

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Utilización de *Agrobacterium tumefaciens* como generadora de tumores in vitro para el análisis de actividad antitumoral de metabolitos secundarios

Use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generator of tumors in vitro for the analysis of antitumor activity of secondary metabolites

Andrea Parreño^a

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 20/09/2021
Aceptación: 20/11/2021

PALABRAS CLAVE

Ensayo de disco de papa, tumores, inhibición, actividad antitumoral.

RESUMEN

El presente artículo de revisión habla sobre el ensayo de disco de papa desarrollado entre los años 1955 y 1982 usando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para generar tumores, veremos por qué puede ser usado para probar actividad antitumoral de diversos metabolitos secundarios estudiados y de las ventajas que tiene este *screening* en comparación con otros ensayos a base de líneas celulares, además de la importancia de su uso en diversas publicaciones actuales, especialmente en países en vías de desarrollo donde la medicina ancestral aún es ampliamente usada.

ARTICLE HISTORY

Received: 20/09/2021
Accepted: 20/11/2021

KEY WORDS

Potato discs assay, tumors, inhibition, antitumoral activity.

ABSTRACT

This review article discusses the potato disc assay developed between 1955 and 1982 using *Agrobacterium tumefaciens* strains to generate tumors, we will see why it can be used to test antitumor activity of various secondary metabolites and the advantages of this screening compared with other tests based on cell lines in addition to the importance of its use in various current publications, especially in developing countries where ancestral medicine is still widely used.

INTRODUCCIÓN

La *agalla de corona* es una enfermedad de carácter vegetal que infecta a la mayoría de las plantas dicotiledóneas, su principal característica es producir agallas a nivel de las raíces y cuello de las mismas. El microorganismo causante de esta enfermedad es *Agrobacterium tumefa-*

ciens actualmente llamada *Rhizobium radiobacter*, que es una bacteria móvil en forma de varilla, gram negativo, perteneciente a la familia Rhizobiaceae. Esta bacteria ingresa a los tejidos vegetales a través de heridas frescas en una amplia gama de plantas que, como se mencionó anteriormente, incluyen muchas dicotiledóneas, aunque

también se observa la infección en pocas monocotiledóneas y algunas gimnospermas (Hajivand, 2013, citado por Rahman *et al.*, 2020).

Las cepas patógenas comparten la característica de contener un plásmido llamado Ti por sus siglas en inglés (tumor-inducing) de entre 200 y 800 kpb, el mecanismo por el que infecta a la planta se debe a la transferencia de ADN del plásmido Ti a las células vegetales, los genes insertados influyen indirectamente en la biosíntesis de auxinas y citoquininas que causa una división celular descontrolada y tumorigenicidad. La capacidad de esta bacteria de transferir su ADN es ampliamente usado en varios bioensayos (Hajivand, 2013, citado por Rahman *et al.*, 2020), especialmente para la transformación y mejoramiento de plantas (plantas transgénicas), transformación de hongos y también para varios estudios moleculares; además de estos ensayos *A. tumefaciens* sigue siendo usada para evaluar actividad antitumoral y antimetabólica de diversos metabolitos; esta revisión se enfocará en la importancia del uso de *A. tumefaciens* como generador de tumores en discos de papa y revisaremos algunas investigaciones actuales donde sigue siendo usada como screening inicial para compuestos que recientemente son estudiados y que podrían tener capacidades antitumorales.

ENSAYO DE DISCO DE PAPA COMO SCREENING INICIAL PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

El primer ensayo semicuantitativo para inducción de tumores mediante *A. tumefaciens* fue desarrollado en 1955 por Klein y Tenenbau, quienes utilizaron tejido de raíz de zanahoria, desafortunadamente debido a la limitada utilidad que tenía para la evaluación bioquímica asociada con la conversión de células normales a células tumorales este tejido fue descartado y reemplazado por el ensayo realizado por Anand y Heberlein quienes probaron los discos de papa; la simplicidad del procedimiento y la homogeneidad del tejido, junto con el hecho de que el bioensayo es cuantitativo, hizo que este sistema sea ideal para la investigación bioquímica de compuestos con posible capacidad antitumoral (1977).

Para el año de 1981 Galsky *et al.* compararon este ensayo con ensayos en líneas celulares. Tomaron la información de varios compuestos con actividad antitumoral probados en ensayos de leucemia de ratón (P388) y compararon los mismos en el ensayo de disco de papa; observaron que existía una posible correlación y establecieron varias ventajas sobre otros modelos celulares. También se demostró que la acción antitumoral de estos compuestos no era por antibiosis (incapacidad de organismos de vivir en inmediaciones de otros) ni por inhibición de la unión bacteriana a los sitios de unión al tumor.

En estudios preliminares entre 1980 y 1983, efectuados en la Universidad de Purdue, se modificó el ensayo de disco de papa de Galsky para hacerlo un ensayo de rutina y ser usado como preselección antitumoral en extractos crudos de plantas. Dentro de las modificaciones hechas existen dos que son las más notables: 1. Usar DMSO (dimetil sulfoxido) como solvente universal para los extractos de plantas; y 2. usar una solución de yodo / yoduro de potasio para teñir las células de fondo que contienen almidón, es decir, las células no tumorales (normales) para facilitar el conteo de tumores (Ferrigni *et al.*, 1982), además de las modificaciones hechas probaron su efectividad con una evaluación estadística apropiada y se observó que los resultados del cribado de plantas del ensayo de disco de papa estaban fuertemente asociados con los resultados de 3PS (P388), con lo que definitivamente se concluyó que este ensayo podría emplearse rutinariamente y que podía ser usado como una preselección comparativamente rápida, económica, segura, que ahorra animales y es estadísticamente confiable para la actividad antitumoral in vivo (Ferrigni *et al.*, 1982, citado por McLaughlin & Rogers, 1998).

ENSAYO DE DISCO DE PAPA

El ensayo de Ferrigni *et al.*, con las modificaciones hechas por Galsky es el ensayo de elección, algunos investigadores lo modifican dependiendo de las necesidades del estudio, pero generalmente el protocolo inicia con un cultivo 48 horas de *A. tumefaciens* en medio de extracto de levadura (YEM), que es ajustado a 1×10^9 UFC con dimetil sulfoxido (DMSO).

Por otro lado, se lavan y desinfectan papas Russet (*Solanum tuberosum* L.), utilizando hipoclorito de sodio, se cortan para que la superficie quede sin cáscara; éstas se colocan nuevamente en hipoclorito de sodio para su desinfección y se procede a cortar en el centro de la papa con ayuda de un taladro de corchos de aproximadamente 10 mm de diámetro; al cilindro obtenido se le cortan y descartan los extremos y el restante es fraccionado en cilindros **más pequeños** de 5 mm de espesor, todo esto se realiza bajo condiciones asépticas y en cámara de flujo.

Los cilindros obtenidos se colocan en una placa con agar al 1,5% y se inoculan con 50 μ l la mezcla de extracto (solución)/agua/bacteria apropiada y se incuban a temperatura ambiente durante 12 días.

Al finalizar el tiempo de incubación, los discos se tiñen con reactivo de Lugol y son observados en un microscopio de disección, donde se puede evidenciar el tejido de papa de color azul oscuro a marrón y los tumores de color crema a naranja.

Para calcular el porcentaje de inhibición se considera la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Promedio de tumores en la muestra}}{\text{Promedio de tumores en el control}} \times 100 \quad (1)$$

El ensayo previamente descrito eventualmente se utiliza como parte de un screening inicial para evaluar actividad biológica en plantas debido a su bajo costo y al fácil uso por lo que esto resulta ser una ventaja para preseleccionar extractos y ampliar el estudio de su actividad antitumoral en caso de obtener una inhibición importante de tumores.

SU USO COMO SCREENING INICIAL DE COM- PUESTOS CON CAPACIDADES ANTITUMORALES EN INVESTIGACIONES ACTUALES.

En la búsqueda de nuevos medicamentos para tratar diferentes enfermedades los investigadores observan la medicina tradicional o medicina ancestral y las diferentes plantas usadas en ésta. Para empezar a analizar la actividad antitumoral de dichas plantas y los extractos obtenidos de éstas, el ensayo de disco de papa resulta ser una de las primeras opciones debido a su bajo costo y facilidad de implementación. Actualmente existen varias publicaciones donde se refiere la utilización de este ensayo, por lo que en este apartado se resumirán las más relevantes.

Myanmar es un país en vías de desarrollo conocido como el jardín botánico del mundo por su alta producción de plantas medicinales. Aquí, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población depende exclusivamente de esta medicina, por lo que Lae *et al.* en su estudio quisieron determinar las características fitoquímicas y algunas actividades biológicas de los extractos obtenidos de *Phyllanthus Albizzoides*, una planta medicinal muy usada. En esta investigación se encontró que el extracto etanólico de la corteza del tallo mostraba una significativa inhibición de tumores provocados por *A. tumefaciens* en disco de papa, además se encontró fuerte actividad antioxidante, antimicrobiana y antidiabética de estos extractos; el autor concluye que su estudio puede contribuir con el uso extendido de los tallos de la planta en la medicina tradicional de su país (2019).

Otra revisión actual donde se muestra el uso de este ensayo es el realizado por Thakur *et al.*, la investigación proporciona información sobre valores nutricionales, fitoquímica y aspectos farmacológicos modernos de un fruto muy utilizado en la India llamado manzana de madera (*Feronia limonia*), que ha sido subutilizada y descuidada. La investigación utilizó el disco de papa para evaluar actividad antitumoral y aunque se encontró que esta era poco significativa, se llegó a la conclusión que este fruto tiene diversas capacidades medicinales que se necesitan continuar investigando (2020).

En el artículo publicado por Tun *et al.*, se evaluó la actividad antitumoral de los extractos obtenidos de los

tallos de *Allamanda cathartica* L, se encontró que los extractos de etanol, acetato de etilo y éter de petróleo tenían una significativa inhibición de los tumores, dependiente de la concentración de los mismos. Por otro lado, se encontró actividad antioxidante y antimicrobiana especialmente en los extractos con etanol, por lo que los autores concluyen que el estudio podría contribuir a que los tallos de *A. cathartica* se puedan utilizar en la formulación de la medicina tradicional, además de que se puede continuar investigando su capacidad antitumoral con otros ensayos en líneas celulares más complejas (2020).

PERSPECTIVA/PUNTO DE VISTA

El Ecuador es un país megadiverso con gran variedad de vegetación, dentro de las plantas que han sido reportadas la cuarta parte son endémicas y de estas el 7% fueron catalogadas como útiles (De la Torre *et al.*, 2008)

El 60% de estas plantas halladas en Ecuador tienen usos medicinales, pero aún falta seguir investigando y profundizando el estudio de los metabolitos contenidos y sus propiedades bioquímicas y biológicas; como ha quedado evidenciado en los estudios reportados en este artículo de revisión el ensayo de disco de papa es viable y económico como screening inicial para determinar propiedades antitumorales, sin embargo, en el Ecuador no se ha reportado su uso estandarizado destacando así la importancia de desarrollar esta metodología y además aislar y mantener la cepa de *A. tumefaciens* generadora de tumores para que pueda ser usada como un ensayo de rutina en nuevas investigaciones.

REFERENCIAS

1. Anan V, Heberlein G. Crown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. *Amer. J. Bot.* [online]. 1977; 64(2): 153-158, <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1977.tb15713.x>
2. Coker P, Radecke J, Guy C, Camper N. Potato disc tumor induction assay: a multiple mode of drug action assay. *Phytomedicine.* [online]. 2003; 10, 133-138, <https://doi.org/10.1078/094471103321659834>
3. Ferrigni N, Putman J, Anderson B, Jacobsen L, Nichols D, Moore D, Maclaughlin J. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seeds. *Journal of natural products.* [online]. 1982; 45, 679-687. <https://doi.org/10.1021/np50024a005>
4. Galsky A, Kozimo R, Piotrowsky D, Powell R. The crown-gall potato disk bioassay as a primary screen for compounds with antitumoral activity. *JNCI.* [online]. 1981; 67, 689-692. <https://academic.oup.com/jnci/article/67/3/689/950120>
5. Lae K, Su S, Win N, Than N, Ngwe H. Isolation of

6. lasiodiplodin and evaluation of some biological activities of the stem barks of *Phyllanthus albizzoides* (Kurz) Hook.f. *SciMedicine Journal*. [online]. 2019; 1(4): 199-216. https://www.researchgate.net/publication/339253872_Isolation_of_Lasiodiplodin_and_Evaluation_of_some_Biological_Activities_of_the_Stem_Barks_of_Phyllanthus_Albizzoides_Kurz_Hookf
7. McLaughlin J, Rogers L, The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. [online]. 1998; 32, 513-524. <https://doi.org/10.1177/009286159803200223>
7. Rahman S, Ahmand K, Ali N, Idrees M. Isolation and characterization of *agrobacterium tumefaciens* strains from malakander farm, University of Agriculture, Peshawar. *Pakistan Journal of Zoology*. [online]. 2020; 52, 2019-2021. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20181021061044>
8. Thakur N, Chugh V, Dwivedi S. Wood apple: an underutilized miracle fruit of India. *The Pharma Innovation Journal*. 2020; 9, 198-202. <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2020&vol=9&issue=10&ArticleId=5227>
9. De la Torre H, Navarrete P, Muriel M, Macía M, Balslev H. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*. 2008; 20, 122, 583.
10. Tun Y, Lae K, Win N, Ngwe H. Phytochemical constituents and some biological activities of the stem of *Allamanda Cathartica* L. (Shewewa-Pan. J. Myanmar Acad. Arts Sci. 2020; 18, 11-26. https://www.researchgate.net/publication/342987674_PHYTOCHEMICAL_CONSTITUENTS_AND_SOME_BIOLOGICAL_ACTIVITIES_OF_THE_STEMS_OF_ALLAMANDA_CATHARTICA_L_SHWEWA-PAN