



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA PRÁCTICA PARA LA ENSEÑANZA
EXPERIMENTAL DE TOXICOLOGÍA EN EL PLAN 2005 DE LA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

KARLA GIOVANNA HERNÁNDEZ PÉREZ



#@) °) 'yV@-ko@' k@, CIUDAD DE MÉXICO

2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

VOCAL: Profesor: M. en C. ALEJANDRA QUIJANO MATEOS

SECRETARIO: Profesor: M. en C. SANDRA MARÍA CENTENO LLANOS

1er. SUPLENTE: Profesor: M. en C. PAULINA DEL VALLE PÉREZ

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA,
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA 1F DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO A**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. SANDRA MARÍA CENTENO LLANOS

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

SUSTENTANTE:

KARLA GIOVANNA HERNÁNDEZ PÉREZ

AGRADECIMIENTOS

Al **Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)** por el financiamiento para la realización del proyecto PE208915 y la beca otorgada.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Objetivo general	1
1.3	Hipótesis	2
2.	ANTECEDENTES	2
2.1	Modelos para la evaluación de actividad antitumoral.....	2
2.1.1	Modelo de xenotrasplante	3
2.1.3	Modelo de ingeniería genética	4
2.1.4	Modelo de inducción de tumores por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4
2.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
2.2.1	Generalidades	5
2.2.2	Plásmido Ti	5
2.2.3	Mecanismo de inducción tumoral.....	6
2.3	<i>Annona muricata</i>	8
2.3.1	Generalidades	8
2.3.2	Acetogeninas.....	8
2.3.3	Actividad antitumoral de las acetogeninas: mecanismo general	9
3.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	11
3.2	Preparación del extracto orgánico de las semillas de <i>Annona muricata</i>	11
3.3	Preparación del medio de crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
3.4	Preparación de los discos de papa	12
3.5	Ensayo de inducción de tumores	12
3.6	Preparación de los inóculos	13
3.6	Aplicación del guion experimental en un grupo piloto y todos los grupos de la asignatura de Toxicología y el cuestionario PAPIME ...	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1	Resultados de la estandarización.....	15
4.2	Implementación del bioensayo en un grupo piloto.....	17
4.3	Implementación del bioensayo en todos los grupos	21
5.	CONCLUSIÓN.....	23
6.1	Protocolo	24
6.2	Cuestionario PAPIME para el grupo piloto	33
6.3	Rúbrica del cuestionario PAPIME para el grupo piloto	36
6.4	Cuestionario PAPIME para todos los grupos	38
6.5	Rúbrica del cuestionario PAPIME para todos los grupos.	41
7.	BIBLIOGRAFÍA	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

Debido al continuo avance en distintas ramas de la ciencia, entre ellas la Toxicología, se consideró pertinente la implementación de guiones experimentales novedosos para el plan de estudios 2005 de la Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica. De tal manera que, en el período 2015-2016 se implementó un nuevo guion experimental titulado “Ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa” a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME). El contenido de esta práctica refuerza los conocimientos adquiridos en la Unidad 4 del programa teórico de la asignatura: Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis, asimismo complementa el desarrollo académico al presentar a los estudiantes un panorama general del desarrollo y evaluación de nuevas terapias para el tratamiento del cáncer.

1.2 Objetivo general

Implementar el guión experimental “Ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa” en el curso experimental de la asignatura y posteriormente, integrarlo en el programa de estudios de Toxicología de la carrera de Química Farmacéutico Biológica para contribuir al aprendizaje y comprensión del tema Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis incluido en la Unidad 4 del programa teórico de la asignatura.

1.2.1 Objetivos particulares

- i. Estandarizar del guion experimental “Ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa”.
- ii. Implementar del guion experimental en un grupo piloto de la materia de Toxicología en el semestre 2015-2.

- iii. Implementar del guion experimental en todos los grupos de la materia de Toxicología en el semestre 2016-1.
- iv. Elaborar del protocolo experimental final para ser incluido en el manual de prácticas de la asignatura.

1.3 Hipótesis

La implementación de la práctica propuesta en el presente trabajo, permitirá una mejor correlación entre el contenido teórico y la enseñanza experimental correspondiente a la Unidad 4 de Toxicología, lo que se reflejará en un mejor desempeño al aplicar dichos conceptos en la resolución del cuestionario de evaluación del guion experimental.

2. ANTECEDENTES

2.1 Modelos para la evaluación de actividad antitumoral.

El cáncer es un término genérico que involucra a un amplio grupo de enfermedades que comparten la característica de una multiplicación incrementada de células anormales, las cuales pueden propagarse e invadir órganos distintos al de su origen [1].

Existe una gran variedad de estrategias para el tratamiento del cáncer, entre las que se incluyen la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia, entre otras, sin embargo, históricamente la quimioterapia es uno de los acercamientos más estudiados. Si bien es cierto que en la actualidad se cuenta con un abundante número de compuestos con actividad antineoplásica, no son efectivos para todos los pacientes, por lo que es necesario la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas.

El camino hacia la comercialización de una nueva molécula inicia con pruebas pre-clínicas, donde, si en ensayos *in vitro* se observa actividad citotóxica, posteriormente se busca establecer su posible actividad antitumoral en distintos modelos *in vivo*.

2.1.1 Modelo de xenotrasplante

Consiste en desarrollar un tumor en el modelo animal elegido utilizando un trasplante de células cancerosas de origen humano u otra especie.

Existen distintas versiones del xenotrasplante, siendo los modelos murinos los más usados para dicho fin. Entre las ventajas de este sistema es que se cuenta con el individuo completo, lo que permite tomar en cuenta los procesos de distribución y biotransformación de los compuestos a evaluar. En cuanto a las desventajas, la mayoría de las ocasiones se requiere que el animal receptor tenga cierto grado de inmunocompromiso, lo que incrementa los costos de alojamiento y mantenimiento, además de que en algunas ocasiones, el tumor que se desarrolla no asemeja en todas sus características al cáncer que se busca modelar y que pueden ser importantes para la efectividad del tratamiento, como la vascularización y la interacción con el microambiente [2].

2.1.2 Modelo de inducción química

Estos modelos se desarrollan exponiendo al modelo animal a distintos tipos de carcinógenos químicos bien caracterizados como son el benzopireno, el uretano, las fibras de asbesto, entre otros.

Una ventaja importante de este tipo de modelo es que una vez que se logra desarrollar el tipo de cáncer deseado, es posible realizar distintos esquemas de tratamiento que pueden involucrar combinaciones de agentes y vías de administración. Por otro lado, una de las principales desventajas es el tiempo que se requiere para desarrollar la enfermedad en el modelo animal, además de que se debe considerar que debido a la variabilidad genética, no todos los individuos desarrollarán el tipo de cáncer esperado, lo que puede incrementar los costos del mantenimiento de los animales hasta por un periodo de meses o incluso años [2].

2.1.3 Modelo de ingeniería genética

Con el conocimiento de la biología básica del cáncer se han identificado una serie de genes que al ser blanco de mutaciones, pueden ganar funciones y adquirir la capacidad de transformar células normales (oncogenes) o perder funciones que son importantes para el mantenimiento de la homeostasis celular (genes supresores de tumor), la combinación de estas señales tienen como resultado la transformación maligna de las células. El objetivo de los modelos de ingeniería genética es introducir o modificar dichos genes en las células del modelo animal y de esta manera, propiciar el desarrollo de un cáncer en particular. Una de las grandes ventajas de estos modelos es la oportunidad de poder evaluar agentes diseñados con un blanco particular, ya sea un oncogén o un gen supresor de tumor. Una de las principales desventajas es que es prácticamente imposible, una vez hecha la modificación, controlar el nivel y patrón de la expresión de los genes de interés; también es importante considerar que la integración aleatoria de un gen puede ocasionar la expresión de fenotipos inesperados [3].

2.1.4 Modelo de inducción de tumores por *Agrobacterium tumefaciens*.

Este modelo se basa en la evaluación de la actividad antitumoral de extractos y/o compuestos puros provenientes de diversas fuentes naturales y consiste en inducir tumores en vegetales utilizando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que mediante su plásmido inductor de tumor (Ti – del inglés Tumor inducing), promueve la transformación de las células normales del modelo vegetal en células tumorales. Una vez establecido, el tumor posee la capacidad de crecimiento autónomo e independiente de los mecanismos de control del hospedero [4].

Una de las ventajas más destacables de este bioensayo es que requiere un periodo de tiempo corto (menor a un mes) para obtener resultados en comparación a los modelos antes mencionados, además de que el equipamiento

y materiales requeridos para su realización son de bajo costo y asequibles para la mayoría de los laboratorios [5, 6].

2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1 Generalidades

Las especies del género *Agrobacterium* pertenecen a la familia Rhizobiaceae; estas bacterias son formadoras de esporas, Gram negativas y su motilidad se produce gracias a que poseen de 1 a 6 flagelos peritricos; su tamaño oscila entre 0.6 a 1.0 μm de ancho a 1.5 a 3.0 μm de largo y pueden existir de manera individual o en parejas.

En condiciones aerobias, las colonias usualmente son convexas de forma circular, lisas y de color beige. Se ha descrito que algunas cepas tienen capacidad de crecer en condiciones anaerobias en presencia de nitrato; sin embargo, la mayoría de las cepas se desarrollan bien en bajas concentraciones de oxígeno, que corresponde al ambiente en el interior de los tejidos de la planta.

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 28 °C. El crecimiento en medios con carbohidratos va acompañado de una abundante producción de polisacáridos extracelulares en forma de mucosidad lo cual puede relacionarse con los diversos morfotipos reportados [7].

2.2.2 Plásmido Ti

Agrobacterium tumefaciens tiene la habilidad particular de transferir una sección de su DNA, denominada T-DNA, mediante un plásmido inductor de tumores (Ti) cuya estructura se muestra en la Figura 1; el T-DNA se integra en el genoma del hospedero para posteriormente transcribirse, lo que induce la formación de tumores mediante la síntesis de derivados de aminoácidos denominados opinas y las fitohormonas citocinina y auxina que en conjunto juegan un rol central en la formación y desarrollo de los tumores [8, 9].

Del mismo modo, en el plásmido se encuentran genes *vir* que son necesarios para la transferencia e incorporación del T-DNA en el genoma de la planta, cabe destacar que solo las secuencias de los extremos del T-DNA son requeridas para que la transferencia ocurra ya que dirigen la transferencia de forma polar, en dirección derecha a izquierda; esta orientación adquiere importancia ya que el extremo derecho es imprescindible para la formación del tumor [10, 11].

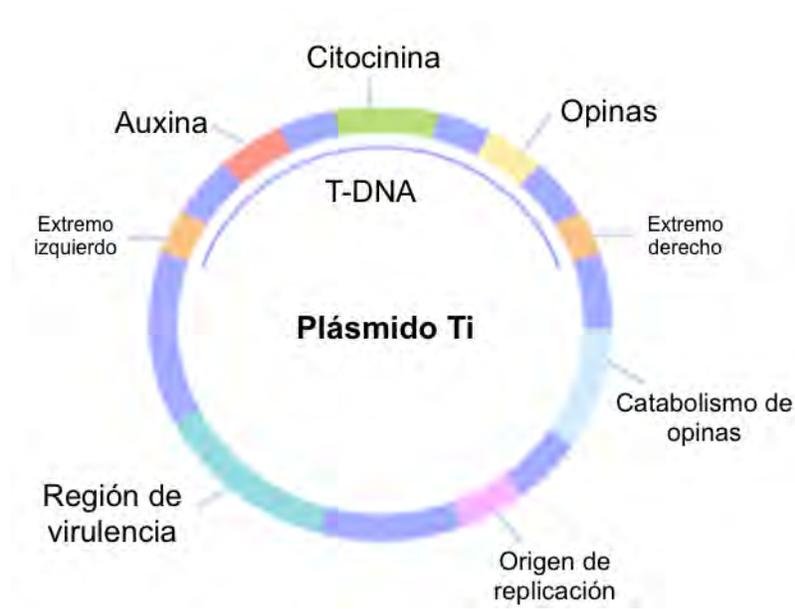


Figura 1. Estructura del plásmido Ti (modificado de [12]).

2.2.3 Mecanismo de inducción tumoral

Si bien el mecanismo de transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* a la célula vegetal ha sido elucidado en gran parte, aun existen procesos que requieren un estudio más detallado; sin embargo, la información actual es clara al establecer que se requiere de la colaboración conjunta de una serie de proteínas tanto de la bacteria como de la célula hospedera [13].

Para la promoción de la transferencia del T-DNA se requiere la participación de los genes *vir*, que se encuentran en la llamada región de virulencia del plásmido

Ti (Figura 1). Los genes *vir* constituyen un operón con 8 genes principales (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*).

La escisión del T-DNA a partir del plásmido Ti, se da por la acción de las proteínas *VirD2* y *VirD1*, que actúan como endonucleasas, uniéndose al plásmido Ti en los extremos del T-DNA, relajándolo y haciendo cortes en la cadena del T-DNA antisentido [14]; después de hacer el corte, la proteína *VirD2* se une covalentemente al extremo 5' del T-DNA hasta su transferencia a la planta [15].

Esta transferencia es mediada por el sistema de conjugación bacteriana el cual es una subfamilia de tipo IV de los sistemas de secreción (T4SS; compuesto por 11 proteínas codificadas por el operon *VirB* y al menos una proteína del operon *VirD* (*VirD4*); esta última proteína actúa acoplado el T4SS y el T-DNA/*VirD2*) [16, 17]

Se sugiere que la integración del T-DNA dentro del cromosoma de la planta está mediada por la proteína *VirD2* que contiene dominios con actividad para la recombinación y ligación; aunque en algunos estudios con mutantes, se ha observado la participación de histonas H2A en la recombinación de del T-DNA con el genoma de la planta [18].

Posterior a la integración, se induce la transcripción de T-DNA, que como se menciona en la sección 2.2.2, tiene como resultado por una parte, la síntesis de auxina y citocinina, fitohormonas involucradas en el incremento de la proliferación celular [19] y por otra, la síntesis de opinas, que son utilizadas por las bacterias como fuente de nutrientes lo que promueve un ambiente propicio para su mantenimiento, además de funcionar como señales para la activación *quorum sensing* (mecanismo de regulación en la expresión genética bacteriana en respuesta a la densidad celular) lo que es importante no solo para la interacción entre las bacterias, sino también con la planta hospedera [20].

2.3 *Annona muricata*

2.3.1 Generalidades

La *Annona muricata*, es conocida popularmente con los nombres de Graviola o Guanábana, es un árbol pequeño perteneciente a la familia *Annonaceae*, su fruto es verde oscuro por fuera, cubierto de tubérculos flexibles con aspecto de espinas, es ovoide-elipsoide y sus medidas oscilan de 20 a 25 cm de largo por 10 a 12 cm de diámetro. Las semillas constituyen del 6 al 7% del total del peso del fruto, son ovoides y aplanadas, de 15 a 20 mm y su apariencia es oscura y brillante [21].

En la medicina tradicional, la fruta, las semillas, las raíces y las hojas son utilizadas para tratar parásitos, reumatismo, neuralgia, diabetes, hipertensión, insomnio, cistitis y cáncer. El uso para enfermedades tan diversas se fundamenta en la amplia variedad de metabolitos secundarios presentes en *A. muricata*, entre los que destacan las acetogeninas. Se ha reportado que esta especie de *Annonaceae* es la que contiene en mayor cantidad estos metabolitos [22].

2.3.2 Acetogeninas

Las acetogeninas constituyen un grupo de metabolitos secundarios presentes en diversos géneros de la familia *Annonaceae*. Desde el punto de vista estructural (Figura 2), las acetogeninas son cadenas de ácidos grasos lineales de 32 o 34 átomos de carbono y de una unidad de ácido pirúvico, unidad estructural que se combina con 2-propanol para formar parte de una metil- γ -lactona, presente en todas las acetogeninas. A lo largo de la cadena de ácido graso contienen dobles enlaces que se epoxidan y ciclan en uno, dos o tres anillos de tetrahidrofurano (THF). Se ha descrito que algunas acetogeninas pueden presentar también anillos de tetrahidropirano (THP) [23].

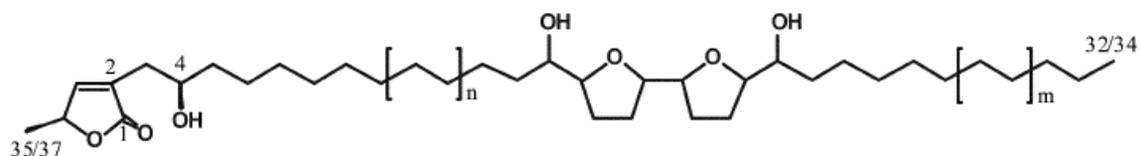


Figura 2. Estructura general de una acetogenina (tomado de [23]).

Adicional a la estructura mencionada anteriormente, las acetogeninas pueden presentar otros grupos funcionales como son hidroxilos, acetoxilos y carbonilos, entre otros. Las principales acetogeninas encontradas en las semillas de guanábana se mencionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de Acetogeninas presentes en semillas de *Annona muricata*, clasificación con base en su estructura y actividad biológica (modificada de [22]).

ACETOGENINA	GRUPO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA
Solamina	Grupo 5: Acetogeninas dihidroxiladas	Citotoxicidad en células tumorales KB y células normales de riñón
Corossolina	Grupo 6: Acetogeninas cetónicas trihidroxiladas e hidroxiladas	Citotoxicidad en células tumorales KB y larvas de <i>Artemia salina</i>
Muricinas A-D	Grupo 9a: Acetogeninas con OH en C4	Citotoxicidad en células de hepatoma humano

2.3.3 Actividad antitumoral de las acetogeninas: mecanismo general

A la familia de acetogeninas se les han descrito diversas actividades biológicas tales como antimaláricos, pesticidas y antihelmínticos, sin embargo, una de las vertientes más estudiadas es su actividad citotóxica contra células tumorales en modelos *in vitro*, y su actividad antitumoral *in vivo* en modelos de ratón [24].

El principal mecanismo propuesto para explicar la actividad citotóxica y antitumoral de las acetogeninas es la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial o NADH ubiquinona oxidoreductasa. Se considera que

la actividad preferencial de las acetogeninas sobre células tumorales es debido a que éstas mantienen una tasa de replicación más elevada que las células normales, por lo tanto, su requerimiento de energía es mayor, siendo la fosforilación oxidativa una de las vías más importantes para el abastecimiento de ATP.

Con base en las evidencias experimentales con que se cuentan hasta el momento, se han propuesto dos escenarios que explican los principales efectos inducidos por acetogeninas en células tumorales. La inhibición del complejo I mitocondrial llevaría, por un lado, a un fallo extensivo del metabolismo oxidativo, lo que ocasionaría una disminución en la producción de ATP y si la inhibición es persistente, conduciría a la célula a un colapso energético que llevaría a la muerte celular por necrosis. Por otro lado, la inhibición del complejo enzimático podría favorecer la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), mismas que al sobrepasar los mecanismos de regulación de la célula, ocasionarían daños a nivel de proteínas (por ejemplo, oxidando a otros complejos de la cadena respiratoria), a nivel de DNA (por ejemplo, oxidando el DNA mitocondrial), y a nivel de membranas (por ejemplo, disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial y favoreciendo la generación de poros en la misma); estas señales de daño serían detectadas por la célula y en caso de no poder repararlas, se desencadenaría algún tipo de muerte celular programada, como por ejemplo, la apoptosis.

Sin embargo, no todas las células tumorales se comportan de la misma manera al estar expuestas a distintos tipos de acetogeninas, existen reportados algunos mecanismos que podrían favorecer la resistencia a dichos compuestos, entre los que se encuentran el cambiar la dependencia celular del metabolismo oxidativo por un metabolismo reductivo y/o incrementar la respuesta antioxidante para el manejo del exceso de ERO [23].

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Material biológico

Las semillas de *Annona muricata* empleadas durante la estandarización e implementación del guion experimental se adquirieron en dos mercados populares de las delegaciones Xochimilco y Venustiano Carranza. Por otra parte, las papas de cáscara roja (*Solanum tuberosum L.*) se obtuvieron en un mercado de la delegación Xochimilco.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260/C58 fue donada por el Dr. Javier Plasencia, Profesor del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.

El metotrexato fue donado por el Dr. Francisco Hernández Luis, Profesor del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química.

3.2 Preparación del extracto orgánico de las semillas de *Annona muricata*

La preparación del extracto orgánico de *A. muricata* se realizó a partir de las semillas provenientes de 5 kg del fruto. Las semillas se lavaron y se sometieron a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 8 días, al concluir este lapso de tiempo se pesaron 116.8 g y se fragmentaron manualmente; posteriormente se procedió a la extracción mediante un método de maceración, con 2 L de una mezcla de diclorometano-metanol en una proporción 1:1 durante 4 días. Transcurrido el tiempo indicado se filtró y el extracto obtenido se concentró *in vacuo* con ayuda del rotaevaporador.

El extracto resultante se reconstituyó con 25 mL de metanol acuoso al 10% y se transfirió a un embudo de separación para realizar un proceso de reparto con dos porciones de 25 mL de hexano. La fracción metanólica resultante se concentró *in vacuo* y el remanente se reconstituyó con metanol, permitiendo su evaporación a temperatura ambiente.

3.3 Preparación del medio de crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*.

Esta etapa del procedimiento se llevó a cabo 48 h antes de realizar el bioensayo y en condiciones de asepsia.

Se preparó el medio de crecimiento de la bacteria con 0.5 g de sacarosa, 0.8 g de caldo nutritivo, 0.1 g de extracto de levadura y 10 mL de PBS pH 7.2 ajustando el volumen final a 100 mL con agua destilada para posteriormente esterilizarlo en autoclave.

Con el medio a temperatura ambiente y manteniendo un área de trabajo aséptica, se tomaron colonias de *A. tumefaciens* provenientes de un cultivo sobre agar y se sembraron en el medio líquido. Se realizó una incubación durante 48 h a 30°C en agitación.

3.4 Preparación de los discos de papa

Los tubérculos de *Solanum tuberosum* L. se lavaron con agua corriente y después con agua destilada; se desinfectó la superficie del tubérculo con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. Posteriormente, con la ayuda de un horador de 14 mm de diámetro previamente esterilizado, se procedieron a cortar piezas cilíndricas a lo largo de la papa; a partir de las piezas obtenidas se cortaron 15 discos de 5 mm de espesor con ayuda de un cúter estéril.

Los discos de papa se sometieron a un segundo paso de desinfección con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo los discos se transfirieron a una caja de Petri de 100 x 15 mm estéril conteniendo agua destilada estéril.

3.5 Ensayo de inducción de tumores

Se preparó un litro de agar al 1% y en condiciones de asepsia se transfirieron 3 mL en cajas de Petri de 60 x 15 mm estériles. Previo a que el agar se solidificara,

se colocó en el centro de la caja un disco de papa con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada. Para cada bioensayo se prepararon 15 cajas.

3.6 Preparación de los inóculos

Se pesaron 5 y 10 mg de la fracción metanólica y se disolvieron empleando DMSO; del mismo modo se pesaron 4 mg de metotrexato y se disolvieron con 1 mL de DMSO; posteriormente todos los inóculos preparados se filtraron de manera individual con un filtro de 0.22 µM (Merck-Millipore) y fueron depositados en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Las soluciones se colocaron por separado en 5 tubos de ensayo estériles de 12x75 mm y se prepararon los inóculos como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Preparación de los inóculos

Reactivo (mL)	Tubo				
	FM1	FM2	Control +	Control -	Control DMSO
Agua estéril	1.5	1.5	1.5	4.5	4.0
Cultivo bacteriano *	2	2	2	2	2
Fracción metanólica	3	3	-----	-----	-----
DMSO	-----	-----	-----	-----	0.5
Metotrexato	-----	-----	3	-----	-----

FM1: fracción metanólica, 5mg/mL; FM2: fracción metanólica, 10mg/mL; Metotrexato, 4mg/mL; **Agrobacterium tumefaciens*: cultivo de 48h.

Sobre los discos de papa, se colocaron 50 µl de los inóculos de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Las cajas de Petri se sellaron con plástico autoadherible y se incubaron a 27-30°C durante 21 días; transcurrido este tiempo los discos se tiñeron con una solución de lugol; el colorante se dejó actuar durante dos minutos sobre los discos de papa y se retiraron los discos con la ayuda de una pinza de disección y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se procedió con el conteo de los tumores presentes en los discos de papa de cada una de las cajas de Petri.

Tabla 3. Inóculos para adicionar sobre los discos de papa

Caja	Tratamiento*	Etiquetado de las cajas
1	Fracción metanólica 5 mg/mL	FM 5
2	Fracción metanólica 10 mg/mL	FM 10
3	DMSO (control disolvente)	CD
4	Metotrexato + <i>A. tumefaciens</i> (control positivo)	C+
5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (control negativo)	C-

Una vez contabilizados, se calculó el porcentaje de inhibición de los tumores de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{\text{promedio de tumores de muestra}}{\text{promedio de tumores del control}} \right) \times 100 \right]$$

Un valor mayor al 20% de inhibición de tumores fue considerado como un resultado positivo.

3.6 Aplicación del guion experimental en un grupo piloto y todos los grupos de la asignatura de Toxicología y el cuestionario PAPIME

Una vez estandarizada la metodología, se llevó a cabo el desarrollo experimental en el semestre 2016-1, en la sesión del día 23 septiembre de 2015 en el grupo 4, establecido como grupo piloto; considerando los resultados obtenidos, se decidió aplicar el guion experimental en todos los grupos de la asignatura del semestre 2016-2, del 14 al 18 marzo del 2016.

Con la finalidad de evaluar la inserción del protocolo en el manual de prácticas se elaboró un cuestionario y una rúbrica para la calificación del mismo, los cuales se anexan en la sección 8 del presente escrito. Las preguntas se clasificaron en los rubros de información general, opinión, área cognitiva y área de habilidades.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de la estandarización

Se llevaron a cabo 4 bioensayos para el establecimiento de las condiciones experimentales necesarias para el desarrollo del protocolo.

Para llevar a cabo la estandarización se utilizaron 5 Kg de fruto (*Annona muricata*) de los cuales se obtuvieron 116.8 g de semillas; una vez que concluyó el proceso de partición se obtuvieron 700 mg de fracción metanólica; dicha cantidad fue suficiente para los cuatro bioensayos dado que solo se utilizaron 15mg por bioensayo. En las sesiones experimentales de los semestres 2016-1 y 2016-2 se utilizó la misma fracción metanólica que en la etapa de estandarización, esto debido a los tiempos asignados para el desarrollo del guion, por lo que los alumnos no participaron del proceso de extracción sin embargo, durante la sesión de explicación de los conceptos teóricos relacionados con la práctica, se les describió el procedimiento de manera breve.

La cepa de *A. tumefaciens* tuvo un crecimiento adecuado en el medio de cultivo empleado durante el tiempo y las temperaturas indicadas, sin embargo, la bacteria no se reprodujo de manera uniforme en el medio sin agitación, por lo que se decidió adicionar esta condición durante todo el periodo de incubación. El medio de crecimiento en las sesiones experimentales en los semestres 2016-1 y 2016-2 se preparó dos días antes de cada bioensayo por parte de los involucrados en el proyecto.

En cuanto a las papas empleadas, se determinó trabajar con las de cáscara roja dado que tiene un mayor contenido de almidón en comparación con las papas de cáscara amarilla, lo que los hace más afines a la solución de lugol y permite tener una mejor observación de la presencia de los tumores. La deshidratación de los discos de papa es un problema que se debe evitar ya que puede llevar al fallo del bioensayo; por sí mismas, las papas rojas tienen un alto contenido de agua, sin embargo, se sugiere que una manera de evitar la desecación es no

sumergir las papas en una solución de hipoclorito de sodio con una concentración mayor al 1% para la superficie y 0.1% para los discos y por un tiempo mayor a lo señalado en el protocolo; así mismo, es necesario que la concentración de agar en las cajas sea del 1% de lo contrario, la papa puede desecarse y/o el agar agrietarse por lo que la papa no tendrá el contacto suficiente con el medio y como consecuencia, con la bacteria, lo que provocará falsos negativos para la aparición de tumores. Adicionalmente es necesario sellar las cajas de Petri con plástico auto adherible una vez que se realizó el inóculo, esto con el objetivo de evitar que el agar pierda humedad durante el periodo de incubación.

Al concluir la incubación se llevó a cabo la identificación de los tumores, para lo cual se empleó una solución de lugol que permite teñir los discos de papa basado en su contenido de almidón, de esta manera las papas se tiñen completamente de negro cuando no presentan tumores, mientras que aquellas que presentan tumores, desarrollan una tonalidad anaranjada en el sitio del tumor.

En la Figura 3 se muestra una imagen representativa de apreciación de tumores durante la estandarización, en el inciso a) se muestra al control negativo (C-) el cual solo contiene un tratamiento con *A. tumefaciens* antes de ser teñido con solución de lugol. En la imagen b) se muestra la comparación entre un control positivo (C+) donde se adicionó el tratamiento metotrexato y un C- en los que se observa que en el número 1 la superficie de la papa es plana debido a que hay ausencia de tumores mientras que en el número 2 los tumores pueden apreciarse como elevaciones en la superficie de la papa y son señalados con flechas de color rojo.

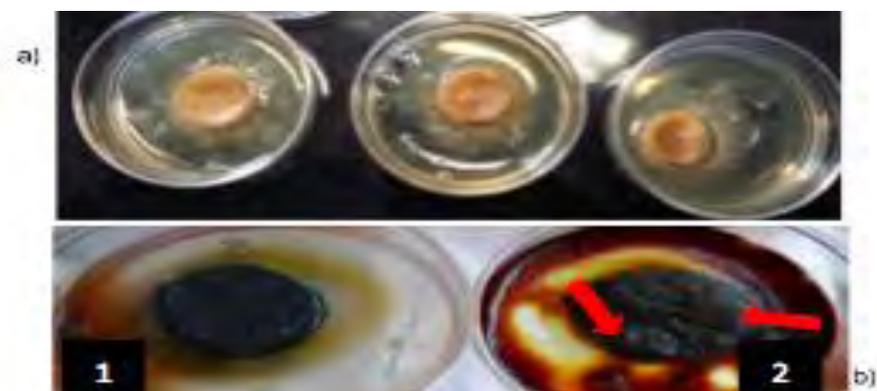


Figura 3. Apreciación de tumores durante la estandarización del ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *A. tumefaciens* en discos de papa. a) Corrida C- (control negativo) antes de tinción; b) 1. Control + (Metotrexato + *A. tumefaciens*); 2. Tratamiento C- (*A. tumefaciens*)

4.2 Implementación del bioensayo en un grupo piloto

Durante el semestre 2016-1 se llevó a cabo la implementación del guion experimental en el grupo 4 de laboratorio de la asignatura de Toxicología.

Las soluciones stock se prepararon considerando a todos los equipos del laboratorio considerando uno por grupo de cada una, lo que permitió un mejor aprovechamiento de tiempo y evitó que hubiera mayor variación en los resultados, dichas soluciones fueron asignadas por turnos y se tomaron tiempos para evitar atrasos.

Transcurrido el periodo de incubación fue posible la detección de los tumores para cada disco, todos los equipos del grupo piloto obtuvieron resultados positivos del bioensayo diferenciando los tumores que debían aparecer en cada tratamiento, sin embargo, un punto importante para evitar falsos positivos y/o negativos son las medidas de higiene y seguridad que evitan la contaminación de tratamientos; solo un disco de papa en todo el grupo presentó contaminación con hongo (Figura 4), mismo que se descartó para el conteo de tumores.

Además en la Figura 4 se pueden observar claramente las diferencias entre los distintos tratamientos. En la imagen 1 se ve que la superficie de la papa es plana debido a que hay ausencia de tumores en tanto que en la imagen 2, dado que se trata del control negativo, se distinguen elevaciones en la superficie de la papa debido a los tumores. Comparando los discos conteniendo la fracción metanólica a una concentración de 5mg/ml con el control positivo hay presencia de tumores sin embargo, la cantidad es menor y están menos desarrollados que en el control negativo, lo mismo sucede con la concentración de 10 mg/mL (imagen 5) pero en mucho menor proporción debido a que es casi imposible la apreciación de tumores para este tratamiento. Finalmente, para el caso del control de disolvente (imagen 6) la superficie de la papa es plana debido a que hay ausencia de tumores.

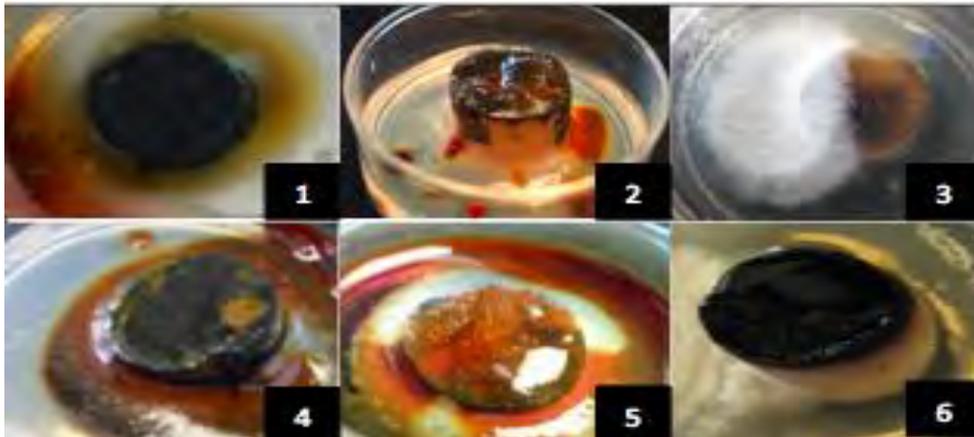


Figura 4. Fotos representativas del ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *A. tumefaciens* en discos de papa grupo piloto (grupo 4 semestre 2016-1). 1. C+, control positivo metotrexato + *A. tumefaciens*; 2. C-, control negativo *A. tumefaciens*; 3. CD DMSO, control disolvente contaminado; 4. FM5, fracción metanólica 5mg/ml; 5. FM10, fracción metanólica 10mg/ml; 6. CD DMSO, control disolvente.

Con la finalidad de unificar los criterios de evaluación del cuestionario PAPIME se estableció una rúbrica (Anexo 7.2 y 7.4) donde se asignaron tres diferentes puntuaciones para cada una de las preguntas.

Tabla 4. Puntuación rúbrica

Puntuación	Clasificación	Condiciones
0	Malo	No responde, responde mal o responde menos de las características solicitadas.
1	Regular	Solo responde algunas de las características solicitadas.
2	Bueno	Responde todas las características solicitadas.

El cuestionario PAPIME se aplicó en todos los grupos de toxicología aun cuando no hubieran realizado la práctica, esto con la finalidad de comparar si la sesión experimental impacta de manera positiva en la formación de los alumnos, complementando el conocimiento teórico revisado en clase y la adquisición de nuevas habilidades en el laboratorio.

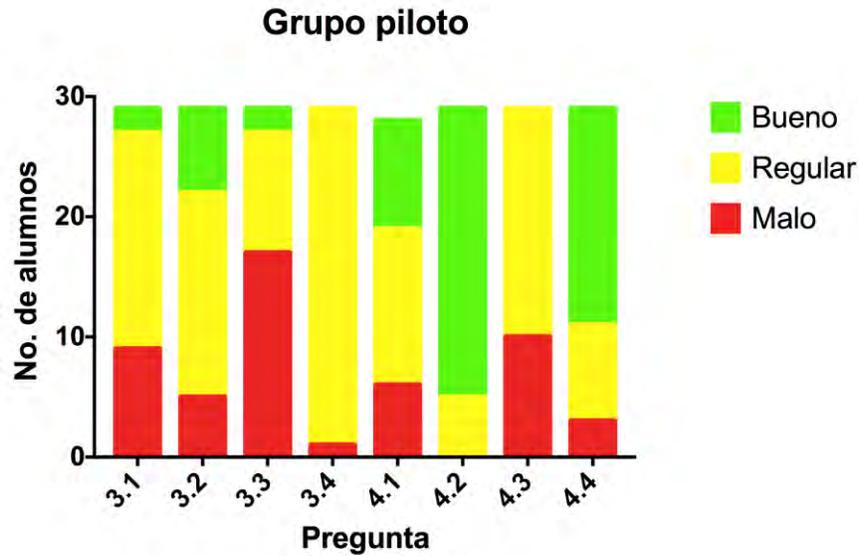
Con base en las condiciones establecidas en la rúbrica se revisaron y analizaron las respuestas de 30 cuestionarios de 4 grupos de laboratorio. En las siguientes gráficas se muestran los resultados del cuestionario PAPIME. Cabe mencionar que para el caso de los grupos no piloto (grupos 1, 3 y 5) se muestra el promedio de los resultados.

El análisis comparativo de ambas gráficas permite evidenciar que en el grupo piloto se obtuvieron resultados satisfactorios, lo cual es congruente considerando que en dicho grupo se implementó el guion experimental con excepción de las preguntas 3.3 y 3.4, ambas del área cognitiva.

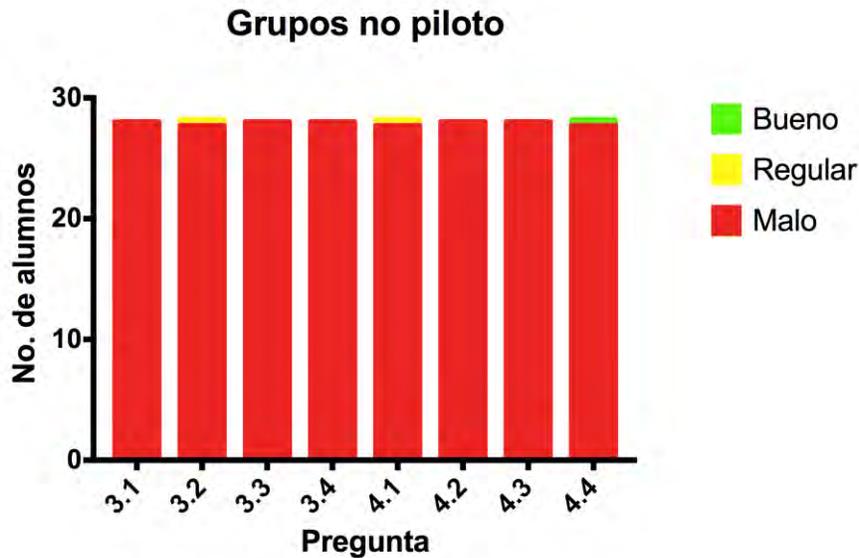
En el caso de la pregunta 3.3, *Definir el fundamento del ensayo empleado*, la mayoría de los alumnos tuvieron un desempeño malo; dicho resultado se debió a que los alumnos no tienen claro el concepto de fundamento, ya que más del

50% describieron la metodología experimental en lugar de concretar el fundamento del ensayo. En tanto que, en la pregunta 3.4, *Mencione los compuestos a los que se les atribuye la actividad antitumoral de A. muricata*, la respuesta fue respondida de manera regular por más del 90%.

Gráfica 1. Resultados Cuestionario PAPIME Grupo Piloto (grupo 4).



Gráfica 2. Resultados Cuestionario PAPIME Promedio de Grupos no piloto (grupos 1, 3 y 5).



Por lo que respecta a las preguntas 4.1 y 4.3 del área de habilidades, *Mencionar al menos tres precauciones que se deben considerar para obtener resultados óptimos del bioensayo realizado en el laboratorio e identificar compuestos con actividad antitumoral justificando con cálculos*, respectivamente en las que la mayoría de los alumnos mostró un desempeño excelente. Estas preguntas involucran cálculos y condiciones experimentales, las cuales fueron explicadas con mayor detenimiento durante la sesión experimental dado a que son considerados puntos críticos.

En el resto de las preguntas se obtuvieron resultados regulares, se considera que esto se debe en parte a la falta de integración de conceptos de otras asignaturas con esta sesión experimental, como los fundamentos de las particiones o las mezclas de disolventes utilizadas en el proceso de extracción mediante maceración que son conceptos aprendidos en Química Orgánica sin embargo, es importante mencionar que estos pasos de la metodología no se llevaron a cabo por los alumnos, por lo que se piensa que al no tener contacto directo con estas etapas, es más difícil la asociación de conocimientos.

Por lo antes expuesto, se consideró importante revisar las preguntas del cuestionario principalmente aquellas preguntas que involucraran la integración de conceptos de otras asignaturas; sin embargo, es de pensarse que si los alumnos realizan estas etapas del guion se podrá profundizar en los temas obteniendo mejores resultados para el cuestionario PAPIME o los exámenes involucrados al final de las unidades de la asignatura.

4.3 Implementación del bioensayo en todos los grupos

Al implementar el guion en todos los grupos durante el semestre 2016-2 fue muy difícil la apreciación de tumores (Figura 5) ya que no se desarrollaron de la misma forma que el grupo piloto implementado en el semestre 2016-1 (Figura 4) o en las estandarizaciones (Figura 3), a pesar de que se mantuvieron las

mismas condiciones y esto sucedió en todos los grupos donde se implementó el guión.

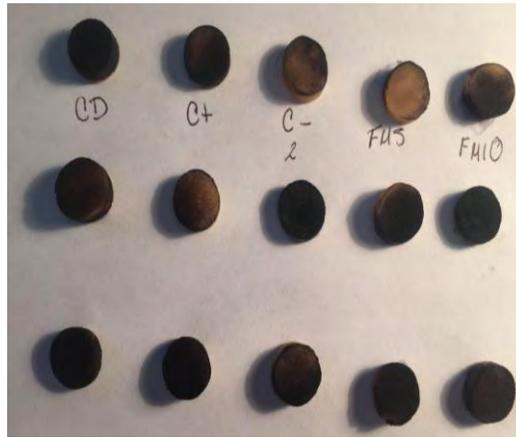
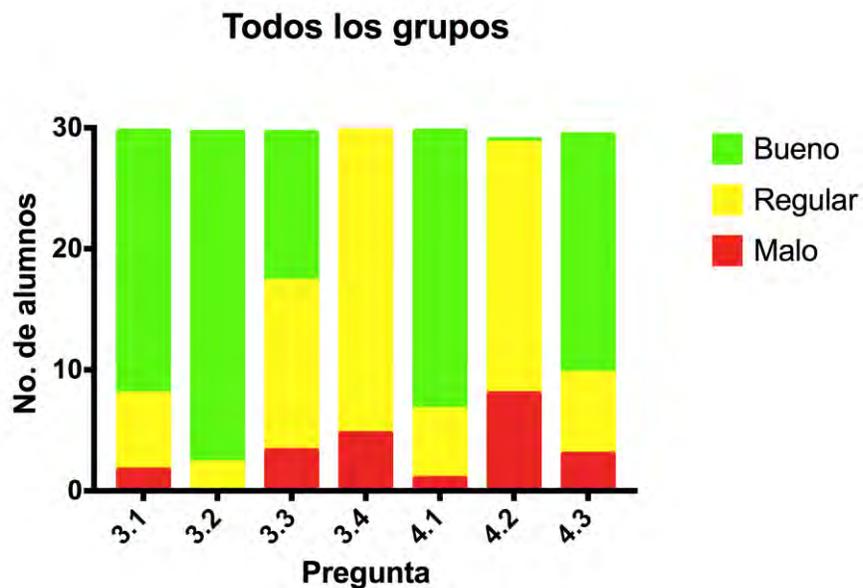


Figura 5. Foto representativa de ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *A. tumefaciens* en discos de papa del grupo 4 (equipo 2 semestre 2016-2). C+, control positivo metotrexato + *A. tumefaciens*; C-, control negativo *A. tumefaciens*; FM5, fracción metanólica 5mg/ml; FM10, fracción metanólica 10mg/ml; CD DMSO, control disolvente.

Gráfica 3. Resultados del cuestionario PAPIME de los grupos 3, 4 y 6 durante el semestre 2016-2.



Aún cuando los resultados obtenidos en la implementación del guion experimental en todos los grupos (Gráfica 3) no son los ideales, se puede notar que si se comparan con los obtenidos en la primer implementación en el grupo piloto (Gráficas 1 y 2), es clara la tendencia en la obtención de puntajes más altos, teniendo un mejor desempeño global en el cuestionario PAPIME; lo que implicaría que la implementación del guion experimental permite una mejor relación entre el marco teórico y las sesiones experimentales de la asignatura.

5. CONCLUSIÓN

Se logró estandarizar e implementar en el grupo 4 de Toxicología en el semestre 2016-1 y en todos los grupos de la asignatura en el semestre 2016-2 el guión experimental “Ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa” cuyo tema es visto en la unidad 4 del programa (“Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis”).

La implementación de dicho guión permitió la conjunción de conocimientos relacionados con la materia de Toxicología y que los alumnos involucraran temas aprendidos en otras asignaturas; es debido a esto que se asume que con esta implementación se refuerza la relación teórico-práctica de la asignatura y aumenta el aprendizaje de conocimientos de la materia.

6. ANEXOS

6.1 Protocolo

ENSAYO DE LA INHIBICIÓN DE TUMORES INDUCIDOS POR *Agrobacterium tumefaciens* EN DISCOS DE PAPA

OBJETIVO ACADÉMICO

Determinar la presencia de compuestos con potencial antitumoral en el extracto orgánico obtenido de las semillas de *Annona muricata* (Annonaceae)

PROBLEMA

Determinar la actividad antitumoral del extracto orgánico obtenido de las semillas de *Annona muricata* mediante el ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepa de *Agrobacterium tumefaciens*

Tubérculos de *Solanum tuberosum* (papa de cáscara roja)

MATERIAL

Ensayo de inducción de tumores

Cajas de Petri estériles de 60 x 15 mm	15	Filtros Millipore de 0.22µm	3
Cajas de Petri estériles de 100 x 15 mm	1	Tubos Eppendorf de 1.5 mL	9
Tubos de ensayo estériles de 12x75 mm	5	Horador (14 mm de diámetro)	1
Cúter metálico	1	Pipeta graduada estéril 10 mL	2
Jeringas 10 mL	4	Pinzas de disección	1
Tubos de ensayo	5		

REACTIVOS*

Agua destilada

Agua destilada estéril

Hipoclorito de sodio

Sacarosa

***Ver APÉNDICE II**

Yoduro de potasio

Yodo elemental

Dimetilsulfóxido

Agar

EQUIPO

Autoclave

Incubadora

DESARROLLO EXPERIMENTAL (se llevará a cabo por equipo grande)

Las siguientes etapas **se deben llevar a cabo en condiciones estériles**, para ello se deberá limpiar la zona de trabajo con jabón e hipoclorito de sodio al 1% y enseguida sanitizar con etanol al 70%. Adecuar el área de trabajo a un ambiente estéril con un mechero Bunsen y un mechero Fisher (ver Figura 1)



FIGURA 1. Organización de la mesa de trabajo para el ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *A. tumefaciens* en discos de papa.

A. Preparación del medio de crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

Dos días antes de realizar el bioensayo, preparar el medio de crecimiento de la bacteria de acuerdo a las instrucciones descritas en el Apéndice II y esterilizarlo; posteriormente dejar enfriar y en condiciones estériles, tomar con un asa bacteriológica colonias de *A. tumefaciens* proveniente de un cultivo sobre agar y sembrarlas en el medio líquido. Incubar durante 48 horas a 30°C en agitación.

B. Preparación de los discos de papa

Lavar los tubérculos de *Solanum tuberosum* L. con agua corriente y después con agua destilada; sanitizar la superficie del tubérculo con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos. Posteriormente, con la ayuda de un horador previamente esterilizado, cortar piezas cilíndricas a lo largo de la papa, a partir de las piezas obtenidas, cortar discos de 14 mm de diámetro y 5 mm de espesor con ayuda de un cúter estéril (se requiere 15 discos por equipo). Los discos se colocan en un vaso de precipitados conteniendo una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo transferir los discos a una caja de Petri estéril (100 x 15 mm) con agua destilada estéril. Los residuos de papa se colocan en una bolsa de plástico etiquetada como **R1**.

C. Ensayo de inducción de tumores

Preparar un litro de agar al 1% de acuerdo a las instrucciones señaladas en el Apéndice II. Una vez esterilizado el agar, con ayuda de pipetas graduadas estériles, se transfieren 3 mL en cajas de Petri estériles (60 x 15 mm). Previo a que solidifique el agar y bajo condiciones estériles, colocar en el centro de la caja un disco de papa con ayuda de una pinza de disección previamente esterilizada. Preparar 15 cajas de Petri por equipo grande.

D.1 Preparación de los inóculos

1. Preparar 1 mL de dos soluciones de la fracción metanólica a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, empleando DMSO como disolvente. Filtrar ambas soluciones a través de filtros Millipore 0.22 μm y colocarlas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.
2. Filtrar 1 mL de DMSO a través de filtros Millipore 0.22 μm y depositarlos en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.
3. Preparar 1 mL de metotrexato a una concentración de 4 mg/mL utilizando DMSO como disolvente, se filtra a través de filtro Millipore 0.22 μm y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.
4. Colocar por separado en 5 tubos de ensayo de 12x75 estériles las soluciones que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de los inóculos

Reactivo (ml) \ Tubo	FM 5	FM 10	CD	C+	C-
a) Agua estéril	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5
b) Cultivo bacteriano*	1	1	1	1	1
c) Fracción metanólica	1	1	-----	-----	-----
d) DMSO	-----	-----	1	-----	-----
e) Metotrexato	-----	-----	-----	1	-----
Volumen total	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

FM 5: fracción metanólica 5mg/mL; FM 10: fracción metanólica 10mg/mL;
 CD: control de disolvente (DMSO); C+: control positivo (metotrexato, 4mg/mL); C-: control negativo (*Agrobacterium tumefaciens*).

**Agrobacterium tumefaciens*: cultivo de 48h.

5. Por triplicado, colocar sobre los discos de papa 50 μ l de los inóculos de acuerdo a lo indicado en la Tabla 2.

Tabla 2. Inóculos para adicionar sobre los discos de papa

Caja	Tratamiento*	Etiquetado de las cajas
1	Fracción metanólica 5 mg/mL	FM 5
2	Fracción metanólica 10 mg/mL	FM 10
3	Control de disolvente (DMSO)	CD
4	Control positivo (metotrexato + <i>A. tumefaciens</i>)	C+
5	Control negativo (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	C-

*Cada tratamiento se realiza por triplicado

6. Las cajas de Petri se sellan con plástico autoadherible y se incuban a 27-30°C durante 21 días. Transcurrido este tiempo los discos se tiñen (ver Apéndice II), dejar el colorante durante dos minutos y posteriormente, retirar los discos con la ayuda de una pinza de disección y lavarlos con agua destilada. Proceder con el conteo de los tumores presentes en los discos de papa de cada una de las cajas de Petri (Figura 2).

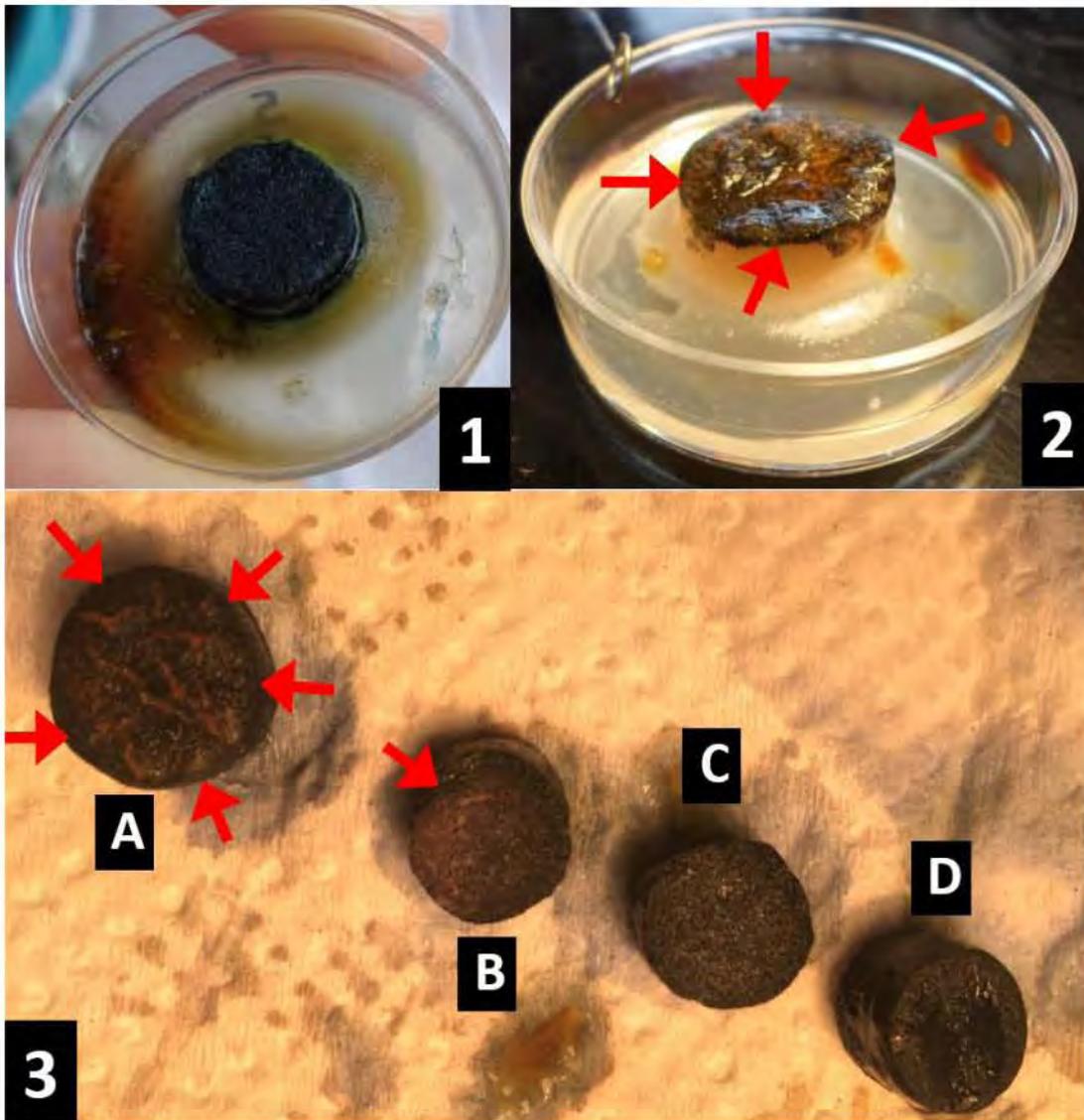


FIGURA 2. Fotos representativas del ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *A. tumefaciens* en discos de papa.

1. Se puede apreciar que la superficie del disco de papa está plana, lo que indica la ausencia de tumores (corresponde a la FM5).
2. Los tumores se aprecian como elevaciones en la superficie del disco de papa y son señaladas con flechas rojas (corresponde al C-).
3. Resultados obtenidos por el grupo piloto semestre 2016-1.
 - A. C-
 - B. FM5
 - C. FM10
 - D. C+

7. Una vez contabilizados, se calcula el porcentaje de inhibición de los tumores de acuerdo a la siguiente fórmula

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{\text{promedio de tumores de muestra}}{\text{promedio de tumores del control}} \right) \times 100 \right]$$

8. Los datos de porcentaje de inhibición de la formación de los tumores representan los valores obtenidos de las tres repeticiones. Un valor mayor al 20% de inhibición de tumores se considera significativo.
9. Una vez terminado el conteo, recolectar las cajas de Petri y sujetarlas con cinta adhesiva, colocarlas en una bolsa para RPBI roja y etiquetarlas como **R2**.

Questionario

- Indique dos características que le permitan identificar la presencia de los tumores en los discos.
- Registre en la siguiente tabla el número de tumores por disco.

Repeticiones	1	2	3
Muestra	No. de tumores/disco		
Fracción metanólica 5 mg/mL			
Fracción metanólica 10 mg/mL			
Control disolvente			
Control positivo			
Control negativo			

- Realice los cálculos correspondientes para determinar el porcentaje de inhibición de los tumores.

Muestra	Promedio de tumores por disco	% de inhibición de los tumores
Fracción metanólica 5 mg/mL		
Fracción metanólica 10 mg/mL		
Control disolvente		
Control positivo		
Control negativo		

4. Con base en los resultados obtenidos indique si el extracto obtenido de las semillas de *Annona muricata* presentó una actividad antitumoral. Justifique su respuesta.

Apéndice I: Conocimientos previos

1. Características generales de la cepa *Agrobacterium tumefaciens*.
2. Ventajas y desventajas del ensayo de inhibición de los tumores inducidos por la especie *A. tumefaciens* en discos de papa.
3. Precauciones que se deben considerar para obtener resultados óptimos.
4. Porcentaje de inhibición que considera una actividad antitumoral positiva en el ensayo de los discos de papa.
5. Compuestos antitumorales presentes en la especie *Annona muricata*.
6. Mecanismos de acción mediante los cuales los compuestos presentes en las especies de *A. muricata* ejercen el efecto antitumoral.
7. Mencionar dos técnicas alternativas para evaluar el efecto antitumoral de compuestos de interés.
8. Importancia de emplear controles.

Apéndice II: Preparación de reactivos

a) Medio de cultivo

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, 0.5 g de sacarosa, 0.8 g de caldo nutritivo (Difco), 0.1 g de extracto de levadura (Difco) y 10 mL de PBS pH7.2, disolver en 100 ml de agua. Tapar el matraz con algodón, cubrir con papel aluminio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos.

b) Bacto-agar al 1%

Solubilizar 1 g de bacto-agar en 100 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave durante 15 minutos.

c) Solución de lugol

Pesar 330 mg de yodo, 660 mg de yoduro de potasio, combinar ambos con ayuda de un mortero. Lavar el contenido de éste con pequeñas porciones de agua destilada, aforar a 100 mL, almacenar en un contenedor ámbar.

Apéndice III: Disposición de Residuos

R1: Residuos de papa

R2: Cajas de Petri conteniendo discos de papa inoculados con *A. tumefaciens*, DMSO y fracción metanólica de *A. muricata*

Bibliografía

1. Galsky Alan G, Wilsey James P. and Powell Richard G. Crown Gall Tumor Disc Bioassay. A possible aid in the detection of compounds with antitumor activity. *Plant Physiology* (1980) 65, 184-185.
2. Ferrigni A.R., Putnam J.E., Anderson B., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Moore D.S., Mc Laughlin J.L., Powell R.G. and Smith C.R. Jr. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seeds. *Journal of Natural Products*, vol. 45, no. 6, 679-686, 1982.
3. Coker P.S., Radecke J., Guy C. and Camper N.D. Potato disc tumor induction assay: A multiple mode of drug action assay. *Phytomedicine* 10: 133-138, 2003.
4. Md. Abdul Qayum Sarker, Palash C. Mondol, Md. Jahangir Alam, M. Sarwar Parvez and M. Firoz Alam. Comparative study on antitumor activity of three pteridophytes ethanol extracts. *Journal of Agricultural Technology* 2011 Vol 7 (6): 1661-1671.
5. Nadeem H., Mohsin M., Afzaal H., Riaz S., Zahid A. and Muhammad S.A. Synthesis and in vitro biological activities of 4,5-disubstituted 1,2,4-triazole-3-thiols. *Advances in Microbiology*, 2013, 3, 366-375.
6. McLaughlin J.L. and Rogers L.L, The use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, *Drug Information Journal*, Vol. 32, No. 2, 1998, pp 513-524.

6.2 Cuestionario PAPIME para el grupo piloto

Estimado Alumno:

Durante el semestre 2016-1, se llevó a cabo la implementación en un grupo piloto del protocolo experimental titulado “**Ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa**”, el cual forma parte del proyecto “*Implementación y renovación de guiones experimentales para la enseñanza de la Toxicología en la licenciatura de Química Farmacéutico Biológica*”. Con la finalidad de evaluar la inserción de este protocolo le hacemos llegar este cuestionario, el cual le solicitamos sea contestado cuidadosamente. Es importante mencionar que las preguntas están clasificadas de acuerdo a los siguientes rubros: información general, opinión, área cognitiva y área de habilidades.

Fecha : _____
Grupo de laboratorio : _____
Grupo de teoría : _____

1. Información general

1.1 ¿Sabía Ud. que durante este semestre se aprobó un proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y mejoramiento de la enseñanza (PAPIME) para la el laboratorio de Toxicología?

SÍ _____ NO _____

¿Cómo se enteró? _____

1.2 ¿Conoce Ud. el objetivo del programa?

SÍ _____ NO _____

¿Cómo se enteró? _____

2. Opinión

2.1 Responda las siguientes preguntas considerando lo que más se aproxime a su experiencia

	SI	NO
Leyó cuidadosamente el protocolo previo al laboratorio		
El protocolo experimental está claro y debidamente planteado		
El desarrollo experimental del protocolo le permitió integrar los conocimientos adquiridos en la teoría		

2.2 Si en la última pregunta su respuesta fue no, indique por favor cuales temas en su opinión deberían incluirse en el laboratorio.

2.3 ¿Considera importante la inclusión en el programa de un protocolo experimental que ayude a monitorear la actividad antitumoral? ¿Por qué?.

2.3 Adicione algún comentario que considere pertinente

3. Área cognitiva

3.1 Indique tres características de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 Mencione tres ventajas del modelo experimental empleado.

3.3 Defina el fundamento del ensayo empleado.

3.4 Mencione los compuestos a los que se les atribuye la actividad antitumoral de *A. Muricata*.

4. Área de habilidades

4.1 Describa el objetivo de realizar el fraccionamiento del extracto obtenido con CH₂Cl₂-MeOH

4.2 Mencione al menos tres precauciones que se deben considerar para obtener resultados óptimos del bioensayo realizado en el laboratorio.

4.3 Indique cuál es el objetivo de emplear un control de DMSO

4.4 A continuación se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antitumoral de los extractos obtenidos de dos especies vegetales mediante el modelo de discos de papa.

Muestra Repeticiones	No. de tumores/disco					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Sesbania punicea</i>	6	8	3	5	6	8
<i>Trewia nudiflora</i>	3	5	4	5	3	4
DMSO	9	9	10	9	10	9
<i>Metrotexato + A. tumefaciens</i>	2	3	1	2	2	2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12	10	11	12	11	11

Calcule los porcentajes de inhibición de la formación de tumores y con base en los resultados, indique cuál de las dos especies constituye una fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral.

Considere que un valor mayor al 20% de inhibición se considera un resultado significativo.

6.3 Rúbrica del cuestionario PAPIME para el grupo piloto

RÚBRICA: RESPUESTAS MODELO

Pregunta	2 puntos	1 punto	0 puntos
3.1	Responde las tres características, entre ellas que contiene el plásmido Ti	Menciona las tres características pero no incluye el plásmido Ti	No contesta o contesta menos de tres características
3.2	Responde tres de cualquiera de las siguientes características: Bajo costo Equipo y material accesible No se emplean animales de experimentación Duración del experimento Correlaciona con la actividad antitumoral en líneas celulares	Responde dos de cualquiera de las siguientes características: Bajo costo Equipo y material accesible No se emplean animales de experimentación Duración del experimento Correlaciona con la actividad antitumoral en líneas celulares	Responde una de las ventajas del listado, responde otras diferentes o no contesta.
3.3	Inhibición de la formación de tumores inducidos por la integración el plásmido Ti de A. tumefaciens en discos de papa	Menciona la inhibición de la formación de tumores en discos de papa	No contesta o contesta algo diferente
3.4	-----	Familia de compuestos llamadas acetogeninas	No contesta o contesta algo diferente
4.1	-----	Disminuir la complejidad del contenido metabólico del extracto orgánico	No contesta o contesta algo diferente
4.2	Responde tres de cualquiera de las siguientes precauciones: Equipo personal de seguridad	Responde dos de cualquiera de las siguientes precauciones: Equipo personal de seguridad	Responde una de las ventajas del listado, responde otras diferentes o no contesta.

	<p>Condiciones de asepsia</p> <p>Sellado adecuado de cajas</p> <p>Filtración</p> <p>Adicionar volumen exacto de agar</p> <p>Cortar los discos con las dimensiones señaladas</p> <p>Colocar los discos de papa previo a la solidificación del agar</p>	<p>Condiciones de asepsia</p> <p>Sellado adecuado de cajas</p> <p>Filtración</p> <p>Adicionar volumen exacto de agar</p> <p>Cortar los discos con las dimensiones señaladas</p> <p>Colocar los discos de papa previo a la solidificación del agar</p>	
4.3	-----	Descartar la actividad antitumoral del DMSO	No contesta o contesta algo diferente
4.4	Incluye los cálculos y menciona la especie <i>Trewia nudiflora</i> como fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral	Solo se menciona la especie <i>Trewia nudiflora</i> como fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral	No contesta o contesta algo diferente

6.4 Cuestionario PAPIME para todos los grupos

Estimado Alumno:

Durante el semestre 2016-2, se llevó a cabo la implementación en todos los grupos de Toxicología el protocolo experimental titulado “**Ensayo de la inhibición de tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* en discos de papa**”, el cual forma parte del proyecto “*Implementación y renovación de guiones experimentales para la enseñanza de la Toxicología en la licenciatura de Química Farmacéutico Biológica*”. Con la finalidad de evaluar la inserción de este protocolo le hacemos llegar este cuestionario, el cual le solicitamos sea contestado cuidadosamente. Es importante mencionar que las preguntas están clasificadas de acuerdo a los siguientes rubros: información general, opinión, área cognitiva y área de habilidades.

Fecha : _____
Grupo de laboratorio : _____
Grupo de teoría : _____

1. Información general

1.1 ¿Sabía Ud. que durante este semestre se aprobó un proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y mejoramiento de la enseñanza (PAPIME) para la el laboratorio de Toxicología?

SÍ _____ NO _____

¿Cómo se enteró? _____

1.2 ¿Conoce Ud. el objetivo del programa?

SÍ _____ NO _____

¿Cómo se enteró? _____

2. Opinión

2.1 Responda las siguientes preguntas considerando lo que más se aproxime a su experiencia

	SI	NO
Leyó cuidadosamente el protocolo previo al laboratorio		
El protocolo experimental está claro y debidamente planteado		
El desarrollo experimental del protocolo le permitió integrar los conocimientos adquiridos en la teoría		

2.2 Si en la última pregunta su respuesta fue no, indique por favor cuales temas en su opinión deberían incluirse en el laboratorio.

2.3 ¿Considera importante la inclusión en el programa de un protocolo experimental que ayude a monitorear la actividad antitumoral? ¿Por qué?.

2.3 Adicione algún comentario que considere pertinente

3. Área cognitiva

3.1 Indique tres características de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 Mencione tres ventajas del modelo experimental empleado.

3.3 Defina el fundamento del ensayo empleado.

3.4 Mencione los compuestos a los que se les atribuye la actividad antitumoral de *A. Muricata*.

4. Área de habilidades

4.1 Mencione al menos tres precauciones que se deben considerar para obtener resultados óptimos del bioensayo realizado en el laboratorio.

4.2 Indique cuál es el objetivo de emplear un control de DMSO

4.3 A continuación se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antitumoral de los extractos obtenidos de dos especies vegetales mediante el modelo de discos de papa.

Muestra Repeticiones	No. de tumores/disco					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Sesbania punicea</i>	6	8	3	5	6	8
<i>Trewia nudiflora</i>	3	5	4	5	3	4
DMSO	9	9	10	9	10	9
<i>Metrotexato</i> + <i>A. tumefaciens</i>	2	3	1	2	2	2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12	10	11	12	11	11

Calcule los porcentajes de inhibición de la formación de tumores y con base en los resultados, indique cuál de las dos especies constituye una fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral.

Considere que un valor mayor al 20% de inhibición se considera un resultado significativo.

6.5 Rúbrica del cuestionario PAPIME para todos los grupos.

RESPUESTAS MODELO

Pregunta	2 puntos	1 punto	0 puntos
3.1	<p>Responde tres de cualquiera de las siguientes características: Contiene el plásmido Ti, relacionado con la inducción de tumores Bacteria bacilar Aerobia Gram negativa No esporulada Fitopatógena</p>	<p>Menciona las tres características pero no incluye el plásmido Ti</p>	<p>No contesta o contesta menos de tres características</p>
3.2	<p>Responde tres de cualquiera de las siguientes características: Bajo costo Equipo y material accesible No se emplean animales de experimentación Duración del experimento Correlaciona con la actividad antitumoral en líneas celulares</p>	<p>Responde dos de cualquiera de las siguientes características: Bajo costo Equipo y material accesible No se emplean animales de experimentación Duración del experimento Correlaciona con la actividad antitumoral en líneas celulares</p>	<p>Responde una de las ventajas del listado, responde otras diferentes o no contesta.</p>
3.3	<p>Inhibición de la formación de tumores inducidos por la integración el plásmido Ti de A. tumefaciens en discos de papa</p>	<p>Menciona la inhibición de la formación de tumores en discos de papa</p>	<p>No contesta o contesta algo diferente</p>
3.4	<p>-----</p>	<p>Familia de compuestos llamadas acetogeninas</p>	<p>No contesta o contesta algo diferente</p>
4.1	<p>Responde tres de</p>	<p>Responde dos de</p>	<p>Responde una de las</p>

	<p>cualquiera de las siguientes precauciones: Equipo personal de seguridad Condiciones de asepsia Sellado adecuado de cajas Filtración Adicionar volumen exacto de agar Cortar los discos con las dimensiones señaladas Colocar los discos de papa previo a la solidificación del agar</p>	<p>cualquiera de las siguientes precauciones: Equipo personal de seguridad Condiciones de asepsia Sellado adecuado de cajas Filtración Adicionar volumen exacto de agar Cortar los discos con las dimensiones señaladas Colocar los discos de papa previo a la solidificación del agar</p>	<p>ventajas del listado, responde otras diferentes o no contesta.</p>
4.2	-----	<p>Descartar la actividad antitumoral del DMSO</p>	<p>No contesta o contesta algo diferente</p>
4.3	<p>Incluye los cálculos y menciona la especie <i>Trewia nudiflora</i> como fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral</p>	<p>Solo se menciona la especie <i>Trewia nudiflora</i> como fuente potencial de compuestos con actividad antitumoral</p>	<p>No contesta o contesta algo diferente</p>

7. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. *Cancer*. 2017 [cited 2017 Abril 16, 2017]; Available from: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>.
2. Cekanova, M. and K. Rathore, *Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations*. *Drug Des Devel Ther*, 2014. **8**: p. 1911-21.
3. Lum, D.H., et al., *Overview of human primary tumorgraft models: comparisons with traditional oncology preclinical models and the clinical relevance and utility of primary tumorgrafts in basic and translational oncology research*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2012. **Chapter 14**: p. Unit 14 22.
4. McLaughlin, J.L., L.L. Rogers, and J.E. Anderson, *The use of biological assays to evaluate botanicals*. *Drug Information Journal*, 1998. **32**: p. 513-524.
5. Ferrigni, N.R., et al., *Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of euphorbiaceae seeds*. *J Nat Prod*, 1982. **45**(6): p. 679-86.
6. Galsky, A.G. and J.P. Wilsey, *Crown Gall Tumor Disc Bioassay: A POSSIBLE AID IN THE DETECTION OF COMPOUNDS WITH ANTITUMOR ACTIVITY*. *Plant Physiol*, 1980. **65**(2): p. 184-5.
7. Holt, J.G. and D. Hendricks-Bergey, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. 1994.
8. De la Riva, G.A., J.V.-P. González-Cabrera, R., and C. Ayra-Pardo *Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation*. 1998. **1**, DOI: 10.2225/vol1-issue3-fulltext-1.
9. Kado, C.I., *Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by Agrobacterium tumefaciens*. *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 340.
10. Joos, H., et al., *Genetic analysis of transfer and stabilization of Agrobacterium DNA in plant cells*. *EMBO J*, 1983. **2**(12): p. 2151-60.

11. Bourras, S., T. Rouxel, and M. Meyer, *Agrobacterium tumefaciens Gene Transfer: How a Plant Pathogen Hacks the Nuclei of Plant and Nonplant Organisms*. *Phytopathology*, 2015. **105**(10): p. 1288-301.
12. Christie, P.J. and J.E. Gordon, *The Agrobacterium Ti Plasmids*. *Microbiol Spectr*, 2014. **2**(6).
13. Zhu, Y., et al., *Identification of Arabidopsis rat mutants*. *Plant Physiol*, 2003. **132**(2): p. 494-505.
14. Filichkin, S.A. and S.B. Gelvin, *Formation of a putative relaxation intermediate during T-DNA processing directed by the Agrobacterium tumefaciens VirD1,D2 endonuclease*. *Mol Microbiol*, 1993. **8**(5): p. 915-26.
15. Howard, E.A., et al., *Activation of the T-DNA transfer process in Agrobacterium results in the generation of a T-strand-protein complex: Tight association of VirD2 with the 5' ends of T-strands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(11): p. 4017-21.
16. Cascales, E. and P.J. Christie, *Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate*. *Science*, 2004. **304**(5674): p. 1170-3.
17. Chen, L., et al., *A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*, 2002. **184**(17): p. 4838-45.
18. Mysore, K.S., J. Nam, and S.B. Gelvin, *An Arabidopsis histone H2A mutant is deficient in Agrobacterium T-DNA integration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(2): p. 948-53.
19. Gohlke, J. and R. Deeken, *Plant responses to Agrobacterium tumefaciens and crown gall development*. *Front Plant Sci*, 2014. **5**: p. 155.
20. Subramoni, S., et al., *Agrobacterium tumefaciens responses to plant-derived signaling molecules*. *Front Plant Sci*, 2014. **5**: p. 322.
21. CONABIO. *Guanábana (Annona muricata)*. 2017 [cited 2017 Marzo 1, 2017]; Available from: <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6026874>.
22. Moghadamtousi, S.Z., et al., *Annona muricata (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(7): p. 15625-58.

23. Bermejo, A., et al., *Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(2): p. 269-303.
24. Mangal, M., M.I. Khan, and S.M. Agarwal, *Acetogenins as Potential Anticancer Agents*. Anticancer Agents Med Chem, 2015. **16**(2): p. 138-59.