5
AgNP 4	100	1.000	1.000	1.000	1.000	.250	.012*	.283
	75	1.000	1.000	1.000	1.000	.030*	.001*	.035*
	50	.977	1.000	.999	.996	.559	.046*	.606
	25	.379	.720	.629	.535	.997	.489	.998
	15	.011*	.042*	.030*	.021*	1.000	1.000	1.000
	10	.039*	.133	.098	.071	1.000	.985	1.000
	5	.250	.559	.466	.379	1.000	.652	1.000

*Considerando $p < 0.05$

Anexo 4. Comparación del índice de daño entre diferentes concentraciones de AgNPs formulaciones 1 y 4 por medio de la prueba de Tukey.

Tabla A4. Comparación del índice de daño entre ambas formulaciones de AgNPs.

		AgNP 1 [ug/mL]						
		100	75	50	25	15	10	5
AgNP4	100	1.000	.993	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	75	.758	1.000	1.000	.996	.803	.607	.934
	50	.993	1.000	1.000	1.000	.996	.969	1.000
	25	1.000	.988	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	15	1.000	.998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.996	1.000

*Considerando $p < 0.05$

Referencias

- Ahirwar, R., & Verma, R. C. (2015). Colchicine induced asynaptic chromosomal behavior at meiosis in *Allium cepa* L. *The Nucleus; an International Journal of Cytology and Allied Topics*, 58(1), 47–51. <https://doi.org/10.1007/s13237-015-0133-4>
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E. G., Tice, R., Waters, M. D., & Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111–172. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(00\)00049-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(00)00049-1)
- Almeida, H., & Godinho Ferreira, M. (2013). Spontaneous telomere to telomere fusions occur in unperturbed fission yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 41(5), 3056–3067. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1459>
- Ateeq, B., Abul Farah, M., Niamat Ali, M., & Ahmad, W. (2002). Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 514(1–2), 105–113. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00327-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00327-8)
- Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K. J., & Gagné, F. (2019). The influence of surface coatings of silver nanoparticles on the bioavailability and toxicity to *Elliptio complanata* mussels. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/7843025>

- Aydın, G., & Liman, R. (2020). Cyto-genotoxic effects of Pinoxaden on *Allium cepa* L. roots. *Journal of Applied Genetics*, 61(3), 349–357. <https://doi.org/10.1007/s13353-020-00560-w>
- Barbério, A., Voltolini, J. C., & Mello, M. L. S. (2011). Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology (London, England)*, 20(4), 927–935. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0602-8>
- 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; Giornale Di Citologia, Citosistemica, e Citogenetica*, 71(3), 191–209. <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1503496>
- Bosio, S., & Laughinghouse, H. D., IV. (2012). Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. En *Environmental Contamination*. InTech.
- Cameron, S., Hosseinian, F., & Willmore, W. (2018). A current overview of the biological and cellular effects of nanosilver. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2030. <https://doi.org/10.3390/ijms19072030>
- Casillas-Figueroa, F., Arellano-García, M. E., Leyva-Aguilera, C., Ruíz-Ruíz, B., Luna Vázquez-Gómez, R., 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 (Basel, Switzerland)*, 10(7), 1386. <https://doi.org/10.3390/nano10071386>
- Cervantes, R. A. Á., Montelongo, G. M., Pech, P. G. G., Castro, C. A. S., & Acosta, F. D. J. T. (2019). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrocencias*, 12(1).
- Chakraborty, T., Roy, S., Barman, M., & Ray, S. (2021). Cell cycle delay and colchicine like metaphase inducing effects of *Scutellaria discolor* colebr. Herb aqueous extract in *Allium cepa* root apical meristem cells. *Cytologia*, 86(3), 255–260. <https://doi.org/10.1508/cytologia.86.255>
- Cruz-Ramírez, O. U., Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A., Rodríguez-Arenas, J. A., Mier-Maldonado, P. A., García-Ramos, J. C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., & Toledano-Magaña, Y. (2021). Antitumor activity against human colorectal adenocarcinoma of silver nanoparticles: Influence of [Ag]/[PVP] ratio. *Pharmaceutics*, 13(7), 1000. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071000>
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.-M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., & Balen, B. (2017). Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>

- Dias, V. M., Manelli-Oliveira, R., & Machado-Santelli, G. M. (2005). Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. *Mutation Research*, 565(2), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.10.003>
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C. L., Kreyling, W., & Borm, P. J. A. (2004). Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61(9), 727–728. <https://doi.org/10.1136/oem.2004.013243>
- Eigsti, O. J., & Dustin, P. (1955). *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry*. Iowa State College Press.
- European Commission, Joint Research Centre (JRC). (2019). *EURL ECVAM dataset on alternative methods to animal experimentation (DB-ALM)*. European Commission, Joint Research Centre (JRC) [Dataset] PID: <http://data.europa.eu/89h/b7597ada-148d-4560-9079-ab0a5539cad3>
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., & Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125–132. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>
- Fina, B. L., Lombarte, M., & Rigall, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actualizaciones en Osteología*, 9(3), 283–288.

- Fiskesjö, G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99–112. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>
- Fiskesjö, G. (1995). Allium test. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 43, 119–127. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:119>
- Fiskesjö, G. (1997) Allium Test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters Wang, W. *Plants for Environmental Studies* (pp. 308-329) (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/978142004871>
- García, P. P. (2018). *Fármacos contra microtúbulos*. Universidad de la Laguna.
- Geoffriau, E., Kahane, R., Bellamy, C., & Rancillac, M. (1997). Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 122(2), 201–208. [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(96\)04556-6](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(96)04556-6)
- Grant, W. F. (1978). Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. *Environmental health perspectives*, 27, 37. <https://doi.org/10.2307/3428860>
- Grant, W. F. (1982). Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 99(3), 273–291. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-x](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-x)

- Grant, W. F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, 310(2), 175–185. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0)
- Guerra, M., & de Souza, M. J. (2002). *Como observar cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana*. Funpec, Ribeirão Preto, SP.
- Haaf, F., Sanner, A., & Straub, F. (1985). Polymers of N-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. *Polymer journal*, 17(1), 143–152. <https://doi.org/10.1295/polymj.17.143>
- Hastie, S. B. (1991). Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacology & Therapeutics*, 51(3), 377–401. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(91\)90067-v](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90067-v)
- Hawkes, J. G. (1942). Some effects of the drug colchicine on cell division. *Journal of Genetics*, 44(1), 11–22. <https://doi.org/10.1007/bf02982764>
- Hiremath, P., Nuguru, K., & Agrahari, V. (2019). Material attributes and their impact on wet granulation process performance. En *Handbook of Pharmaceutical Wet Granulation* (pp. 263–315). Elsevier.
- Hlatky, L., Sachs, R. K., Vazquez, M., & Cornforth, M. N. (2002). Radiation-induced chromosome aberrations: insights gained from biophysical modeling. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(8), 714–723. <https://doi.org/10.1002/bies.10126>

- Huret, J. L., C., L., & Savage, J. R. (2000). *Cromosomas, anomalías cromosómicas*. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://atlasgeneticsoncology.org/teaching/30092/cromosomas-anomal-as-cromos-oacute;micas>
- Hyypio, P. A. (1954). *The effects of colchicine upon the mechanism of mitosis*. Michigan State College of Agriculture and Applied Science. Department of Botany and Plant Pathology.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer*, 4(4), 253–265. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
- Koczkur, K. M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., & Skrabalak, S. E. (2015). Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, 44(41), 17883–17905. <https://doi.org/10.1039/c5dt02964c>
- Kumari, M., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2009). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *The Science of the Total Environment*, 407(19), 5243–5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>

- Kumbar, S., Laurencin, C., & Deng, M. (Eds.). (2014). *Natural and synthetic biomedical polymers*. Elsevier Science & Technology.
- Kundu, L. M., & Ray, S. (2017). Mitotic abnormalities and micronuclei inducing potentials of colchicine and leaf aqueous extracts of *Clerodendrum viscosum* Vent. in *Allium cepa* root apical meristem cells. *Caryologia; Giornale Di Citologia, Citosistemica, e Citogenetica*, 70(1), 7–14. <https://doi.org/10.1080/00087114.2016.1254452>
- Kwasniewska, J., & Bara, A. W. (2022). Plant cytogenetics in the micronuclei investigation-the past, current status, and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms23031306>
- Leme, D. M., de Angelis, D. de F., & Marin-Morales, M. A. (2008). Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 88(4), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.012>
- Leme, D. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*, 682(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, 24(4), 471–486. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>

- Lindberg, H. K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G. C.-M., Norppa, H., & Fenech, M. (2007). Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*, 617(1–2), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.12.002>
- Liu, J., & Jiang, G. (Eds.). (2016). *Silver nanoparticles in the environment*. Springer.
- Lopez, V., Barinova, N., Onishi, M., Pobiega, S., Pringle, J. R., Dubrana, K., & Marcand, S. (2015). Cytokinesis breaks dicentric chromosomes preferentially at pericentromeric regions and telomere fusions. *Genes & Development*, 29(3), 322–336. <https://doi.org/10.1101/gad.254664.114>
- Ma, T.-H. (1982). Vicia cytogenetic tests for environmental mutagens. *Mutation Research*, 99(3), 257–271. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90045-8](https://doi.org/10.1016/0165-1110(82)90045-8)
- Ma, T.-H., Cabrera, G. L., & Owens, E. (2005). Genotoxic agents detected by plant bioassays. *Reviews on Environmental Health*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1515/reveh.2005.20.1.1>
- 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)
- Maier, M. (2017). *Origin of chromatin anaphase bridges*. Universitat Pompeu Fabra.

- Masarovičová, E., & Králová, K. (2013). Metal Nanoparticles and Plants / Nanoczastki Metaliczne I Rośliny. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 20(1), 9–22. <https://doi.org/10.2478/eces-2013-0001>
- McShan, D., Ray, P. C., & Yu, H. (2014). Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
- Milewska-Hendel, A., Zubko, M., Karcz, J., Stróż, D., & Kurczyńska, E. (2017). Fate of neutral-charged gold nanoparticles in the roots of the *Hordeum vulgare* L. cultivar Karat. *Scientific Reports*, 7(1), 3014. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02965-w>
- Miller, B. M., Werner, T., Weier, H. U., & Nüsse, M. (1992). Analysis of radiation-induced micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes. *Radiation Research*, 131(2), 177–185. <https://doi.org/10.2307/3578439>
- Muñoz-Solarte, D. M., & Guerrero-Pepinosa, N. (2013). Allium test para evaluar el efecto citotóxico y genotóxico de extractos naturales en células meristemáticas de *Allium cepa*. *Memorias*, 11(19), 83-86.
- Nelson, J. S. R. (1972). Aspects of the mechanism of colchicine response in *Allium cepa* and *Luzula purpurea*. I. Cytology and 3h-colchicine autoradiography. *Canadian Journal of Genetics and Cytology. Journal Canadien de Genetique et de Cytologie*, 14(2), 279–286. <https://doi.org/10.1139/g72-035>

Nurieva, E. V., Zefirov N. A., Fritsch, N., Milaeva E. R., Kuznetsov S.A., & Zefirova O. N. (2020) Molecular design and synthesis of new heterobivalent compounds based on chlorambucil and colchicine, *Mendeleev Communications*, 30(6), 706-708. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.11.005>

OECD. (2006a). *Test no. 208: Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070066-en>

OECD. (2006b). *Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264067295-en>

OECD. (2016a). *Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264649-en>

OECD. (2016b). *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>

OECD. (2016c). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>

- Östergren, G. (1944). Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. *Hereditas*, 30(3), 429–467. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1944.tb02739.x>
- Panda, K. K., Achary, V. M. M., Phaomie, G., Sahu, H. K., Parinandi, N. L., & Panda, B. B. (2016). Polyvinyl polypyrrolidone attenuates genotoxicity of silver nanoparticles synthesized via green route, tested in *Lathyrus sativus* L. root bioassay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 806, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.05.006>
- Pesnya, D. S. (2013). Cytogenetic effects of chitosan-capped silver nanoparticles in the *Allium cepa* test. *Caryologia; Giornale Di Citologia, Citosistemica, e Citogenetica*, 66(3), 275–281. <https://doi.org/10.1080/00087114.2013.852342>
- Raigosa, M. (2002). *Ambystoma sp: nuevo modelo para la prueba de micronúcleos*. Universidad de Guadalajara.
- Ronchi, V. N. (1970). The effect of colchicine on subchromatid exchanges in root meristem cells of *Vicia faba* and *Allium cepa*. *Mutation Research*, 9(4), 385–394. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(70\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(70)90020-5)
- Sabeen, M., Mahmood, Q., Ahmad Bhatti, Z., Faridullah, Irshad, M., Bilal, M., Hayat, M. T., Irshad, U., Ali Akbar, T., Arslan, M., & Shahid, N. (2020). *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1368–1374. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.011>

- Salazar Mercado, S. A., Quintero Caleño, J. D., & Rojas Suárez, J. P. (2020). Cytogenotoxic effect of propanil using the *Lens culinaris* Med and *Allium cepa* L test. *Chemosphere*, 249(126193), 126193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126193>
- Serrano-García, L., & Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events: Micronuclei and Chromatin Buds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38(1), 38–45. <https://doi.org/10.1002/em.1048>
- Shimamura, T. (1939). Cytological studies of polyploidy induced by colchicine. *Cytologia*, 9(4), 486–494. <https://doi.org/10.1508/cytologia.9.486>
- Shimizu, N. (2011). Molecular mechanisms of the origin of micronuclei from extrachromosomal elements. *Mutagenesis*, 26(1), 119–123. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq053>
- Slobodnick, A., Shah, B., Krasnokutsky, S., & Pillinger, M. H. (2018). Update on colchicine, 2017. *Rheumatology (Oxford, England)*, 57(suppl_1), i4–i11. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex453>
- Snyder, R. D., & Green, J. W. (2001). A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*, 488(2), 151–169. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(01\)00055-2](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(01)00055-2)

- Sohaebuddin, S. K., Thevenot, P. T., Baker, D., Eaton, J. W., & Tang, L. (2010). Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>
- Sponchiado, G., Adam, M. L., Silva, C. D., Silva Soley, B., de Mello-Sampayo, C., Cabrini, D. A., Correr, C. J., & Otuki, M. F. (2016). Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.026>
- Stopper, H., & Müller, S. O. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 11(5), 661–667. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(97\)00084-2](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(97)00084-2)
- Torous, D. K., Dertinger, S. D., Hall, N. E., & Tometsko, C. R. (1998). An automated method for discriminating aneugen- vs. clastogen-induced micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31(4), 340–344. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1998\)31:4<340::aid-em6>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1998)31:4<340::aid-em6>3.0.co;2-m)
- Valenzuela-Salas, L. M., Blanco-Salazar, A., Perrusquía-Hernández, J. D., Nequiz-Avendaño, M., Mier-Maldonado, P. A., Ruiz-Ruiz, B., Campos-Gallegos, V., Arellano-García, M. E., García-Ramos, J. C., Pestryakov, A., Villarreal-Gómez, L. J., Toledano-Magaña, Y., & Bogdanchikova, N. (2021). New protein-coated silver nanoparticles: Characterization, antitumor and amoebicidal activity, antiproliferative selectivity, genotoxicity, and biocompatibility evaluation. *Pharmaceutics*, 13(1), 65. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010065>

Vanderkerken, K., Vanparys, P., Verschaeve, L., & Kirsch-Volders, M. (1989). The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis*, 4(1), 6–11.
<https://doi.org/10.1093/mutage/4.1.6>

Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J. L., Colvin, V. L., Braam, J., & Alvarez, P. J. J. (2013). Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations.