

Bioensayos *in vitro* de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias

Raúl A. Ávila Cervantes ^a, Gabriela Mancilla Montelongo ^{b*}, Pedro G. González Pech ^a, Carlos A. Sandoval Castro ^a, Felipe Torres Acosta ^a

Los ensayos *in vitro* o bioensayos son técnicas especializadas realizadas en organismos bajo condiciones controladas de laboratorio y que pueden incluir cultivos celulares, bacterias, hongos, insectos, plantas e incluso pequeños animales como helmintos o artrópodos. Los bioensayos se utilizan en varias áreas de la ciencia para conocer las reacciones de algún organismo ante la presencia controlada de una o varias sustancias. Las reacciones pueden incluir diferentes efectos benéficos, pero también negativos, e incluso hasta la toxicidad o muerte del organismo evaluado. También, los bioensayos pueden usarse para describir los eventos implicados en la expresión de un fenómeno. Así, el uso de bioensayos permite identificar la eficacia de una gran variedad de sustancias y estandarizar su uso antes de realizar evaluaciones con vertebrados en condiciones *in vivo*. Los bioensayos han cobrado gran relevancia ante las restricciones cada vez más severas contra la experimentación con animales de laboratorio, domésticos o de compañía. El presente trabajo describe algunos modelos de bioensayos relevantes utilizados para evaluar actividades biológicas como parte de la bioprospección en medicina y ciencias agropecuarias.

Características de los bioensayos

Existen sustancias con un amplio espectro de efectos sobre los organismos. Por tanto, es necesario realizar más de un bioensayo para evaluar esas sustancias. Se dispone de una gran variedad de bioensayos en función de los objetivos de investigación. Para realizar un bioensayo es importante identificar: (a) qué sustancia será evaluada, (b) en qué sustrato será utilizada, (c) en qué organismo se probará, y (d) qué tipo de respuesta podría ser detectada, por ejemplo, efecto antimicrobiano, antihelmíntico o de toxicidad, entre otros. Cuando el compuesto evaluado tiene efectos benéficos o adversos sobre un organismo se considera que

tiene actividad biológica o farmacológica. Dado que tanto las sustancias a evaluar y los organismos pueden ser muy diversos, la actividad biológica también puede ser diversa. Por ejemplo, hay bioensayos para el control de la proliferación de hongos, bioensayos en plantas e incluso en helmintos, insectos, arácnidos o crustáceos (Fig. 1).

La toxicidad es la capacidad de una sustancia química que, al estar en contacto con un organismo por exposición, ingestión, absorción, inyección, e inhalación en cantidad suficiente, tiene la capacidad de ocasionar daño a células, tejidos, órganos o sistemas e incluso provocar la muerte (Langman y Kapur 2006). En este contexto, los bioensayos pueden servir para evaluar el potencial tóxico de sustancias e identificar los diferentes daños o lesiones (Gámez y Más 2007). En los bioensayos de toxicidad la muerte es considerada sólo como una respuesta biológica más (Pérez y Lazo 2010) y se reporta como un valor de mortalidad o letalidad.

Los bioensayos muchas veces se usan como un primer paso para decidir si es relevante investigar si alguna sustancia podría ser empleada en plantas, animales o humanos. Con estas pruebas es posible calcular la concentración requerida para identificar algún efecto. Por ejemplo, si se evalúa la letalidad o mortalidad sobre un organismo (bacteria, parásito, etc.), la concentración requerida para matar el 50% de los organismos se denomina concentración letal 50% (CL50) o concentración eficaz 50% (CE50%). Este último término también puede aplicarse a procesos donde se esperan respuestas positivas (reproducción, producción de alguna sustancia, etc.). Las CL50% o CE50% permiten comparar sustancias diferentes y decidir cuál es más eficaz para alcanzar el efecto deseado. También las CL50% permiten comparar las mismas sustancias en diferentes sustratos, aislados, poblaciones, organismos, etc. Para identificar una sustancia química benéfica de un determinado organismo, se espera que su efecto favorable se logre a una baja concentración y su efecto tóxico se observe a una concentración alta. Por otro lado, cuando se busca un efecto letal sobre un organismo blanco, también es deseable que el efecto deseado se logre a la concentración más baja posible.

¿Qué organismos usar en los bioensayos?

Una amplia gama de organismos “modelo” son utilizados en los bioensayos *in vitro*, que incluyen desde células o cultivos de células denominadas líneas celulares hasta organismos

más complejos como plantas de interés agrícola u otros organismos importantes por sus implicaciones en la nutrición, producción y la salud animal o la salud pública (Figura 1).

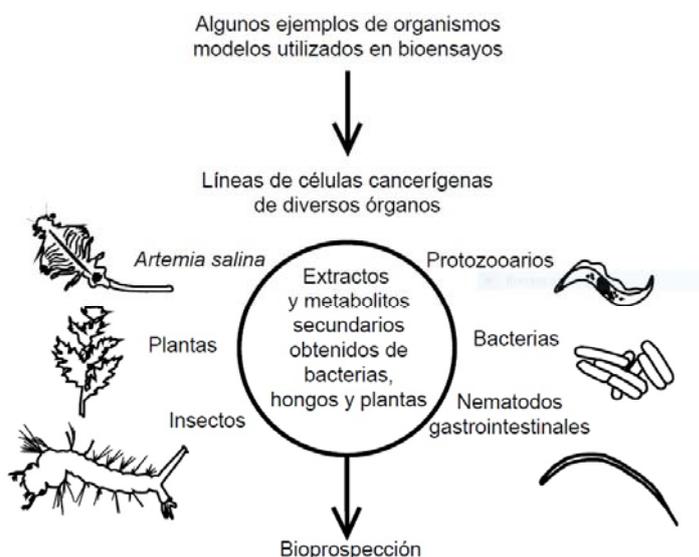


Figura 1. Organismos modelo utilizados para bioensayos de actividades biológicas como parte de la bioprospección de plantas, hongos y bacterias en la biomedicina y las ciencias agropecuarias.

Líneas celulares

Son células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación. Estos bioensayos cumplen varios propósitos, como son la producción de vacunas, la ingeniería de proteínas, estudios de interacción/señalización celular, producción para trasplantes y la reproducción “*in vitro*” de plantas de interés comercial o ensayos de nuevos medicamentos. En la búsqueda de cualquier actividad biológica se debe confirmar si los compuestos evaluados tienen un efecto tóxico sobre las células de plantas, animales o humanos (i.e., efecto citotóxico, apoptosis). En algunos casos, el efecto tóxico sobre las células constituye el elemento esencial como ocurre en los compuestos antitumorales que atacan células que crecen sin control. Un ejemplo de este tipo de bioensayos es la producción de Vincristina, que es un alcaloide de la planta vicaria (*Catharantus roseus* (L.) G. Don) empleado como quimioterapéutico contra tumores venéreos transmisibles en perros (van Zanden *et al.* 2005). Otro bioensayo de indicadores del metabolismo de células tumorales es el de la determinación de la enzima

lactato deshidrogenasa (Decker y Lohmann 1988). En ocasiones los bioensayos emplean métodos o sustancias que de manera indirecta permiten visualizar los efectos, ya sean benéficos o tóxicos, de las sustancias, como el caso de los bioensayos de rojo neutro, metil tetrazolio y sulforodamina B (Kaspers *et al.* 1994, Vichai y Kirtikara 2006, Repetto *et al.* 2008).

Bacterias y hongos

Varios microorganismos ocasionan enfermedades en plantas, animales o humanos. Tanto bacterias como hongos presentan una gran diversidad, por lo que también poseen una amplia variación en su capacidad de crecimiento, reproducción y en los tipos de enfermedades que ocasionan. Los bioensayos para microorganismos tienen múltiples propósitos. Según Balouiri *et al.* (2016) los bioensayos se usan para determinar: (a) el crecimiento con diversos microorganismos en agar (Figura 2F), (b) alguna respuesta fisiológica como la bioluminiscencia o el flujo citofluorométrico, y (c) la curva de mortalidad por densidad óptica. En condiciones ideales los bioensayos son la base para evaluar el efecto biológico sobre animales o plantas en los que será empleado el compuesto o producto. Por ejemplo, una vez que se demostró la actividad *in vitro* del extracto de la planta *Macleaya cordata* (que contiene alcaloides), éste fue dosificado a cerdos y mostró actividad contra cepas de bacterias de *Salmonella enterica* (Robbins *et al.* 2013). Posteriormente se usó en la prevención de la enfermedad producida por tales bacterias.

Protozoarios

Los bioensayos con protozoarios incluyen aquellos utilizados para la evaluación del ecosistema microbiano del rumen (uno de los cuatro compartimientos digestivos o estómagos de rumiantes como vacas, ovejas y cabras), por ejemplo, se ha evaluado el efecto de los metabolitos secundarios de las plantas sobre la actividad fermentativa de los protozoarios ruminales (Monforte-Briceño *et al.* 2005) y también existen bioensayos orientados a evaluar el impacto de diversos compuestos sobre protozoarios patógenos como *Trypanosoma* spp, *Babesia* spp, *Toxoplasma* spp y *Eimeria* spp (Croft y Weiss 1999).

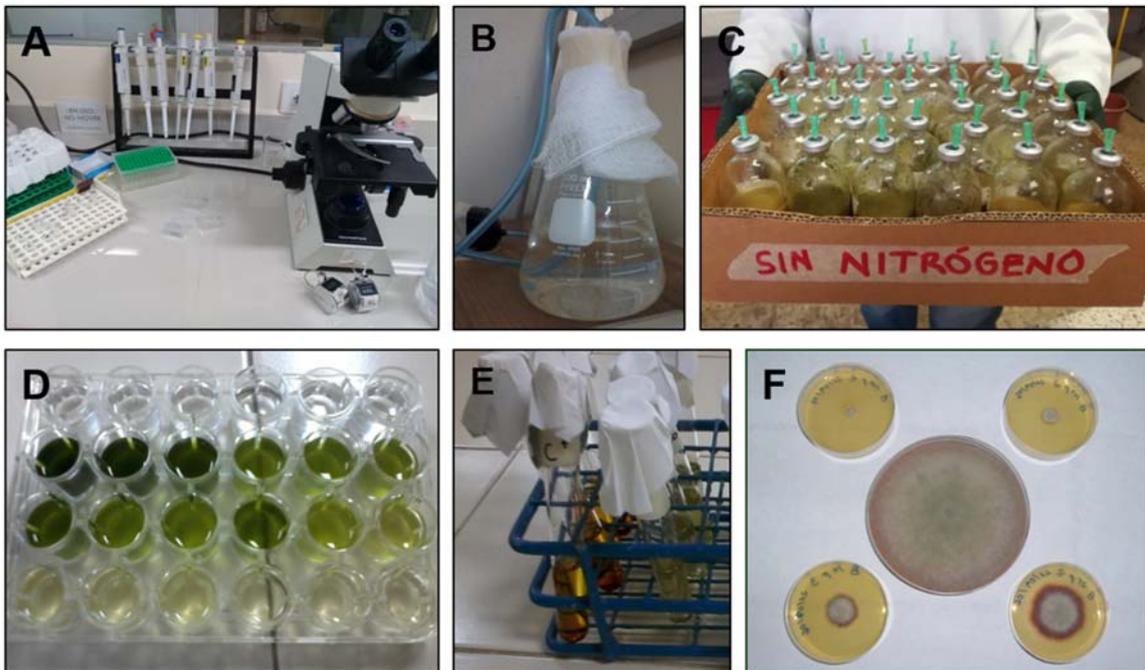


Figura 2. Ejemplos de bioensayos utilizando distintas concentraciones de extractos o compuestos contra: A y D) helmintos, B y E) *Artemia salina*, C) protozoarios, F) hongos.

Otros organismos de interés agropecuario, biomédico o de salud pública

Los nematodos gastrointestinales son parásitos que representan un problema a escala global en humanos, animales de compañía y de granja. En estos parásitos los bioensayos pueden usarse para evaluar la eficacia antihelmíntica de drogas convencionales y no convencionales como los extractos de plantas. Los bioensayos comúnmente se realizan con nematodos relevantes de humanos o animales. En estos parásitos el producto natural se evalúa sobre diferentes fases de desarrollo como huevos, larvas o adultos (Castañeda-Ramírez *et al.* 2018) (Figura 2 A y D).

Los insectos y ácaros también se usan como modelos ya que en muchos casos son transmisores de enfermedades y/o al mismo tiempo representan un problema para la producción agropecuaria y salud humana. Por ejemplo, las garrapatas *Rhipicephalus microplus* pueden ser vectores de enfermedades causadas por *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Anaplasma marginale*, entre otros. Estas garrapatas son utilizadas como modelo para detectar el efecto de diversos antiparasitarios convencionales o extractos de plantas a través

de la evaluación de la supervivencia y reproducción (Rosado-Aguilar *et al.* 2010). Otro modelo de relevancia mundial son los mosquitos (géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*) que son vectores de enfermedades como malaria, filariasis, chikungunya, dengue, fiebre amarilla, entre otras. Los bioensayos aplicados en mosquitos tienen la finalidad de inhibir su crecimiento o reproducción, así como repeler y disuadir la ovoposición (Sukumar *et al.* 1991).

También existen los bioensayos de toxicidad que usan larvas del crustáceo *Artemia* spp, esta prueba es muy utilizada por su bajo costo y su fácil implementación (Figura 2 B y E) y es una prueba estándar en ensayos preliminares de citotoxicidad de pesticidas, productos naturales marinos, agentes antitumorales, y extractos de plantas con actividad farmacológica. La pertinencia de este ensayo se refleja en una buena correlación entre la letalidad de extractos de plantas aplicados a *Artemia salina* (*in vitro*) y la dosis letal oral proporcionada a ratones (*in vivo*) (Piaru *et al.* 2012).

Plantas

Varias plantas pueden ser utilizadas como modelos para evaluar sustancias bioactivas con diversos tipos de actividad sobre otras plantas. Los estudios alelopáticos (Macías *et al.* 2001) permiten obtener nuevos inhibidores de crecimiento de organismos indeseables. Estos productos tendrían ventajas sobre los plaguicidas tradicionales por ser activos sobre diferentes sitios de acción de la planta, así como por la posibilidad de no dejar residuos en el ambiente o en los tejidos de otras plantas o animales.

Conclusiones

Los bioensayos son técnicas importantes para estudiar las interacciones entre sustancias y organismos. Permiten identificar los gradientes de concentración necesarios para observar algún efecto (actividad biológica) entre sustancia y organismo incluyendo la muerte de estos. Entre los organismos utilizados como modelos para los bioensayos se encuentran las líneas celulares, bacterias, hongos, protozoarios, nematodos gastrointestinales, insectos, ácaros, crustáceos y diversas plantas. La información obtenida de los bioensayos con estos organismos puede servir en la prospección de recursos naturales con diferentes objetivos científicos y tecnológicos. Estas técnicas serán cada día más relevantes para resolver problemas en los campos de la medicina y las ciencias agropecuarias.

Agradecimientos. Agradecemos al CONACYT por el financiamiento para la realización de los estudios de maestría del I.A. Raúl Ávila Cervantes en el PICAMRNT del CCBA perteneciente a la UADY.

^aFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. ^b Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Universidad Autónoma de Yucatán. * maria.mancilla@correo.uady.mx

Ávila-Cervantes RA, Mancilla-Montelongo G, González-Pech PG, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta FJ (2019). Bioensayos *in vitro* de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrociencias*. 12(1): 34-41.

Referencias

- Balouiri M, Sadiki M y Ibsouda SK. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 (2):71-79.
- Castañeda-Ramírez GS, Rodríguez-Labastida M, Ortiz-Ocampo GI, González-Pech PG, Ventura-Cordero J, Borges-Argáez R, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA y Mathieu C. 2018. An *in vitro* approach to evaluate the nutraceutical value of plant foliage against *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research* 117 (12):3979-3991.
- Croft SL y Weiss CR. 1999. Natural products with antiprotozoal activity. En: Bohlin L y Bruhn JG (eds.) *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. Springer. Dordrecht. 43:81-99.
- Decker T y Lohmann Matthes ML. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods* 115 (1):61-69.
- Gámez R y Más R. 2007. Reseña analítica de "Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados". *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 38 (3):204-208
- Kaspers GJL, Veerman AJP, Pietres R, Broekema GJ, Huisman DR, Kazemier KM, Loonen AH, Rottier MAA, Van Zantwijk CH, Hählen K y Van Wering ER. 1994. Mononuclear cells contaminating acute lymphoblastic leukaemic samples tested for cellular drug resistance using the methyl-thiazol-tetrazolium assay. *British Journal of Cancer* 70 (6):1047-1052.
- Langman LJ y Kapur BM. 2006. Toxicology: Then and now. *Clinical Biochemistry* 39 (5):498-510.
- Macías FA, Molinillo JM, Galindo JC, Varela RM, Simonet AM, y Castellano D. 2001. The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. *Journal of Crop Production* 4 (2):237-255.
- Monforte-Briceño GE, Sandoval-Castro CA, Ramírez-Avilés L y Capetillo Leal CM. 2005. Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. *Animal Feed Science and Technology* 123:313-327.

- Pérez OP y Lazo FJ. 2010. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal* 25 (1):34-43.
- Piaru SP, Mahmud R y Ismail S. 2012. Studies on the phytochemical properties and brine shrimp toxicity of essential oil extracted from *Myristica fragrans* Houtt. (Nutmeg). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 15 (1):53-57.
- Repetto G, del Peso A y Zurita JL. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols* 3 (7):1125-1131.
- Robbins RC, Artuso-Ponte VC, Moeser AJ, Morgan Morrow WE, Spears JW y Wondwossen AG. 2013. Effects of quaternary benzo(c)phenanthridine alkaloids on growth performance, shedding of organisms, and gastrointestinal tract integrity in pigs inoculated with multidrug-resistant *Salmonella* spp. *Animal Journal Veterinary* 74 (12): 1530-1535.
- Rosado-Aguilar JA, Aguilar-Caballero AJ, Rodríguez-Vivas RI, Borges-Argáez R, García-Vázquez Z y Méndez-González M. 2010. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12 (2):417-422.
- Sukumar K, Perich MJ y Boobar LR. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7 (2):210-237.
- van Zanden JJ, de Mul A, Wortelboer HM, Usta M, van Bladeren PJ, Rietjens IM, Cnubben NH. 2005. Reversal of *in vitro* cellular MRP1 and MRP2 mediated vincristine resistance by the flavonoid myricetin. *Biochemical Pharmacology* 69 (11):1657-1665.
- Vichai V y Kirtikara K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature protocols* 1 (3):1112-1116.