

BIOENSAYOS CON *Artemia salina* EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Data de submissão: 22/08/2024

Data de aceite: 01/10/2024

Rafael Manuel de Jesús Mex Álvarez

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
de la Universidad Autónoma de Campeche

Roger Enrique Chan Martínez

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
de la Universidad Autónoma de Campeche

María Magali Guillen Morales

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
de la Universidad Autónoma de Campeche

Patricia Margarita Garma Quen

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
de la Universidad Autónoma de Campeche

David Yanez Nava

Facultad de Ciencias Químico Biológicas
de la Universidad Autónoma de Campeche

RESUMEN: *Artemia salina* (*A. salina*) es un crustáceo fácilmente adaptable a condiciones de laboratorio y fácil de trabajar pues no requiere de cuidados el cual gracias a su sensibilidad frente a un gran número de sustancias se ha convertido un estándar en cuanto a la determinación de toxicidad tanto en humanos como en el medioambiente. *A. salina* puede ser usado en el área de la biomedicina ayudándonos a conocer la

seguridad de nuevas moléculas o productos medicinales mediante la estimación de su dosis letal 50 (DL50) así como su potencial farmacológico ya que se encuentra relación entre acción sobre *A. salina* y la citotoxicidad. La CL50 es un parámetro que nos ayuda a establecer las concentraciones en las que son seguras sustancias como los pesticidas y los fármacos; no solo en humanos sino también en otras especies contribuyendo al estudio del impacto ambiental ocasionado por la presencia de productos farmacéuticos en los ecosistemas contribuyendo a la ecotoxicología y la ecofarmacovigilancia.

INTRODUCCIÓN

A. salina es un crustáceo capaz de soportar niveles altos de salinidad y bajos niveles de oxígeno cuyos huevos se transforman en quistes como forma de supervivencia, los cuales son formas muy resistentes capaces de soportar condiciones extremas como altas temperaturas, sequedad extrema y falta de oxígeno, además de soportar líquidos peligrosos y la presencia de pesticidas.

El ciclo de vida de *A. salina* es corto y es una especie fácilmente adaptable a condiciones de laboratorio, fácil de trabajar y que prácticamente no requiere de cuidados más allá de los necesarios para la eclosión de sus quistes. Es una especie altamente sensible a sustancias peligrosas como metales pesados, fármacos, pesticidas, productos naturales, entre otras; lo cual la ha llevado a ser un estándar en cuanto a la determinación de toxicidad tanto en humanos como en el medioambiente.

Es por todo lo expuesto anteriormente que *A. salina* tiene grandes aportaciones al área de la biomedicina pues nos permite relacionar la letalidad de fármacos o productos medicinales con la probable capacidad que tengan dichas sustancias contra células cancerígenas, insectos y también como uso farmacológico ya que se han encontrado relación entre acción sobre *A. salina* y la citotoxicidad. Además, nos da una estimación de la seguridad de esos productos.

Artemia salina

La *Artemia salina* es un crustáceo branquiópodo perteneciente a la familia Artemiidae (figura 1), llega a medir de 8 a 10 mm para el caso de los machos y de 10 a 12 mm para el caso de las hembras, en su estado adulto cuenta con tres ojos y hasta 11 pares de piernas. Es una especie endémica del mediterráneo aunque tiene una distribución cosmopolita, pudiéndose encontrarse en todos los continentes; suele vivir en lagos y estanques con una alta salinidad, llegando a soportar concentraciones de 300 gramos de sal por litro de agua, esto gracias a que cuentan con una gran capacidad de regular su presión osmótica, además de poder acoplarse a lugares con bajos niveles de oxígeno, de 0.5 mg de oxígeno por litro de agua en su estado adulto, ya que tienden a absorber el poco oxígeno existente en agua salina.



Figura 1. Taxonomía de *Artemia salina* (Imagen tomada de: <https://www.flickr.com/photos/xavipat/4451152486>).

Su anatomía es simple ya que su cuerpo está dividido en tres estructuras la cabeza, el torso y el abdomen, a pesar de esto es una especie que presenta dimorfismo sexual habiendo diferencias entre el tamaño de las antenas, separación de los ojos y ancho del abdomen. Presenta dos formas de reproducción sexual, dependiendo de las condiciones puede ser ovovivíparo o vivíparo llenado a depositar alrededor de 200 huevos.

Quistes de Artemia salina

En un ambiente favorable los huevos de *Artemia salina* eclosionan convirtiéndose directamente en nauplios, pero, si estos se encuentran en condiciones de baja humedad se transforman en quistes como forma de supervivencia hasta que se reestablezcan las condiciones óptimas. Los quistes son formas muy resistentes capaces de soportar condiciones extremas como altas temperaturas, sequedad extrema y falta de oxígeno, además de soportar líquidos peligrosos y la presencia de pesticidas.

Morfología de los quistes secos

Los quistes de *Artemia salina* (figura 2) están formados por:

El corion: el cual consiste en una dura capa formada por lipoproteínas bañadas de quitina y hematina. Esta capa protege al embrión contra rupturas mecánicas y radiaciones.

Membrana cuticular externa: protege al embrión de la penetración de moléculas mayores a las del CO_2 .

Cutícula embrionaria: capa transparente y altamente elástica que queda separada del embrión por la membrana cuticular interna.

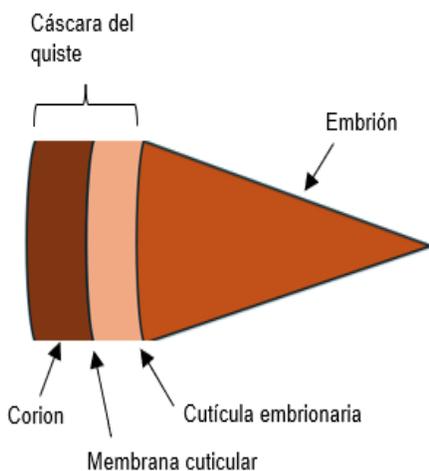


Figura 2. Ultraestructura de los quistes.

Metabolismo de los quistes en desarrollo

Los quistes secos son muy higroscópicos y una vez completamente hidratados comienzan su metabolismo siempre y cuando se encuentren suficientemente iluminados. A baja iluminación eclosionan menos artemias o no ocurre la eclosión.

El metabolismo anaeróbico en el embrión enquistado asegura la formación de glicógeno y glicerol a partir de trealosa que son acumulados en la membrana cuticular externa, la producción de altos niveles de glicerol el cual es muy higroscópico ocasiona un aumento en la asimilación de agua por el embrión, esto aumenta la presión osmótica de la membrana cuticular externa la cual llega a un punto crítico y ocasiona la ruptura de esta membrana y la cáscara del quiste. El glicerol es liberado en el medio.

El desarrollo hasta larva nauplio libre y nadadora después de la ruptura del quiste no se efectuará si el medio en el que se encuentra no es similar a la del agua de mar.

Cuando el embrión empieza a diferenciarse en larva nauplio móvil, en la cabeza del nauplio se segrega una enzima de eclosión la cual desgasta la membrana de eclosión haciendo posible la liberación del nauplio al medio.

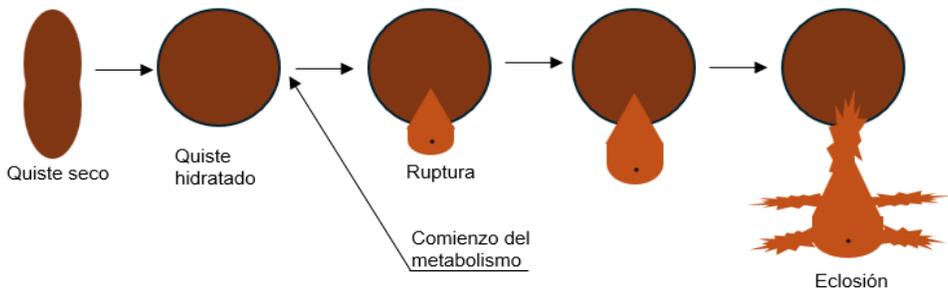


Figura 3. Desarrollo del quiste de Artemia quistes de la incubación hasta la liberación del nauplio.

Ciclo de vida de la Artemia salina

Posterior a la eclosión, las artemias continúan en la fase de larva que consta de tres estadios: nauplio, metanauplio y juvenil, para posteriormente convertirse en artemias en fase adulta (Sánchez, 2017).

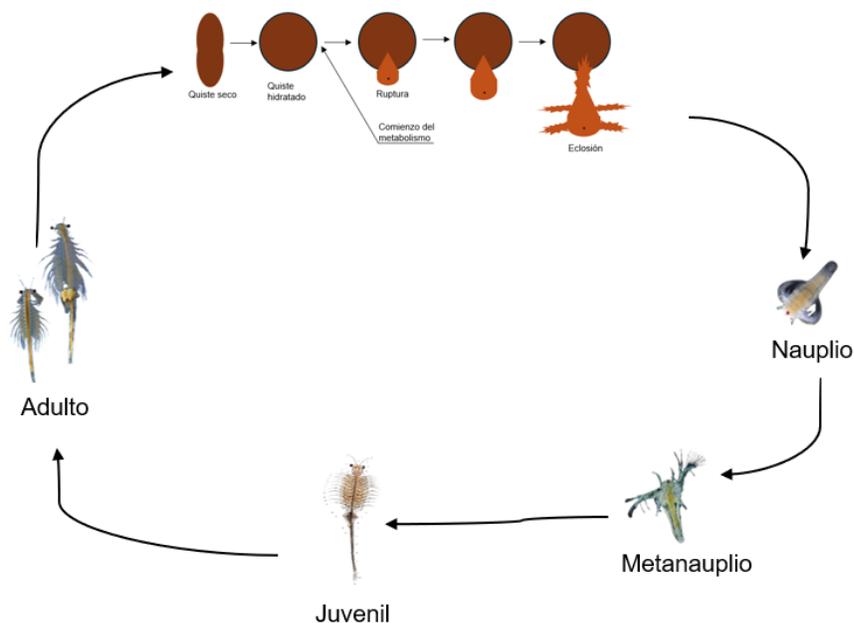


Figura 4. Ciclo de vida de Artemia (fuente: elaboración propia con imágenes tomadas de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Науплиус_Артемии.JPG, https://commons.m.wikimedia.org/wiki/File:Artemia_salina_campo_oscuro.jpg y https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Artemia_salina_.jpg a las que se les eliminó el fondo).

Nauplio: es prácticamente una cabeza nadadora de un solo ojo que les permite encontrar comida acercándose a la luz, es decir, presenta fototropismo positivo.

Metanauplio: parecido al nauplio solo que desarrolla nuevos segmentos y presenta dos ojos.

Juvenil: ya es prácticamente un adulto, aquí empieza la diferenciación sexual.

Letalidad en Artemia salina

A. salina es una especie sensible a diversas sustancias lo que ha llevado a su empleo en estudios para la determinación de la toxicidad sustancias como los metales pesados entre los que encontramos arsénico, plomo, cromo, cobre, cadmio, cobalto, zinc, níquel y mercurio; plaguicidas como carbamatos y organofosforados; fármacos como antibióticos; productos naturales como polifenoles, terpenos y alcaloides; y toxinas producidas por hongos.

La estimación de la letalidad de una sustancia se realiza mediante la determinación de la concentración letal 50 la cual es la concentración necesaria para matar al 50 por ciento de una población, en este caso, concentración para matar a la mitad de una determinada población de *A. salina*.

La CL50 es un parámetro que nos ayuda a establecer las concentraciones en las que son seguras sustancias como los pesticidas y los fármacos; no solo en humanos sino también en otras especies contribuyendo al estudio del impacto ambiental ocasionado por la presencia de productos farmacéuticos en los ecosistemas (contribuyendo a la ecotoxicología y la ecofarmacovigilancia), un problema que vivimos actualmente.

Artemia salina usado en bioensayo

Un bioensayo se usa para estimar la concentración o actividad biológica de una sustancia midiendo su efecto sobre un sistema vivo. El ensayo de *Artemia salina* determina de manera general la letalidad de ciertas sustancias frente a estos pequeños crustáceos y puede emplearse con la finalidad de relacionarse con la probable capacidad farmacológica ya que se han encontrado relación entre acción sobre *Artemia salina* y la citotoxicidad.

Gracias a este bioensayo se puede establecer la relación entre la toxicidad de las plantas y la presencia de ciertos metabolitos secundarios apoyando en la búsqueda sustancias con actividad anticancerígena, insecticida e incluso antimicrobiana y es que se ha encontrado correlación entre la concentración de alcaloides en extractos de plantas y su actividad contra *A. salina*.

El uso de artemias es debido a que se adapta muy bien a las condiciones de laboratorio, tiene un ciclo de vida corto con cuerpo pequeño lo cual permite usar volúmenes muy pequeños en los ensayos. Por ejemplo, se han realizado ensayos en microplacas de 96 pocillos dando excelentes resultados de esta manera abaratando los costos de realización de los experimentos. El bioensayo con *A. salina* puede fungir como sustituto de pruebas en las que se utilizan colorantes tetrazoicos como el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

Para llevar a cabo las pruebas con *A. salina* primero se tienen que eclosionar los huevos, en la bibliografía se pueden encontrar distintas condiciones para lograr esto; sin embargo, la más utilizada consiste en eclosionar los huevos 48 h antes de su uso. Esto se logra fácilmente lavando los quistes con agua destilada y descartando los que permanezcan en la superficie, después se proceden filtrar para recuperar los quistes buenos los cuales se colocan en una solución de sal preparada con 30 gramos de sal por cada litro de agua. Estos se dejan eclosionar con un bombeo constante de oxígeno para favorecer las condiciones del medio.

En una placa de 24 pocillos o en tubos de ensayo se procede a hacer diluciones seriadas de la sustancia a analizar y se agregan entre 10 y 20 nauplios, procurando que los pocillos o tubos tengan el mismo volumen y realizando el ensayo por triplicado. La prueba puede realizarse durante un tiempo establecido por la persona que la realiza siendo lo más común que se prolongue 48 h, contando la cantidad de artemias muertas a las 24 y a las 48 horas.

La determinación de la CL50 se realiza al encontrar las concentraciones a las que el 50 % de los nauplios muere, aunque, también se pueden analizar otros factores como el comportamiento y el fototropismo que presentan las larvas expuestas con el fin de determinar otros parámetros como la concentración tóxica 50 que se define como la concentración a la que el 50 % de una población presenta efectos tóxicos. Adicionalmente, es posible aplicarse un tratamiento estadístico conocido como Probits que consiste en aplicar una transformación logarítmica a los datos obtenidos con el fin de establecer una relación lineal y con ayuda de la ecuación de la recta encontrar la letalidad o toxicidad 50.

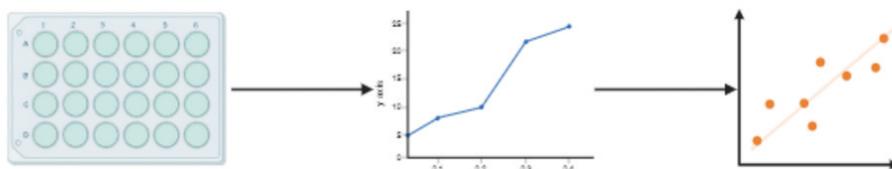


Figura 5. Evaluación de resultados mediante el método Probits (fuente: elaboración propia con el programa © 2024 BioRender)

De igual manera, en la actualidad se encuentran en desarrollo de nuevos métodos para el empleo de *A. salina* como ensayos de expresión de genes y actividad de enzimas.

CONCLUSIÓN

A. salina presenta características que la vuelven idónea para estudios de toxicología, principalmente en para la determinación de CL50; sin embargo, sus aplicaciones se pueden extender al área de la medicina contribuyendo a la búsqueda de nuevas moléculas con actividades antibióticas, insecticidas y anticancerígenas.

REFERENCIAS

Borroto, J., Trujillo, R., de la Torre, Y. C., Waksman, N., Hernández, M., & Salazar, R. (2011). Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royc* L. *Revista cubana de plantas medicinales*, 16(1), 34-42.

Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sariego Ramos, I., Acuña Rodríguez, D. & Gutiérrez Gaitén, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.

González, A. M., Presa, M., Latorre, M. G., & Lurá, M. C. (2007). Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista iberoamericana de micología*, 24(1), 59-61.

Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin/Makedonsko Farmaceutvski Bilten*, 60(1).

- Harwig, J., & Scott, P. (1971). Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Applied microbiology*, 21(6), 1011-1016.
- Jaramillo-Jaramillo, C., Jaramillo-Espinoza, A., D'Armas, H., Troccoli, L., & de Astudillo, L. R. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171-1184.
- Lewan, L., Andersson, M., & Morales-Gomez, P. (1992). The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, 20(2), 297-301.
- Michael, A. S., Thompson, C. G., & Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*, 123(3194), 464-464.
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological indicators*, 69, 35-49.
- Moreira, F. D. P. M., Coutinho, V., Montanher, A. B. P., Caro, M. S. B., Brighente, I. M. C., Pizzolatti, M. G., & Monache, F. D. (2003). Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*: bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, 26, 309-311.
- Munteanu, C., DumitrașCU, M., & Biosafety, S. C. (2011). *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*, 2(4).
- Nascimento, J. E., Melo, A. F. M., Lima, T. C., Veras Filho, J., Santos, E. M. X., Albuquerque, U. P., & Amorim, E. L. C. (2008). Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29(2).
- Nguta, J. M., Mbaria, J. M., Gakuya, D. W., Gathumbi, P. K., Kabasa, J. D., & Kiama, S. G. (2011). Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacologyonline*, 2(1), 458-478.
- Pérez, Y. G., & Gilling, P. A. (2001). Determinación de la toxicidad aguda del dicromato de potasio en larvas de *Artemia salina*. *Anuario Toxicología*, 1(1), 4-108.
- Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 1-6.
- Sanabria-Galindo, A., López, S. I., & Gualdrón, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26(1).
- Sánchez, L., & Neira, A. (2005). Bioensaio general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava*. L y *Psidium guineense*. Sw. *Cultura científica*, (3), 40-45.
- Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P., & Phillipson, J. D. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta médica*, 59(03), 250-252.
- Veni, T., & Pushpanathan, T. (2014). Comparison of the *Artemia salina* and *Artemia fransiscana* bioassays for toxicity of Indian medicinal plants. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(6), 453-457.