



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
OCEANOGRÁFICAS



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTICANCERÍGENO
DE EXTRACTOS NATURALES OBTENIDOS DESDE LA
MICROALGA ICTIOTÓXICA *KARLODINIUM*
VENEFICUM CULTIVADA BAJO CONDICIONES
CONTROLADAS EN FOTOBIORREACTORES**

GHISLAYNE ALEJANDRA RIVERA RÍOS

Seminario de Título presentado al

DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Para optar al Título de

BIÓLOGA MARINA

agosto de 2022

Concepción, Chile

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesora Guía:

Dra. Allisson Astuya Villalón
Área Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Ha sido aprobada
por la siguiente
Comisión Evaluadora:



Dr. Fernando Martínez Acuña
Área Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Juan José Gallardo Rodríguez
Área Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología Industrial
Facultad de Ciencias Experimentales
Universidad de Almería

Jefe de Carrera:

Dr. Ariel Valenzuela Saldías
Área Piscicultura y Patología Acuática
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.



“A todas esas personas que creen no ser suficientemente buenas, que su cuerpo o mente no les brinda un funcionamiento óptimo y que están a un paso de rendirse por las adversidades de la vida (y a mí yo del pasado) les dedico este manuscrito”



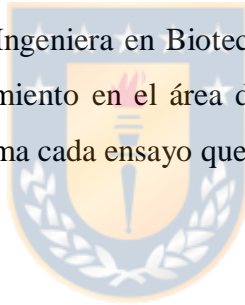
Agradecimientos

A mi tutora

Allisson Astuya Villalón, Doctora en Ciencias Biológicas. Gracias por sus orientaciones, por confiar en mí para llevar a cabo este desafío en el marco de su Proyecto FONDECYT, por su paciencia, comprensión, disposición y constancia. Sus consejos y conocimientos fueron siempre útiles a la hora de tomar decisiones en el marco de este trabajo, muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento en los momentos de frustración y desaliento.

A mi supervisora de laboratorio

Alejandra Rivera Latorre, Ingeniera en Biotecnología Marina y Acuicultura. Gracias por traspasarme cada conocimiento en el área de cultivo celular, sin ellos habría sido imposible realizar por mí misma cada ensayo que requirió el desarrollo de esta tesis.



A los docentes

De la Carrera de Biología Marina, Universidad de Concepción, durante el periodo 2015-2022. Agradezco a cada uno de los docentes que aportó en mi formación académica, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable y en algunos casos particulares por la confianza puesta sobre mí como estudiante fuera y dentro del aula.

Al centro de investigación

COPAS Coastal ANID FB210021A por el financiamiento para desarrollar esta investigación bajo el proyecto de investigación FONDECYT 1200845 “Role of allelochemical compounds in the ichthyotoxicity of bloom-forming microalgae”.

A mi familia

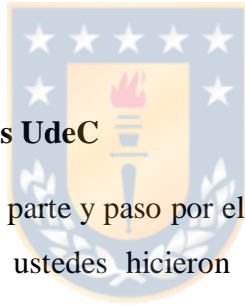
Principalmente a **Andrea Rivera Contreras**, mi madre, quiero destacar su esfuerzo por ser madre, padre y jefa de hogar, educarnos y cuidarnos. A **María Contreras Pérez**, mi abuela, por mimarme incondicionalmente. A **Ignacia Delgado Rivera**, mi hermana, por su autenticidad y alegría. Ustedes han sido mis cimientos y me siento orgullosa de tenerlas, gracias por amarme, escucharme, aconsejarme y creer en mí siempre.

A mis amigas, amigos y otros familiares más cercanos

Gracias por las horas de juegos y conversaciones. Han sido fundamentales durante este periodo tanto en el ámbito de distracciones como de contención y afecto, acciones que me alentaban y cobijaban para seguir en los momentos de cansancio.

Al Laboratorio de Biotoxinas UdeC

Gracias a cada persona que es parte y paso por el Laboratorio desde que llegue a él hasta el culmino de este desafío, ustedes hicieron que mis días trabajando se sintieran acogedores con su espíritu respetuoso, cálido y de confianza. Además de inspirarme con sus conocimientos.



Índices

Índice de Contenidos

Agradecimientos	V
Índices	VII
Índice de Contenidos	VII
Índice de Figuras	IX
Resumen	XIII
Abstract	XIV
Introducción.....	14
Cáncer	15
Etiología	15
Tratamientos	16
Factores de Riesgo y Prevención.....	17
Floraciones Algales Nocivas	18
Biotoxinas	18
<i>Karlodinium veneficum</i>	19
Karlotoxinas	21
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Metodología.....	23
Entorno de trabajo y materiales	23
Líneas celulares	23
Mantenimiento celular	23

Extractos Naturales de <i>Karlodinium veneficum</i>	24
Ensayo de Citotoxicidad.....	25
Evaluación de Apoptosis	26
Gráficos y Análisis Estadístico	28
Resultados	29
Resultados de la citotoxicidad durante la exposición de extractos obtenidos desde biomasa de <i>K. Veneficum</i> sobre las líneas celulares MCF7 y HCT116	29
Resultados de la citotoxicidad durante la exposición de extractos obtenidos desde sobrenadante de <i>K. Veneficum</i> sobre la línea celular MCF7	31
ApoTox Glo en MCF7 y Apoptosis	34
Resultados de la citotoxicidad durante la exposición de extractos obtenidos desde sobrenadante de <i>K. Veneficum</i> sobre la línea celular HCT116.....	37
ApoTox Glo en HCT116 y Apoptosis.....	40
Discusión.....	43
Conclusiones.....	46
ANEXOS.....	52



Índice de Figuras

FIGURA 1. Ilustración del Ciclo celular: Fase 1 (G1), Fase S (S), Fase 2 (G2) y Mitosis (M), con los respectivos Puntos de Control para la reparación de ADN.	16
FIGURA 2. Ilustración del crecimiento del cáncer a partir de una sola célula cancerígena.	16
FIGURA 3. Fotografías en microscopio electrónico invertido de <i>Karlotodium veneficum</i>	20
FIGURA 4. Estructura química de Karlotoxinas (KmTx).	21
FIGURA 5. Diseño de la placa para el ensayo de citotoxicidad mediante MTT	26
FIGURA 6. Diseño de la placa para Ensayo ApoTox-Glo™	28
FIGURA 7. Viabilidad Celular de las líneas cancerígenas MCFT7 y HCT116 expuestas por 24 horas al extracto de biomasa obtenido de <i>K. veneficum</i>	30
FIGURA 8. Determinación de citotoxicidad de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24, 48 y 72 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	32
FIGURA 9. Fotografía en microscopio invertido de la línea celular cancerígena MCF7, expuesta a distintas concentraciones de sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i> durante 24 horas. (A) Control solo con células en medio de cultivo DMEM suplementado, (B) Células expuestas a 160 µg/mL y (C) 300 µg/mL de sobrenadante.	33
FIGURA 10. Viabilidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	34
FIGURA 11. Citotoxicidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	35
FIGURA 12. Apoptosis celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	36
FIGURA 13. Determinación de citotoxicidad de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24,48 Y 72 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i> durante.....	38

FIGURA 14. Fotografía en microscopio invertido de línea celular cancerígena HCT116, expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. (A) Control solo con células en medio de cultivo DMEM suplementado, (B) Células expuestas a 120 µg/mL y (C) 400 µg/mL de sobrenadante. 39

FIGURA 15. Viabilidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. 40

FIGURA 16. Citotoxicidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. 41

FIGURA 17. Apoptosis celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. 42

Índice de Tablas



TABLA 1. Listado de la Familia de Karlotoxinas. 20

TABLA 2. Valores IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ para sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena MCF7 32

TABLA 3. Valores IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ para sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena HCT116..... 38

Índice de Anexos

ANEXO 1. Tabla de datos obtenido de la prueba estadística ANOVA de una vía, test de comparaciones múltiples Dunnett. Línea celular cancerígena MCF7 y HCT116 expuestas durante 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	52
ANEXO 2. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	53
ANEXO 3. Tabla de datos obtenido de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	53
ANEXO 4. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	54
ANEXO 5. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	54
ANEXO 6. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	55
ANEXO 7. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	55
ANEXO 8. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones. Comparación de la citotoxicidad producida por la exposición a 24, 48 y 72 horas del sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i> sobre la línea celular cancerígena MCF7.	56

ANEXO 9. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	58
ANEXO 10. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	58
ANEXO 11. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	59
ANEXO 12. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	59
ANEXO 13. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	60
ANEXO 14. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i>	60
ANEXO 15. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones. Comparación de la citotoxicidad producida por la exposición a 24, 48 y 72 horas del sobrenadante obtenido de <i>K. veneficum</i> sobre la línea celular cancerígena HCT116.	61

Resumen

Karlodinium veneficum es un dinoflagelado de distribución mundial que, en la actualidad, se asocia a la muerte masiva de peces durante las Floraciones Algales Nocivas (FAN), causando grandes pérdidas económicas. Precisamente, la diversidad de toxinas citotóxicas producidas por *K. veneficum* la convierte en una base prometedora para la biomedicina que puede proporcionar una fuente subexplotada de agentes anticancerígenos. En esta investigación se caracteriza el potencial anticancerígeno de extractos naturales provenientes de *K. veneficum* evaluando sus propiedades citotóxicas e inducción de apoptosis en las líneas celulares cancerígenas humanas MCF7 y HCT116. Para realizar este análisis, las líneas celulares fueron expuestas durante 24, 48 y 72 horas a dos extractos naturales obtenidos de *K. veneficum* y posteriormente se determinó la viabilidad, citotoxicidad y apoptosis. El estudio se realizó utilizando el ensayo MTT en complemento con el kit ApoTox-Glo, el que a través de los biomarcadores glicil-fenilalanil-aminofluorocumarina (GF-AFC), bis-alanilalanil-fenilalanil-rodamina 110 (bis-AAF-R110) y caspasa-3/7 permiten la determinación de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis celular respectivamente mediante fluorescencia y luminiscencia. Los resultados obtenidos confirman el efecto citotóxico de las karlotoxinas (KmTx) presentes en el sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116, teniendo un efecto tóxico constante en el tiempo en la línea celular HCT116, mientras que para la línea MCF7 el efecto tóxico es mayor al aumentar el tiempo de exposición. Los resultados además sugieren que el efecto citotóxico producido en la línea celular MCF7 ocurre mediante la activación de mecanismos de apoptosis temprana mientras que para la línea celular HCT116 se activa la muerte celular por necrosis, comportándose de manera selectiva las líneas celulares en contacto con el sobrenadante, se sugiere que esta diferencia de mecanismos citotóxicos está relacionada con las diferentes KmTxs presentes en el sobrenadante.

Abstract

Karlodinium veneficum is a globally distributed dinoflagellate that is currently associated with massive fish kills during Harmful Algal Blooms (HABs), causing great economic losses. Precisely, the diversity of cytotoxic toxins produced by *K. veneficum* makes it a promising basis for biomedicine that may provide an underexploited source of anticancer agents. In this research, we characterized the anticancer potential of natural extracts from *K. veneficum* by evaluating their cytotoxic properties and induction of apoptosis in human cancer cell lines MCF7 and HCT116. To perform this analysis, the cell lines were exposed for 24, 48 and 72 hours to two natural extracts obtained from *K. veneficum* and subsequently viability, cytotoxicity and apoptosis were determined. The study was performed using the MTT assay in complement with the ApoTox-Glo kit, which through the biomarkers glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin (GF-AFC), bis-alanylalanyl-phenylalanyl-rhodamine 110 (bis-AAF-R110) and caspase-3/7 allow the determination of cell viability, cytotoxicity and apoptosis respectively by fluorescence and luminescence. The results obtained confirm the cytotoxic effect of the karlotoxins (KmTx) present in the supernatant obtained from *K. veneficum* on the cancer cell lines MCF7 and HCT116, having a constant toxic effect over time in the HCT116 cell line, while for the MCF7 line the toxic effect is greater with increasing exposure time. The results also suggest that the cytotoxic effect produced in the MCF7 cell line occurs through the activation of early apoptosis mechanisms while for the HCT116 cell line it activates cell death by necrosis, behaving selectively cell lines in contact with the supernatant, it is suggested that this difference in cytotoxic mechanisms is related to the different KmTxs present in the supernatant.

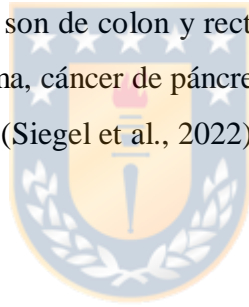
Introducción

En las últimas décadas ha habido un aparente aumento de las floraciones algales nocivas (FAN), causando múltiples inconvenientes económicos-sociales-ambientales que van desde pérdidas económicas en acuicultura y turismo, cambios en la coloración del agua, desplazamiento de especies autóctonas, agotamiento del oxígeno en los cuerpos de agua y principalmente liberación de toxinas, al medio, que provocan enfermedades o muerte de peces, aves marinas, mamíferos marinos, humanos, y otras formas de vida, como resultado del consumo directo, transferencia o bioacumulación de toxinas a través de la cadena alimentaria (Anderson, 2009). A raíz de lo anterior la presente investigación se desarrolla bajo el interés de buscar una utilidad en lo que percibimos de la naturaleza como dañino para la raza humana y así utilizarlo a nuestro beneficio.

Debido a que las biotoxinas se caracterizan por provocar algún tipo de efecto tóxico, casi siempre específico, podrían ser una excelente herramienta para atacar componentes celulares, lo que nos lleva a considerar uno de los grandes desafíos que hace años experimenta el área sanitaria dentro de las enfermedades celulares. En la actualidad el cáncer es un gran problema, dado que un alto número de pacientes ha desarrollado resistencia a los tratamientos disponibles o efectos secundarios agresivos. A esto se suma el aumento en los últimos años de la tasa de mortalidad originada por cáncer en países de ingresos bajos y medios. Asimismo, los países con ingresos altos lideran la tasa de incidencia de cáncer, lo que conlleva a que esta enfermedad no trasmisible en Chile se sitúe como la segunda causa de muerte e integre la “Lista de las 10 principales causas de defunción a nivel mundial” publicada por la Organización Mundial de la Salud (Ferlay et al., 2020; Ministerio de Salud Chile, 2018; Soletti et al., 2008; World Health Organization, 2021). Para comprender como las biotoxinas pueden incidir sobre células cancerígenas es necesario primero definir qué es el cáncer, sus características y tratamientos, así como también entender qué son las biotoxinas marinas, de dónde provienen y qué características poseen, por lo que dichos temas se abordarán a continuación.

Cáncer

El cáncer es un crecimiento excesivo de células somáticas anormales, consecuencia de una mutación genética y vulneración de los mecanismos básicos de regulación del sistema. En literatura se encontrarán asociados los términos neoplasia y/o tumor, por lo que es preciso enfatizar que no son sinónimos. Neoplasia es el término apropiado para aludir a cualquier crecimiento descontrolado de células o tejidos anormales en el organismo, y dicha condición puede ser de naturaleza benigna o maligna. Cuando la neoplasia no crece agresivamente, no invade tejidos corporales adyacentes y no se disemina en el organismo se está ante la presencia de un tumor benigno. Por el contrario, si estas condiciones no se cumplen se trata de un tumor maligno, denominado cáncer (Alberts et al., 2016). En función del órgano donde se origina el cáncer es el nombre que recibirá, a la fecha los tipos de cáncer más comunes son de colon y recto, de endometrio, de hígado, leucemia, linfoma no Hodgkin, melanoma, cáncer de páncreas, de próstata, de pulmón, de riñón, de mama, de tiroides y de vejiga (Siegel et al., 2022).



Etiología

Diariamente las células experimentan mutaciones genéticas, que no obligatoriamente serán perjudiciales, estas se van traspassando de una generación celular a otra en el proceso mitótico. Por lo general, el cuerpo corrige la mayoría de las mutaciones en los puntos de control del ciclo celular (Figura 1). Si una mutación pasa inadvertida por los puntos de control será necesario acumular varias mutaciones en varios genes para inducir neoplasia. Las causas de dichas mutaciones pueden ser: 1) mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales, es decir, cánceres de origen heredables, o 2) alteraciones genéticas producto de mutágenos ambientales, en otras palabras, cánceres adquiridos a lo largo de la vida producto de factores ambientales. Para que se desarrolle la patología del cáncer basta únicamente una célula cancerígena (Figura 2) con las siguientes características funcionales: inmortalidad replicativa, inestabilidad genómica, evasión de las señales de supresión del crecimiento, resistencia a la muerte celular, sostenimiento de la proliferación

continua, metabolismo alterado, evasión de la destrucción autoinmune e inflamación promovida por el tumor (Civetta & Civetta, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011).

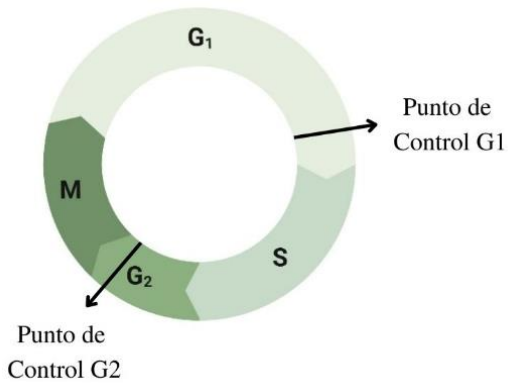


FIGURA 1. Ilustración del Ciclo celular: Fase 1 (G₁), Fase S (S), Fase 2 (G₂) y Mitosis (M), con los respectivos Puntos de Control para la reparación de ADN. Creado en BioRender.com.

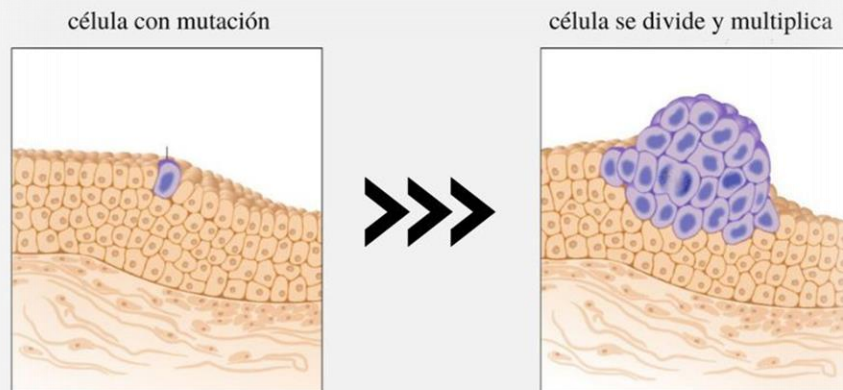


FIGURA 2. Ilustración del crecimiento del cáncer a partir de una sola célula cancerígena. Ilustración modificada de "Cáncer" [Ilustración], por National Human Genome Research Institute, 2022.

Tratamientos

Hay diversos tipos de tratamientos para este conjunto de enfermedades y la elección médica dependerá del tipo de cáncer, etapa en la que se encuentre, así como de la propiedad celular que se desea atacar. Las terapias utilizadas en medicina tradicional comprenden quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia dirigida, terapia fotodinámica, terapia de hipertermia, trasplante de células madre o una combinación de estos tratamientos. Además, pueden complementarse con pruebas de biomarcadores para recabar más información sobre el tipo de cáncer que padece el paciente y elegir un tratamiento más eficiente (Baskar et al., 2012). Dependiendo de las modificaciones genéticas del cáncer un mismo tipo de cáncer puede tener características específicas, por lo que la eficacia del tratamiento es un escenario multifactorial (Gracia-Cazaña et al., 2016; Perona & Sánchez-Pérez, 2007). Dentro de los efectos secundarios agresivos están las alteraciones anatómicas por cirugía, alopecia por el tratamiento quimioterápico, radiodermatitis por el tratamiento radiante, entre otros, incluso la quimioterapia algunas veces causa un segundo cáncer que puede manifestarse años después. Cabe destacar que no todos los pacientes desarrollan los mismos efectos secundarios (National Cancer Institute, n.d.; Soletti et al., 2008; Wong et al., 2013).

Factores de Riesgo y Prevención

Las investigaciones epidemiológicas han identificado como factores de riesgo, poseer antecedentes familiares. A medida que aumenta la edad también aumenta el riesgo de desarrollar cáncer, el consumo de tabaco, alcohol, el tipo de dieta, obesidad, exposición a sustancias cancerígenas o radiación igualmente son factores de riesgo, sin embargo, todos, a excepción de los dos primeros, pueden modificarse cambiando el estilo de vida. Un ejemplo de la incidencia de los factores ambientales se percibe en el estudio reciente de la Organización Mundial de la Salud, el cual identificó que el 4% de los diagnósticos de cáncer a nivel mundial en 2020 están asociados al consumo excesivo de alcohol (National Cancer Institute, 2021).

Floraciones Algales Nocivas

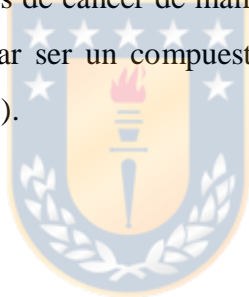
Las FAN, conocidas dentro de la sociedad como mareas rojas, son proliferaciones de microalgas en ambientes acuáticos y corresponden a fenómenos naturales. Cabe destacar que el concepto “marea roja” es un concepto erróneo en vista de que no es un tipo de marea si no una masa de agua característica que se mueve en virtud de la marea, asimismo el color rojo que suelen tener las FAN puede variar a tonalidades amarillas, verdes, marrón, azules o incoloras según las especies y sus pigmentos, concentración de biomasa y profundidad del evento (Carrasco P., 2015).

Uno de los primeros registros datados de este fenómeno se remonta al año 731 en expedientes japoneses, por lo que correspondería a un fenómeno recurrente (Okaichi, 2004). Sin embargo, en las últimas tres décadas debido a esfuerzos invertidos en monitoreos es que se tiene registro y una percepción de un mayor número de eventos FAN a nivel mundial, aunque se ha podido encontrar evidencia sustancial de que la intensificación de la industria acuícola está relacionada con el número de eventos FAN registrados en áreas cercanas a donde estas se asientan debido a las altas concentraciones de nutrientes que producen (Hallegraeff et al., 2021).

Biotoxinas

Una biotoxina es un metabolito secundario producido por un organismo que provoca daño sobre otro ser vivo. Aun cuando las biotoxinas se han caracterizado por tener un efecto negativo en el ecosistema, hace milenios se utilizan en medicina natural y hace años se estudian biotoxinas con potencial bioactivo para su aplicación en medicina convencional. Aunque la mayoría de los desarrollos biotecnológicos con aplicaciones terapéuticas tienen su origen en organismos terrestres también existen, en menor cantidad, biotoxinas de origen marino. A modo de ejemplo se tiene la trabectedina (extraída de ascidia), citarabina y eribulinamesilato (ambas extraídas desde esponjas marinas) utilizados en el tratamiento para el cáncer (Cabang et al., 2017; Lloret et al., 2016).

Las biotoxinas marinas producidas por microalgas o ficotoxinas no han sido empleadas en farmacología, sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de investigaciones científicas que las utilizan para evaluar potencial citotóxico y anticancerígeno en líneas tumorales humanas, así como otras patologías, lo que ha llevado a que algunas ficotoxinas se encuentren en etapas preclínicas y clínicas de desarrollo (Pradhan & Ki, 2022). Entre organismos marinos que resaltan Waters et al. (2010) con potencial prometedor en la industria farmacológica se encuentra la microalga ictiotóxica *Karlodinium veneficum*, esto en vista de los resultados publicados por Place et al. (2009). En este estudio se detectó que los organismos con esteroides, principalmente esteroides dimetil, resultaban ser más sensibles a la toxicidad producida por *K. veneficum*. En consecuencia, fue postulado que el colesterol, al ser el esteroide más común presente en células animales, destacando las altas concentraciones de este compuesto en las balsas lipídicas de las líneas celulares de cáncer de mamá y próstata a diferencias de sus líneas celulares sanas, podría resultar ser un compuesto altamente citotóxico en estas líneas tumorales (Walters et al, 2010).



Karlodinium veneficum

K. veneficum (D.Ballantine) J.Larsen 2000, en literatura puede encontrarse con el sinónimo homotípico *Gymnodinium veneficum* D.Ballantine 1956, o los sinónimos heterotípicos *Gymnodinium galatheanum* Braarud 1957, *Woloszynskia micra* B.Leadbeater & J.D.Dodge 1966, *Gymnodinium micrum* (B.Leadbeater & J.D.Dodge) Loeblich III 1970, *Gyrodinium galatheanum* (Baarud) Taylor 1992 y *Karlodinium micrum* (B.Leadbeater & J.D.Dodge) J.Larsen 2000 (Guiry & Guiry, 2019).

Esta especie es un dinoflagelado atecado de distribución mundial que tiende a localizarse en zonas costeras. Mide entre 8 a 12 μm (Figura 3) y presenta una alimentación mixotrófica. Frecuentemente presenta una abundancia poblacional relativamente baja en las FAN (10^2 – 10^3 cel·mL⁻¹), pero posee la capacidad de generar floraciones intensas duplicando su biomasa a 10^4 – 10^5 cel·mL⁻¹, causando la mortandad masiva de peces (Place et al., 2012; Wang et al., 2020). *K. veneficum* produce una amplia familia de biotoxinas

denominadas Karlotoxinas (KmTx) (Tabla 1) las que cumplen roles de defensa ante el pastoreo y actúan como mecanismo para la depredación (Cai et al., 2016; Krock et al., 2017; Peng et al., 2010; Sheng et al., 2010; van Wagoner et al., 2008, 2010). Además, se han caracterizado tanto en laboratorio como *in situ*, con propiedades hemolíticas, ictiotóxicas, citotóxicas y antifúngicas (Place et al., 2012; Pradhan & Ki, 2022).

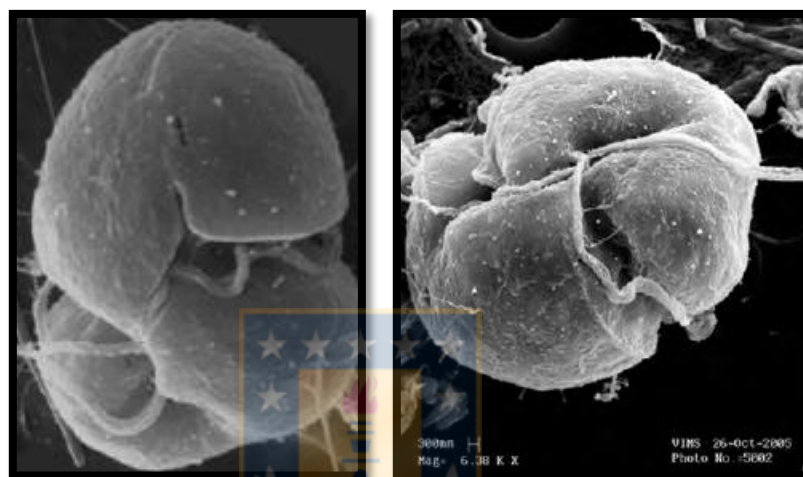


FIGURA 3. Fotografías en microscopio electrónico invertido de *Karlodinium veneficum*. Fotografías originales del trabajo publicado por Place et al. (2012).

TABLA 1. Listado de la Familia de Karlotoxinas.

1. KmTx-1	11. 65-E-chloro-KmTx-1
2. KmTx-2	12. 10-0-sulfo-KmTx-1
3. KmTx-2-1	13. 64-E-chloro-KmTx-3
4. KmTx-2-2	14. 10-0-sulfo-KmTx-3
5. KmTx-3	15. 4,5-dihydro-KmTx-2
6. KmTx-8	16. 4,5-dihydro-dechloro-KmTx-2
7. KmTx-9	17. sulfo KmTx-10
8. 44-oxo-KmTx-2	18. KmTx-10
9. KmTx-5	19. KmTx-12
10. KmTx-13	20. KmTx-11

Karlotoxinas

Las KmTx son toxinas de policétido lineal producidas exclusivamente por el género *Karlodinium*. A la fecha se han caracterizado completamente siete análogos. Para el resto las estructuras químicas se han definido de forma tentativa o incompleta (Cai et al., 2016; Krock et al., 2017; Peng et al., 2010; Sheng et al., 2010; Van Wagoner et al., 2008, 2010). Todos los congéneres de KmTx descritos presentan moléculas con forma similar a una horquilla y se pueden distinguir tres regiones en su estructura química: brazo de polioliol que exhibe hidroxilación y metilación, una región con dos anillos de éter, y un brazo lipofílico que contiene un dieno terminal que les da a estos compuestos su espectro UV distintivo (Figura 4) (Van Wagoner et al., 2010).

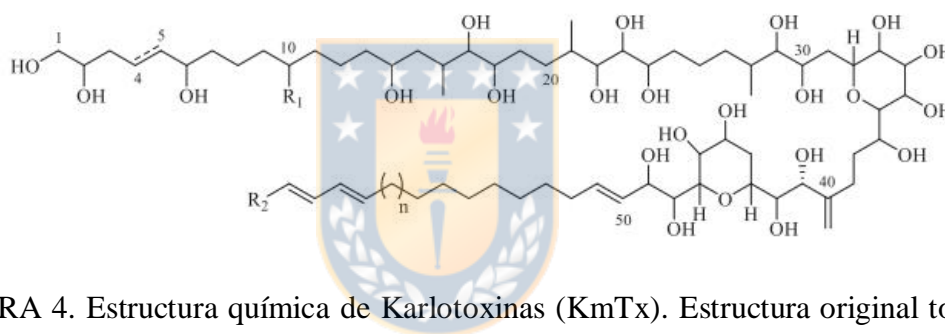


FIGURA 4. Estructura química de Karlotoxinas (KmTx). Estructura original tomada de Cousseau et al. (2020).

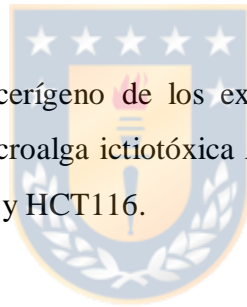
Compilando la información recabada de ensayos citotóxicos con KmTx, se ha encontrado efecto citotóxico de KmTx2 en larvas de peces producto de daño en la membrana plasmática induciendo necrosis (Deeds et al., 2006; Deeds & Place, 2006). A pesar de ello, en estudios previos a esta investigación realizados en el Laboratorio de Biotoxinas de la Universidad de Concepción, se observó que el sobrenadante obtenido de *K. veneficum*, a concentraciones subletales, inducía apoptosis en células de pez cebra (Alvarez M., 2018). Por otra parte, los congéneres 4,5-dihidro-KmTx 2 y 4,5-dihidro-decloro-KmTx muestran efectos citotóxicos en la línea celular cancerígena monocítica de leucemia, THP-1, destacando los autores que ambas toxinas resultan ser casi 2 veces más potentes que KmTx2 (Cai et al., 2016).

Hipótesis

“Los extractos obtenidos de los exudados provenientes de *Karlodinium veneficum* presentan mayor actividad citotóxicas respecto a los extractos provenientes de la biomasa microalgal. Por otra parte, la exposición de concentraciones subletales de los extractos obtenidos desde los exudados induce la apoptosis en las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116”

Objetivo General

Evaluar el potencial anticancerígeno de los extractos obtenidos desde la biomasa y exudados, derivados de la microalga ictiotóxica *Karlodinium veneficum* sobre las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116.



Objetivos Específicos

- 1.- Evaluar la citotoxicidad de los extractos (biomasa y exudados) derivados de las microalgas ictiotóxicas *Karlodinium veneficum* sobre las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116 a diferentes tiempos de exposición.
- 2.- Determinar los valores IC₅₀ de los extractos de compuestos exudados producidos por *Karlodinium veneficum* sobre las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116.
- 3.- Evaluar la inducción de apoptosis en las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116 al ser expuestas a concentraciones subletales de los extractos derivados de las microalgas ictiotóxicas *Karlodinium veneficum*.

Metodología

Los ensayos realizados para ejecutar cada objetivo específico se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotoxinas en la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Entorno de trabajo y materiales

Con el propósito de mantener los cultivos celulares libres de contaminación se siguió un estricto protocolo de limpieza y esterilización antes, durante y después del trabajo desarrollado diariamente. Se utilizó material estéril y se usaron elementos de protección personal como mascarilla, guantes y delantal en cada procedimiento. Recomendaciones y protocolos de bioseguridad que se detallan en Freshney R. (2005).



Líneas celulares

En este estudio se utilizaron las líneas celulares MCF7 proveniente de adenocarcinoma mamario humano (ATCC® HTB-22™) y HCT116 de carcinoma colorectal humano (ATCC® CCL-247™) adquiridas desde American Type Culture Collection (ATCC). Ambas líneas celulares se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Gibco, suplementado al 10% con Suero Bovino Fetal, 2mM L-Glutamina y 100 UI/mL Penicilina-Estreptomicina. Además, las líneas celulares fueron descongeladas y traspasadas mínimo 3 veces antes de ser empleadas para la estandarización de protocolos y ensayos.

Mantenimiento celular

Cada procedimiento del mantenimiento celular, preparación de medios de cultivos, preparación de suplementos, ensayos de citotoxicidad y evaluación apoptótica se desarrollaron en un Gabinete de Seguridad Biológica Clase II Tipo A2, modelo JSCB-

1200SB (JSR). Para el crecimiento de las líneas celulares estas se incubaron en matraces con filtro Nunc™ EasYFlask™ para cultivo celular, en el equipo Series 8000 Water-Jacketed Incubadora CO₂ (Thermo Scientific™), con atmósfera de 95% aire y 5% CO₂, a una temperatura constante de 37°C.

Extractos Naturales de *Karlodinium veneficum*

Los extractos de *Karlodinium veneficum* utilizados en este estudio fueron producidos en el Laboratorio de Bioprocesos Microalgales del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería y facilitados al Laboratorio de Biotoxinas de la Universidad de Concepción. Estos se obtuvieron a partir de inóculos de *K. veneficum* cultivados a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ en un régimen de luz-oscuridad de 12:12 horas. Los cultivos se mantuvieron en medio L1 preparado en agua de mar, previamente esterilizado por filtración (filtro Millipore de 0,22 μm , Millipore Corporation, Billerica MA, EE. UU) y autoclave. Para el cultivo se usó un fotobiorreactor de columna de burbujas de 3,9 mm de espesor (metacrilato de metilo), con un diámetro de 8,7 cm y altura del líquido sin burbujeo (H) de 175 cm. Se inoculó con células en fase estacionaria a una concentración inicial de 245.666 células/ml, y se mantuvieron iluminados con lámparas fluorescentes de 58W, con una irradiancia promedio de 200 $\mu\text{Es}\cdot\text{m}^{-2}$. El cultivo se cosechó en fase estacionaria mediante centrifugación. El proceso de extracción desde biomasa y sobrenadante se realizó con metanol (MeOH) al 100%. Los extractos en metanol se secaron bajo corriente de N₂, una vez evaporado el MeOH se obtuvieron muestras secas y homogéneas en polvo.

Los extractos denominados “biomasa” corresponden a biomasa microalgal y “sobrenadante” corresponde a compuestos exudados al medio de cultivo, de estas muestras secas y homogéneas en polvo se masaron 0,0160 g y resuspendieron en medio de cultivo DMEM suplementado y sonicados durante 10 minutos. La resuspensión de los extractos fue preparada 1 hora antes de cada ensayo.

Ensayo de Citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad en las líneas cancerígenas MCF7 y HCT116. Para esto se sembraron 3 placas de 96 pocillos por cada línea celular a una densidad de 10^4 cel/pocillo, $7.5 \cdot 10^3$ cel/pocillo y $5 \cdot 10^3$ cel/pocillo, para asegurar la homogeneidad del sembrado por pocillo se homogeneizó mediante agitación orbital a 70 rpm durante 3 minutos, posteriormente las placas se incubaron por 18 horas a 37°C con inyección de CO_2 al 5%. Las células se recolectaron para sembrar cuando la confluencia alcanzó un 80-90 %.

La biomasa se expuso para la línea celular cancerígena MCF7 a 3.90625, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Por otra parte, la línea celular cancerígena HCT116 se expuso a concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 $\mu\text{g/mL}$. Ambas líneas celulares se incubaron por 24 horas a 37°C con inyección de CO_2 al 5%. Cada concentración de biomasa utilizada se configuro por triplicado, al igual su control con células sin tratamiento. Este ensayo celular solo se realizó una vez.

El sobrenadante se expuso en 9 concentraciones: 50, 100, 130, 160, 180, 200, 250, 300 y 400 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular MCF7. Mientras que para la línea celular HCT116 las concentraciones evaluadas fueron 50, 75, 100, 120, 130, 140, 160, 180, 200, 250, 300 y 400 $\mu\text{g/mL}$. Ambas líneas celulares se expusieron por 24, 48 y 72 horas, en incubadora a 37°C con inyección de CO_2 al 5%. Cada concentración de sobrenadante utilizada, así como el grupo control, se configuraron por sextuplicado (Figura 5) y el ensayo fue realizado dos veces.

Para determinar la citotoxicidad se utilizó el ensayo de viabilidad celular MTT. Transcurrido el tiempo respectivo en cada periodo de exposición, se descartó el contenido de la placa y en cada pocillo se adicionaron 70 μL de MTT diluido 1:3 en medio de cultivo DMEM suplementado, se incubó a 37°C con inyección de CO_2 al 5% por 20 y 25 minutos para la línea celular HCT116 y MCF7 respectivamente, con el objetivo de obtener lecturas de absorbancia entre los 200-800 UA. Luego se eliminó el contenido y se adicionaron 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) por pocillo. Una vez añadido el DMSO se mezcló mediante agitación orbital a 70 rpm durante 5 minutos, y se procedió a leer la absorbancia a 570 nm en el equipo Synergy H1 lector multimodal (BioTek).

El ensayo MTT es ampliamente utilizado en estudios de citotoxicidad debido a su precisión y rapidez. Es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, proceso realizado en la mitocondria de células metabólicamente viables, transformando el MTT de color amarillo a un compuesto insoluble de color azul (formazán), compuesto que puede ser solubilizado al contacto con DMSO (Denizot & Lang, 1986), cuantificando de este modo a través de la absorbancia a 570 nm la cantidad de MTT reducido, infiriendo de esta manera citotoxicidad a través de viabilidad celular debido a su relación inversamente proporcional.

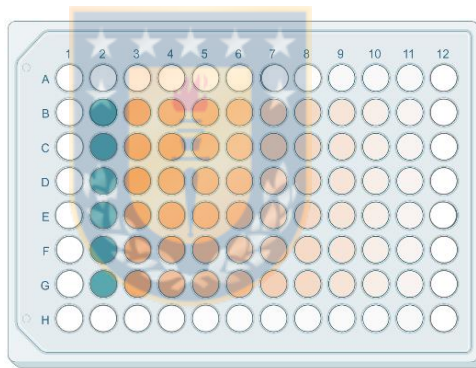
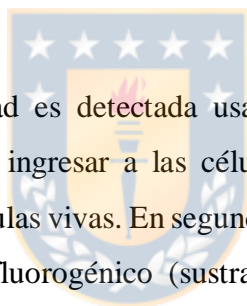


FIGURA 5. Diseño de la placa para el ensayo de citotoxicidad mediante MTT. La placa presenta la configuración: B2-G2 control de células solo con medio de cultivo DMEM suplementado, y de B3-G11 diferentes concentraciones utilizadas del sobrenadante por sextuplicado.

Evaluación de Apoptosis

El mecanismo involucrado en la muerte celular fue evaluada utilizando el Kit de Triple Ensayo ApoTox-Glo™ (Promega), el que combina la evaluación de viabilidad, citotoxicidad y apoptosis celular en un ensayo único. Previamente a la utilización del Kit

de Triple Ensayo ApoTox-Glo™ (Promega), se sembró una placa de 96 pocillos para las líneas cancerígenas MCF7 y HCT116 a una densidad de 10^4 cel/pocillo. Se incubó por 18 horas a 37°C con 5% inyección de CO_2 , y posteriormente se expuso a los valores IC_{25} , IC_{50} , IC_{70} obtenidos del Ensayo de Citotoxicidad mediante MTT a las 24 horas, incluyendo un control de células no tratadas (Control B) que contenía únicamente células en medio de cultivo DMEM suplementado. Dentro del diseño experimental se incorporó un control positivo para apoptosis usando Camptotecina 28,7 mM diluida en DMSO, utilizando su valor $\text{IC}_{50} = 10 \text{ uM}$ determinado para MCF7 (Cordero Silva, 2015), con su respectivo control de células no tratadas, que contenía medio de cultivo DMEM suplementado, más 0.1% de DMSO (Control A), compuesto y concentración en la que estaba diluida la Camptotecina. Todos los controles y tratamientos fueron expuestos por un periodo de 24 horas y se configuraron por cuadruplicado (Figura 6).



En primer lugar, la viabilidad es detectada usando un sustrato péptido fluorogénico (sustrato GF-AFC) capaz de ingresar a las células, generando una señal fluorescente proporcional al número de células vivas. En segundo lugar, la citotoxicidad es cuantificada con un sustrato de péptido fluorogénico (sustrato bis-AAF-R110) impermeable a las células, y que genera una señal fluorescente al entrar en contacto con proteasas liberadas al medio por células muertas que han perdido la integridad de la membrana celular. Finalmente se evalúa si la muerte celular es mediada por apoptosis, lo que es evaluado con el reactivo que contiene sustrato luminogénico DEVD-péptido capaz de detectar caspasa-3/7, señal que es revelada con una Luciferasa Termoestable Recombinante Ultra-Glo™. Brevemente, al entrar en contacto el sustrato luminogénico DEVD-péptido con las caspasa-3/7 involucradas en los cambios bioquímicos de células apoptóticas, la caspasa-3/7 se fragmenta liberando luciferina, que es el sustrato detectado por la luciferasa, generando luz de manera proporcional a la aparición de este marcador apoptótico.

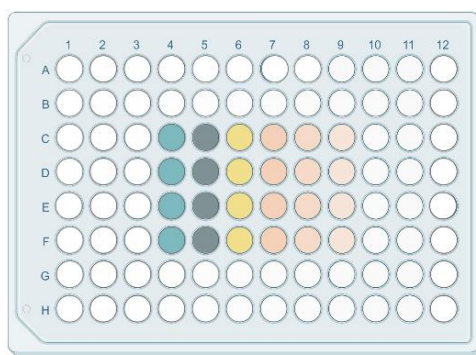


FIGURA 6. Diseño de la placa para Ensayo ApoTox-Glo™. La placa presenta la configuración: C4-D4 Control A, C5-D5 Camptotecina IC₅₀, C6-D6 Control B, C7-D7 sobrenadante IC₂₅, C8-D8 Sobrenadante IC₅₀ y C9-D9 sobrenadante IC₇₅.

Gráficos y Análisis Estadístico

Los datos del ensayo de citotoxicidad y evaluación de apoptosis fueron analizados mediante el software estadístico Graphpad Prism (versión 8). Programa donde se realizaron todos los gráficos de la sección de resultados, gráficos de la sección anexos y análisis estadísticos.

Los valores IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ se obtuvieron mediante análisis de curva dosis-respuesta de cuatro parámetros ($Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))})$). El análisis estadístico para evaluar el ensayo expuesto a biomasa se le aplicó la prueba paramétrica ANOVA de una vía, test de múltiples comparaciones Dunnet, mientras que para las comparaciones de las réplicas de un mismo periodo de exposición de Sobrenadante se utilizó la prueba no paramétrica Test t Student. Además, el análisis estadístico para comparar los ensayos a diferentes periodos de exposición se sometió a la prueba paramétrica ANOVA de dos vías, test de múltiples comparaciones Tukey.

Dado que las réplicas no presentaban diferencias significativas, no son abarcados en la sección de Resultados. Estos gráficos junto a los detalles de cada prueba estadística aplicada se pueden consultar en la sección Anexos.

Resultados

Resultados de la citotoxicidad durante la exposición de extractos obtenidos desde biomasa de *K. Veneficum* sobre las líneas celulares MCF7 y HCT116

De los datos obtenidos en la evaluación de la citotoxicidad de los extractos obtenidos desde la biomasa microalgal para la línea celular MCF7, se observa para el grupo control y los diferentes tratamientos de biomasa, una alta desviación estándar, es decir los datos obtenidos se encuentran en un amplio rango de valores, encontrándose en promedio sobre el 100% de viabilidad celular. Para la línea celular HCT116, a diferencia de los datos obtenidos para la línea celular MCF7, las desviaciones estándar del grupo control y los diferentes tratamientos del Extracto derivados de biomasa son menos dispersas y cercanas al 100% de viabilidad celular. Al comparar en cada línea celular los tratamientos frente al grupo control en un análisis estadístico ANOVA de una vía, el Valor P para MCF7 es $P = 0.5971$, mientras que para la línea celular HCT116 tiene un Valor $P = 0.0654$, ambos Valores P son superiores 0.05 por tanto no existen diferencias significativas entre los grupos. De acuerdo con esto, no se observa inducción significativa de citotoxicidad de las células expuestas a diferentes dosis del Extracto de biomasa frente a sus respectivos grupos controles, sugiriendo que no existe efecto citotóxico de la biomasa obtenida de *K. veneficum* sobre las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116 (Figura 7).

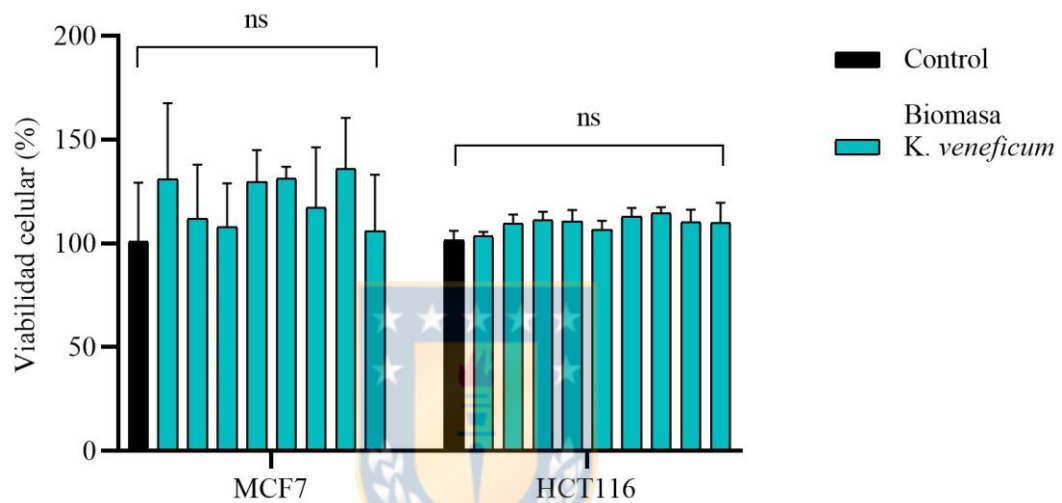


FIGURA 7. Viabilidad Celular de las líneas cancerígenas MCF7 y HCT116 expuestas por 24 horas al extracto de biomasa obtenido de *K. veneficum*. Línea celular MCF7 fue expuestas a concentraciones de 3.90625, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 µg/mL. Línea celular HCT116 fue expuesta a concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 µg/mL. Concentraciones dispuestas de menor (izquierda) a mayor (derecha) en el gráfico.

Resultados de la citotoxicidad durante la exposición de extractos obtenidos desde sobrenadante de *K. Veneficum* sobre la línea celular MCF7

Las curvas dosis-respuesta (Figura 8) obtenidas al exponer la línea celular a concentraciones crecientes de sobrenadante de *K. veneficum* presentan un aumento significativo de la citotoxicidad, que es dependiente del tiempo de exposición. Por otro lado, la tendencia de las curvas a medida que aumenta la concentración del sobrenadante gradualmente comienza a disminuir la viabilidad celular en todos los periodos de exposición (24, 48 y 72 horas). A las 24 horas de exposición la concentración mínima evaluada, 50 µg/mL, no exhibe citotoxicidad, sin embargo, para los periodos de 48 y 72 horas la viabilidad celular desciende a un 80%. A los 300 µg/mL de sobrenadante la viabilidad celular tiende a ser nula en las 48 y 72 horas, en cambio, para las 24 horas aún se evidencia una viabilidad celular cercana a 15%.

Al someter la curva dosis-respuesta de los diferentes periodos de exposición a un análisis estadístico ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones, se obtienen valores P inferiores a $P=0.01$ para las comparaciones de los extremos máximo y mínimo de las concentraciones evaluadas, existiendo diferencias significativas en el desplazamiento de la pendiente de las 48-72 horas frente a las 24 horas de exposición, los valores P obtenidos fueron <0.05 . Los valores letales y subletales determinados desde este ensayo para aplicar el ensayo ApoTox Glo con 24 horas de exposición al sobrenadante, corresponden a $IC_{25} = 141.8 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50} = 171.8 \mu\text{g/mL}$; e $IC_{75} = 171.8 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 2).

En las imágenes de la Figura 9, se pueden observar como las células MCF7 expuestas a diferentes concentraciones de sobrenadante van cambiando morfológicamente. En la Figura 9A se observan las células del grupo control 100% confluentes. En la Figura 9B, las células expuestas a 160 µg/mL de sobrenadante, se observa una menor confluencia celular que en el grupo control (Figura 9A). Una particularidad observada de las células expuestas a 160 µg/mL es la presencia de células aisladas, sin definición del núcleo y con proyecciones (Flechas rojas). Mismas proyecciones detectadas a concentraciones de 300 µg/mL (Figura 9C), sin embargo, a esta concentración ya no se observan células confluentes y el tamaño celular ha disminuido notablemente.

TABLA 2. Valores IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ para sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena MCF7

Concentración Inhibidora	24 horas	48 horas	72 horas
IC ₂₅	141.8 µg/mL	112.7 µg/mL	75.2 µg/mL
IC ₅₀	171.8 µg/mL	145.4 µg/mL	109.2 µg/mL
IC ₇₅	208.2 µg/mL	187.5 µg/mL	158.5 µg/mL

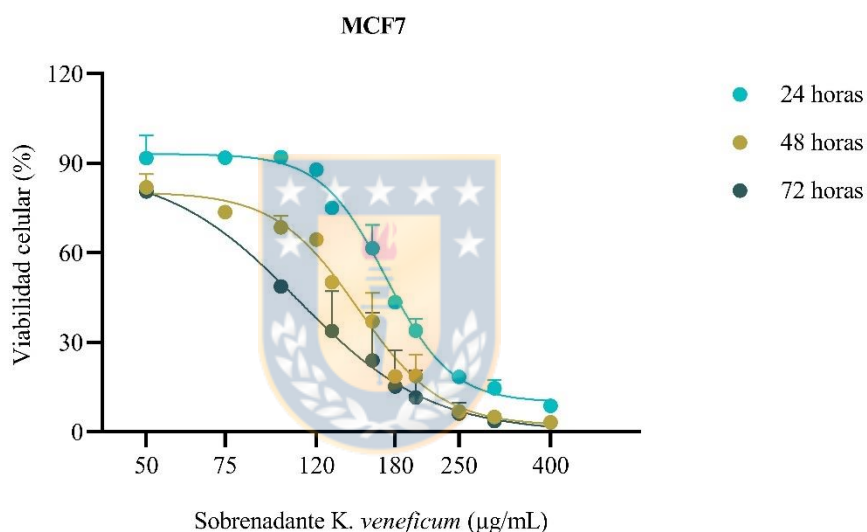


FIGURA 8. Determinación de citotoxicidad de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24, 48 y 72 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. Prueba estadística ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones. Valores P= <0.05 entre los rangos 100 µg/mL – 180 µg/mL para las 48 y 72 horas en contraste con las 24 horas.

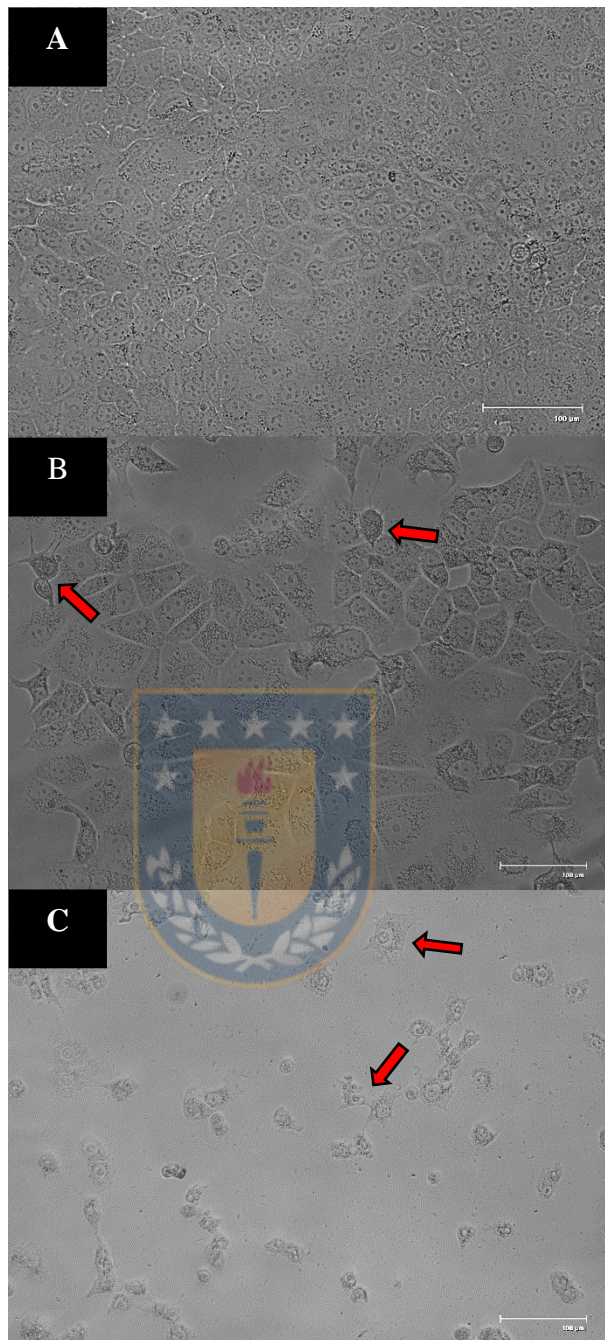


FIGURA 9. Fotografía en microscopio invertido de la línea celular cancerígena MCF7, expuesta a distintas concentraciones de sobrenadante obtenido de *K. veneficum* durante 24 horas. (A) Control solo con células en medio de cultivo DMEM suplementado, (B) Células expuestas a 160 µg/mL y (C) 300 µg/mL de sobrenadante.

ApoTox Glo en MCF7 y Apoptosis

Ensayo de viabilidad celular: En el ensayo de viabilidad celular con sobrenadante de *K. veneficum* (Figura 10), mediante el uso de ApoTox Glo, se obtuvieron lecturas de fluorescencia para el grupo Control A (Camptotecina) en los ~40000 RFU, mientras que para el tratamiento con Camptotecina los valores descienden a ~20000 RFU. Para el control de sobrenadante, Control B, las lecturas de fluorescencia rondan los ~30000 RFU, valores que descienden a ~10000 RFU para el IC₂₅ y llegan cercanos a 0 RFU para IC₅₀ e IC₇₅. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA de una vía entre ambos grupos frente a sus controles respectivos existen diferencias significativas, representadas con Valores $P < 0.0001$.

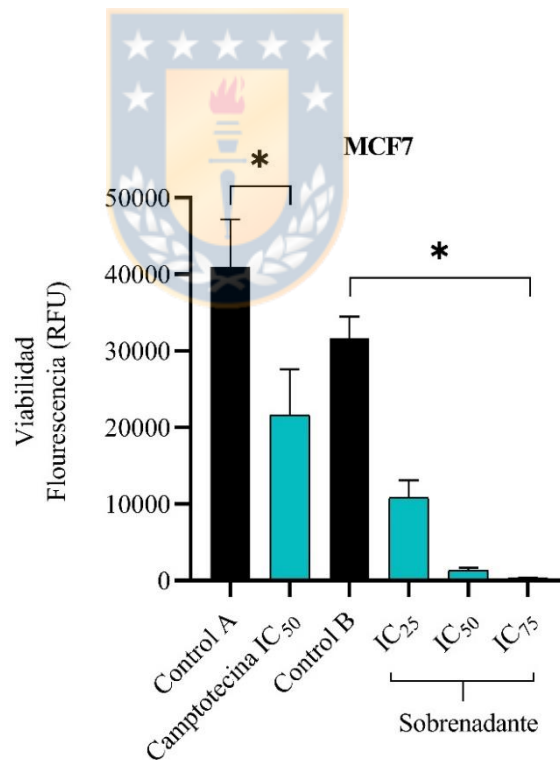


FIGURA 10. Viabilidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Ensayo de citotoxicidad celular: La citotoxicidad evaluada mediante Fluorescencia (Figura 11), para el grupo control de Camptotecina, Control A, se observa cercano a los 10000 RFU, mientras que para Camptotecina los valores están cercanos a 5000 RFU. Para la citotoxicidad del sobrenadante a IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ las lectoras se encuentran en promedio de ~2500 RFU existiendo diferencias significativas del sobrenadante frente a su grupo control, Control B, donde las lecturas de fluorescencia están en los ~6000 RFU. Conforme con el análisis estadístico ANOVA de una vía entre de los grupos frente a sus controles respectivos existen diferencias significativas, representadas con Valores P=<0.0001.

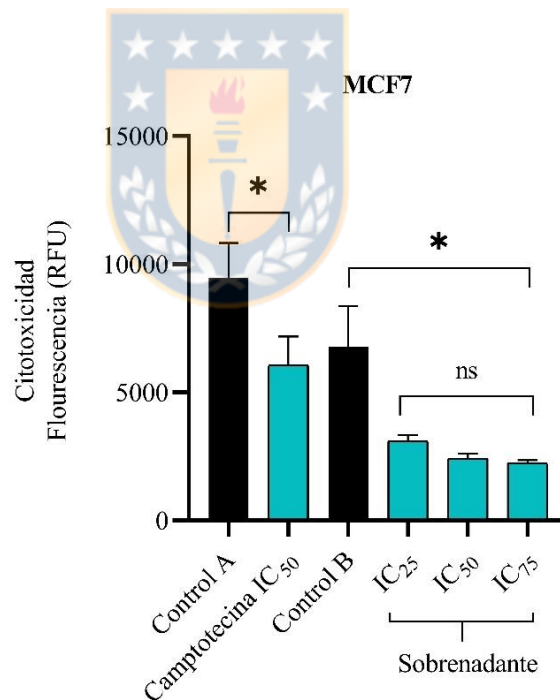


FIGURA 11. Citotoxicidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum* .

Ensayo de Apoptosis celular: En el ensayo de Apoptosis para la línea celular cancerígena MCF7 (Figura 12), evaluada a través de Luminiscencia, las lecturas de ambos grupos controles se encuentran cercanas a 300 RLU, no así para Camptotecina 100 RLY e IC₂₅ 150 RLU. Los tratamientos de sobrenadante en su IC₅₀ e IC₇₅ presentaron lecturas cercas a 0 RLU. Comparando este análisis grafico frente al análisis estadístico ANOVA de una vía existen diferencias significativas en las lecturas de luminiscencia de los diferentes tratamientos frente a su grupo control respectivo con Valores P=<0.0001.

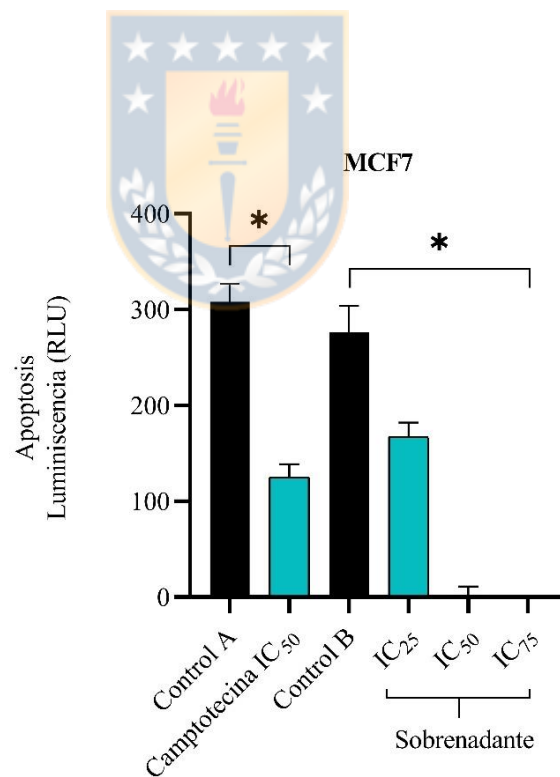


FIGURA 12. Apoptosis celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena MCF7 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Resultados de la citotoxicidad durante la exposición de extractos obtenidos desde sobrenadante de *K. Veneficum* sobre la línea celular HCT116

La determinación de citotoxicidad mediante curva dosis-respuesta para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta a diferentes concentraciones de sobrenadante, exhibe una sobreposición de las curvas a las 24, 48 y 72 horas. Sobreposición que, al ser evaluada estadísticamente mediante ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones, confirma que no existen diferencias del efecto causado por el sobrenadante en el tiempo sobre la línea celular HCT116. Respecto al comportamiento de curvas y su pendiente se observa a los 50 $\mu\text{g/mL}$, concentración mínima evaluada, un 20% de muerte celular, efecto tóxico que se mantiene hasta los ~ 100 $\mu\text{g/mL}$, y desciende rápidamente al ~ 90 -100% de muerte celular a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 12). Los valores desprendidos de este ensayo para el ensayo ApoTox Glo, determina un valor $\text{IC}_{25} = 125.1$ $\mu\text{g/mL}$; $\text{IC}_{50} = 141.6$ $\mu\text{g/mL}$; $\text{IC}_{75} = 160.2$ $\mu\text{g/mL}$.

Al observar visualmente las células del ensayo, cercano al IC_{25} se observa una disminución del crecimiento celular, menor confluencia celular, en contraste con el grupo control (Figura 13.A.). Las células expuestas a 120 $\mu\text{g/mL}$ de sobrenadante (Figura 13.B) presentan un tamaño celular dentro del mismo rango de células sin tratamiento, y pueden observarse parcialmente capsulas de detrito celular (fechas rojas). A la máxima concentración de sobrenadante, 400 $\mu\text{g/mL}$, expuestas la línea celular HCT116 no se observan células vivas y todo lo que se puede apreciar corresponde a capsulas de detrito celular (Figura 13.C).

TABLA 3. Valores IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ para sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena HCT116

Concentración Inhibidora	Concentración
IC 25	125.1 µg/mL
IC 50	141.6 µg/mL
IC 75	160.2 µg/mL

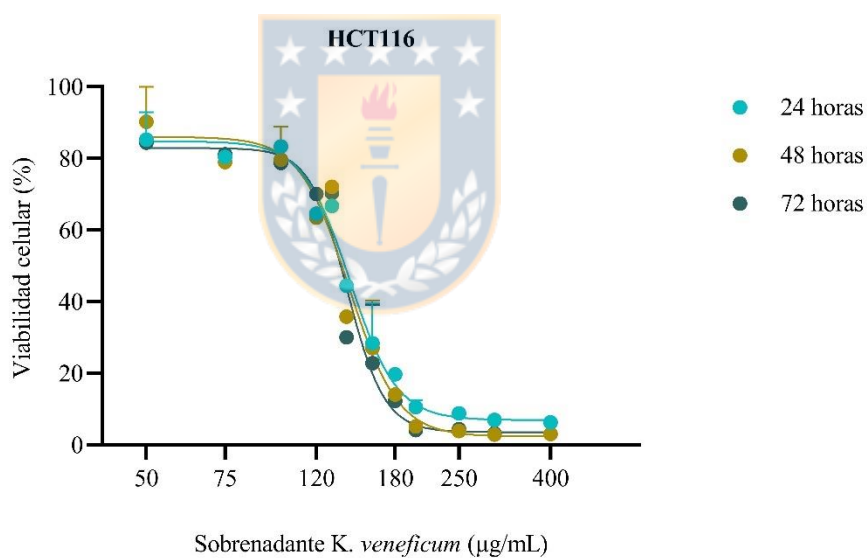


FIGURA 13. Determinación de citotoxicidad de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24,48 Y 72 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum* durante. ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones (Valores P= entre 0.3 y 1).

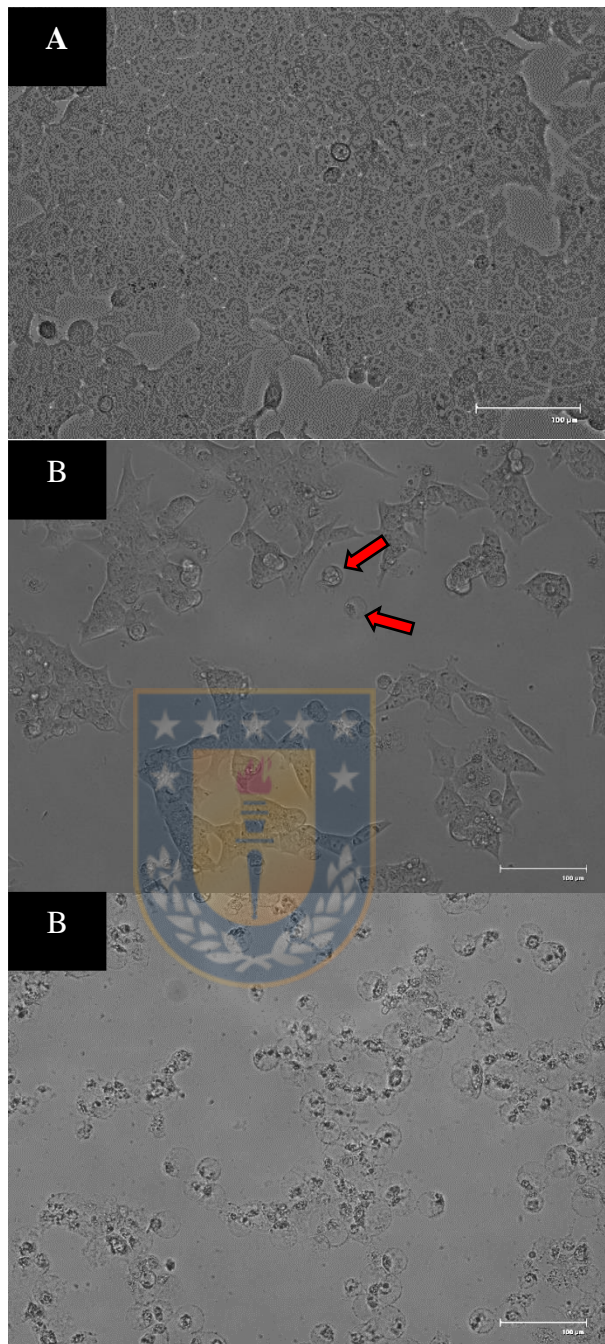


FIGURA 14. Fotografía en microscopio invertido de línea celular cancerígena HCT116, expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. (A) Control solo con células en medio de cultivo DMEM suplementado, (B) Células expuestas a 120 µg/mL y (C) 400 µg/mL de sobrenadante.

ApoTox Glo en HCT116 y Apoptosis

Ensayo de viabilidad celular: De acuerdo con los datos obtenidos de fluorescencia en la evaluación de viabilidad celular para la línea celular cancerígena HCT116 (Figura 15), los valores para los grupos control A y B se localiza en los 30000 RFU, mientras que el ensayo expuesto a Camptotecina desciende ~7000 RFU. Para los ensayos expuestos a sobrenadante el IC₂₅ desciende levemente a los 27000 RFU, mientras que para las concentraciones IC₅₀ e IC₇₅ la viabilidad celular decrece significativamente a 0 RFU. El ensayo de Camptotecina, IC₅₀ e IC₇₅ presentan diferencias significativas frente a sus grupos con controles, con valores $P = <0.0001$ determinados en un análisis estadístico ANOVA de una vía, mientras que el IC₂₅ del sobrenadante frente a su grupo control no muestra diferencias significativas, Valor $P=0.5710$.

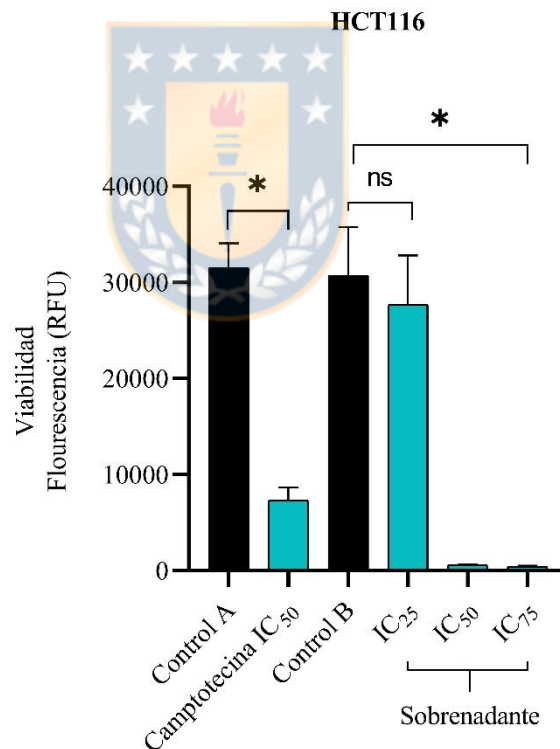


FIGURA 15. Viabilidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Ensayo de citotoxicidad celular: Para el ensayo de citotoxicidad del kit ApoTox Glo, el control de Camptotecina presenta lecturas de fluorescencia de 10000 RFU, las células de la línea cancerígena HCT116 expuesta a Camptotecina muestran diferencias significativas en los valores obtenidos frente a su control, con valores de fluorescencia cercanos a 5000 RFU y Valor $P = <0,0001$ determinado en análisis estadístico por ANOVA de una vía (FIGURA 16).

Para el grupo control de los ensayos de sobrenadante las lecturas de fluorescencia están cercanos a los 10000 RFU y el ensayo expuesto al IC_{25} no muestra diferencias significativas frente a su control con un valor $P = 0,9577$, sin embargo, los valores IC_{50} e IC_{75} sí muestran diferencias significativas frente al control con valores $P = <0,0001$.

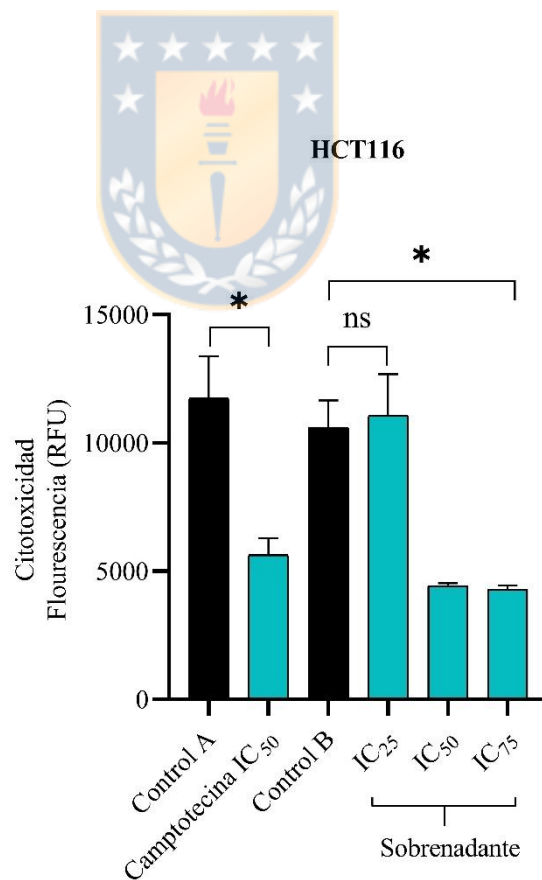


FIGURA 16. Citotoxicidad celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Ensayo de apoptosis celular: Los resultados obtenidos mediante luminiscencia para determinar apoptosis graficados en la Figura 17, enseñan diferencias en las lecturas del ensayo con Camptotecina frente a su control (Control A) con lecturas de 1700 RLU, poco más del doble de los valores de luminiscencia del Control A. Para los IC₅₀ e IC₇₅ de sobrenadante los datos de luminiscencia obtenidos se reducen a valores cercanos a ± 0 RLU, mientras que IC₂₅ los valores obtenidos de luminiscencia están en los ~750 RLU, mismo valor de su grupo control.

El análisis estadístico realizado, ANOVA de una vía, confirma la diferencia observada en el análisis visual del grafico entre el ensayo expuesto a Camptotecina y su grupo control A, al igual que para IC₅₀ e IC₇₅ del sobrenadante frente al Control B con Valores P = <0,0001 en ambos análisis. En el caso de IC₂₅ del sobrenadante frente al Control B este no presenta diferencias significativas con un valor P = 0.5867.

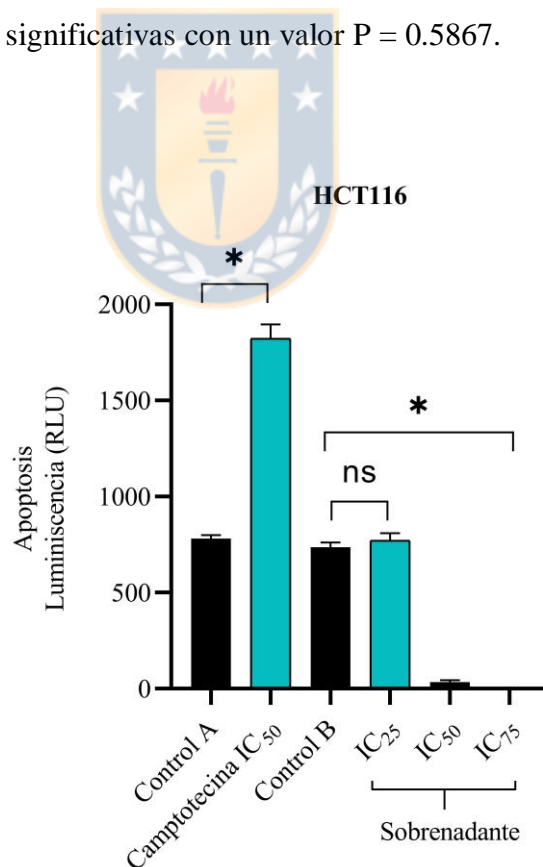


FIGURA 17. Apoptosis celular evaluada mediante Kit ApoTox Glo. Línea celular cancerígena HCT116 expuesta 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Discusión

Pese a los avances tecnológicos y el progreso en la comprensión de la biología humana el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos en el área de salud ha sido lento (Science, 2022). Simultáneamente la naturaleza ha mostrado disponer de una fuente innovadora en medicamentos contra el cáncer, una de estas fuentes son las microalgas, a pesar de esto el potencial de muchos agentes anticancerígenos marinos esta poco estudiado (Pradhan & Ki, 2022). Las karlotoxinas provenientes de *K. veneficum* se han postulado como toxinas prometedoras para abrir la puerta a nuevos medicamentos de origen microalgal (Waters et al., 2010). Sin embargo, la diversidad de cepas dentro de la especie *K. veneficum*, sumado a la amplia gama de karlotoxinas producidas, algunas identificadas muy recientemente y las diferentes propiedades químicas entre unas y otras, que aún no han sido del todo caracterizadas (Cai et al., 2016; Krock et al., 2017; Peng et al., 2010; Sheng et al., 2010; Van Wagoner et al., 2008, 2010), deja bastantes interrogantes por responder. Dada la complejidad de este escenario, esta investigación caracteriza el potencial anticancerígeno de extractos naturales provenientes *K. veneficum* sobre en las líneas celulares cancerígenas humanas MCF7 y HCT116. Específicamente de las Karlotoxinas: KmTx-10, sulfo-KmTx-10, KmTx-11, KmTx-12 y KmTx-13, toxinas integradas en el sobrenadante obtenido de los compuestos exudados provenientes de la cepa K10 (Krock et al., 2017).

Los resultados aquí presentados sugieren efecto tóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre las líneas celulares cancerígenas MCF7 y HCT116, al disminuir la viabilidad celular de los tratamientos frente a sus respectivos controles no tratados en ambos ensayos. Sin embargo, es preciso mencionar que los valores IC_{50} e IC_{75} en ambas líneas celulares no presentan señal de células vivas con el kit ApoTox Glo. Es posible en ocasiones tener resultados diferentes al llevar a cabo un mismo experimento, en virtud de factores intrínsecos como la precisión y exactitud del instrumento utilizado, tal es el caso en balanzas analíticas que al pesar un compuesto este siempre tendrá un error asociado en la última cifra significativa que la balanza sea capaz de detectar (Atienza B. et al., s. f.).

Considerando que el efecto tóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* se produce en un rango de concentraciones acotado y caracterizándose como un compuesto altamente tóxico por las bajas cantidades necesarias para producir citotoxicidad, la viabilidad nula para los IC₅₀ e IC₇₅ con el ensayo ApoTox Glo pudiese estar asociado a errores instrumentales debido a que la balanza analítica empleada posee cuatro cifras significativas y el sobrenadante pesado para ser resuspendido, 0.016 g, contiene tres cifras significativas de las cuatro que el instrumento detecta.

Para la citotoxicidad evaluada directamente mediante el Kit ApoTox Glo es de esperar que si existe reducción de la viabilidad celular la citotoxicidad a detectar sea inversamente proporcional, sin embargo, a la luz de los datos obtenidos este postulado no es consistente y no hay indicios de efecto citotóxico en las líneas celulares MCF7 y HCT116. Contrastando estos resultados con las indicaciones del fabricante la citotoxicidad puede estar subestimada sí, el efecto citotóxico actúa mediante mecanismo citostático o necrosis temprana. En el proceso citostático la célula detiene su proliferación sin destrucción celular, escenario contrario al mecanismo de necrosis, muerte celular donde se liberan componentes celulares intracelulares fuera de la membrana celular y a medida que transcurre el tiempo estos se van desintegrando, pierden sus propiedades químicas y se transforman en detrito celular (Alberts et al., 2016). Es de esperar entonces para el tratamiento con Camptotecina, compuesto que produce detención del ciclo celular con una posterior apoptosis (Hardman et al., 2001), que el kit ApoTox Glo no detecte su citotoxicidad debido a que las proteasas con las que interactúa el sustrato bis-AAF-R110 no se encuentran disponibles al no existir efecto tóxico mediante mecanismos que generen ruptura o colapso directo la membrana celular.

En relación con la apoptosis celular para la línea celular MCF7 no se evidencia mecanismo apoptótico en control positivo con Camptotecina en los resultados de esta investigación. Sin embargo, este compuesto se utiliza en tratamientos convencionales para el Cáncer y su mecanismo se encuentra ampliamente descrito en bibliografía por producir efecto apoptótico en células cancerígenas (López L. et al., 2022). La apoptosis se clasifica en diferentes etapas dependiendo de las moléculas moduladoras involucradas en el proceso. En términos generales estas son: caspasas-2, 8, 9 y 10 involucradas en apoptosis temprana,

apoptosis tardía involucra las caspasa-3, 6 y 7 (Salazar, 2009). Conforme a esto se infiere que la línea celular MCF7 bajo el tratamiento con Camptotecina se encuentra en estado apoptótico temprano, es por esto que las caspasas 3 y 7 detectadas por el Kit ApoTox Glo no da luz de apoptosis como mecanismo de muerte celular, por otra parte, debido a que los valores del sobrenadante expuestos en su IC_{25} registra valores ligeramente superiores al tratamiento de Camptotecina, es posible inferir de esto que el sobrenadante de *K. veneficum* en bajas concentraciones induce mecanismos citotóxicos relacionados con apoptosis temprana en la línea celular cancerígena MCF7. Estos resultados se contrastan con los obtenidos por Cordero (2015) en su tesis de pregrado al someter durante 24 horas la línea celular cancerígena MCF7 a Camptotecina, en las mismas concentraciones utilizada en este estudio, donde obtuvo un 14% de células en fase de apoptosis temprana frente a una viabilidad celular del 50%, viabilidad celular coincidente con la obtenida mediante el ensayo ApoTox Glo en esta investigación. Siguiendo con la hipótesis de apoptosis temprana en la línea celular MCF7 expuesta al sobrenadante obtenido de *K. veneficum* esta toma aun mayor fuerza a la luz del análisis morfológico preliminar en los ensayos de citotoxicidad con MTT, donde se aprecia encogimiento celular, membrana celular intacta con proyecciones que podría sugerir formación de cuerpos apoptóticos en etapa temprana y una pérdida de la visualización del núcleo producto de condensación de la cromatina o fragmentación nuclear, para corroborar esta hipótesis se sugiere utilizar un método sensible y específico capaz de detectar apoptosis temprana.

La línea celular cancerígena HCT116 a diferencia de la línea MCF7 no sugiere mecanismo apoptótico en su proceso de muerte celular inducido por el sobrenadante obtenido de *K. veneficum*, debido a que a las 24 horas de exposición las células vivas no manifiestan morfológicamente cambios. Sin embargo, si se aprecia detrito celular compactado en capsulas, sugiriendo un efecto citotóxico necrótico. Al igual que para la línea celular MCF7, se sugiere corroborar estos resultados sometiendo a la línea celular cancerígena HCT116 a concentraciones IC_{25} e IC_{50} y evaluar a través de métodos específicos la presencia de este mecanismo para determinar con exactitud el mecanismo que utiliza el efecto toxico producido por las KmTx presentes en el sobrenadante obtenido de *K. veneficum*. La diferencia de mecanismos citotóxicos empleados para las diferentes líneas

celulares probablemente se deba a que el sobrenadante obtenido de *K. veneficum* proviene de la cepa K10 descrita por Krock et al. (2017), que contenía las Karlotoxinas: KmTx-10, sulfo-KmTx-10, KmTx-11, KmTx-12 y KmTx-13.

Conclusiones

De la presente investigación se concluye:

- El extracto de biomasa obtenido de *K. veneficum*, entre los 3.90625 y 500 $\mu\text{g/mL}$, no presenta efecto tóxico en la línea celular cancerígena MCF7.
- El extracto de biomasa obtenido de *K. veneficum*, entre los 50 y 450 $\mu\text{g/mL}$, no presenta efecto tóxico en la línea celular cancerígena HCT116.
- Se confirma efecto citotóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum*, entre los 50 y 400 $\mu\text{g/mL}$, sobre la línea celular cancerígena MCF7.
- Se concluye que el efecto citotóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena MCF7 presenta diferencias dependiendo del tiempo de exposición del sobrenadante, aumentando su toxicidad en el tiempo.
- Se sugiere que el efecto citotóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena MCF7 actúa mediante mecanismo apoptótico temprano.
- Se confirma efecto citotóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum*, entre los 50 y 400 $\mu\text{g/mL}$, sobre la línea celular cancerígena HCT116.
- Se concluye que el efecto citotóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena HCT116 no presenta aumento de toxicidad en el tiempo.
- Se sugiere que el efecto citotóxico del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena HCT116 actúa activando necrosis celular.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2016). *Biología molecular de la célula* (Sexta edición).
- Alvarez M., K. V. (2018). *Inducción de apoptosis y efecto toxico de concentraciones subletales de Karlodinium veneficum en estadios tempranos de pez cebra (Danio rerio)*. Universidad de Concepción.
- Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean and Coastal Management*, 52(7), 342–347. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2009.04.006>
- Atienza B., J., Morais E., S. B., Herrero V, M. A., Noguera M., P., & Tortajada G., L. A. (s. f.). *Incertidumbre en las mediciones*.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. En *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 9, Issue 3, pp. 193–199). <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Cabang, A. B., de Mukhopadhyay, K., Meyers, S., Morris, J., Zimba, P. v., & Wargovich, M. J. (2017). Therapeutic effects of the euglenoid ichthyotoxin, euglenophycin, in colon cancer. *Oncotarget*, 8(61), 104347–104358. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22238>
- Cai, P., He, S., Zhou, C., Place, A. R., Haq, S., Ding, L., Chen, H., Jiang, Y., Guo, C., Xu, Y., Zhang, J., & Yan, X. (2016). Two new karlotoxins found in *Karlodinium veneficum* (strain GM2) from the East China Sea. *Harmful Algae*, 58, 66–73. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2016.08.001>
- Carrasco P., D. (2015). *Floraciones Algales Nocivas (FAN), un fenómeno natural presente en nuestras costas*. Laboratorio de Toxinas Marinas. Universidad de Chile. <http://labtox.cl/?p=984>

- Civetta, M. T. M. de, & Civetta, J. D. (2011). *Carcinogénesis*.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342011000500008
- Cordero Silva, V. S. (2015). *Evaluación in vitro de la actividad antitumoral y apoptótica del extracto natural obtenido del hongo Polypore proveniente del ecosistemas Patagónicos*.
- Cousseau, A., Siano, R., Probert, I., Bach, S., & Mehiri, M. (2020). Marine dinoflagellates as a source of new bioactive structures. En *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 65, pp. 125–171). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817905-5.00004-4>
- Deeds, J. R., & Place, A. R. (2006). Sterol-specific membrane interactions with the toxins from *Karlodinium micrum* (Dinophyceae) - A strategy for self-protection? *African Journal of Marine Science*, 28(2), 421–425.
<https://doi.org/10.2989/18142320609504190>
- Deeds, J. R., Reimschuessel, R., & Place, A. R. (2006). Histopathological effects in fish exposed to the toxins from *Karlodinium micrum*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 18(2), 136–148. <https://doi.org/10.1577/H05-027.1>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2020). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
<https://gco.iarc.fr/today>
- Freshney R. (2005). *Culture of animal cells: A manual of basic techniques* (5^a ed.).
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2019). *AlgaeBase. World-Wide electronic publication*. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Belin, C., Bottein, M.-Y. D., Bresnan, E., Chinain, M., Enevoldsen, H., Iwataki, M., Karlson, B., McKenzie, C. H., Sunesen, I., Pitcher, G. C., Provoost, P., Richardson, A., Schweibold, L., Tester, P. A., Trainer, V. L., Yñiguez, A. T., & Zingone, A. (2021). Perceived global increase in algal blooms is

- attributable to intensified monitoring and emerging bloom impacts. *Communications Earth & Environment*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s43247-021-00178-8>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Gilman, A. G. (2001). *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (J. G. Hardman, L. E. Limbird, & A. G. Gilman, Eds.; 10th. ed.) [Book]. McGraw-Hill.
- Krock, B., Busch, J. A., Tillmann, U., García-Camacho, F., Sánchez-Mirón, A., Gallardo-Rodríguez, J. J., López-Rosales, L., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., Witt, M., Cembella, A. D., & Place, A. R. (2017). LC-MS/MS detection of karlotoxins reveals new variants in strains of the marine dinoflagellate *karlodinium veneficum* from the ebro delta (NW mediterranean). *Marine Drugs*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/md15120391>
- Lloret, J., Rätz, H. J., Lleonart, J., & Demestre, M. (2016). Challenging the links between seafood and human health in the context of global change. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), 29–42. <https://doi.org/10.1017/S0025315415001988>
- López L., Y. , Arrieta V., J. , & Sánchez M., M. E. (2022). Fármacos anticancerígenos: de la naturaleza a la práctica clínica. *Contactos, Revista De Educación En Ciencias E Ingeniería*, 122, 33–45. <https://contactos.izt.uam.mx/index.php/contactos/article/view/154>
- Ministerio de Salud Chile. (2018). *Plan Nacional de Cáncer 2018-2028*. 185. https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf
- National Cancer Institute. (s. f.). *Side effects of cancer treatment*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects>
- National Cancer Institute. (2021). *Causes and prevention*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>

- National Human Genome Research Institute. (2022). *Cancer*.
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cancer>
- Okaichi, T. (2004). Red Tides. *Tokio: Terra Scientific Pub.*, 439.
- Peng, J., Place, A. R., Yoshida, W., Anklin, C., & Hamann, M. T. (2010). Structure and absolute configuration of karlotoxin-2, an ichthyotoxin from the marine dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(10), 3277–3279. <https://doi.org/10.1021/JA9091853>
- Place, A. R., Bai, X., Kim, S., Sengco, M. R., & Wayne Coats, D. (2009). Dinoflagellate Host-Parasite sterol profiles dictate karlotoxin sensitivity (1). *Journal of Phycology*, *45*(2), 375–385. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2009.00649.X>
- Place, A. R., Bowers, H. A., Bachvaroff, T. R., Adolf, J. E., Deeds, J. R., & Sheng, J. (2012). *Karlodinium veneficum*-The little dinoflagellate with a big bite. *Harmful Algae*, *14*, 179–195. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.021>
- Pradhan, B., & Ki, J. S. (2022). Phytoplankton toxins and their potential therapeutic applications: A journey toward the quest for potent pharmaceuticals. *Marine Drugs*, *20*(4). <https://doi.org/10.3390/md20040271>
- Salazar, M. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. En *Rev. Colomb. Biotecnol: Vol. XI* (Issue Diciembre).
- Science. (2022). *Translational Medicine: Mission*.
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J., Adolf, J. E., & Place, A. R. (2010). A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 2082–2087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912254107>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *72*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

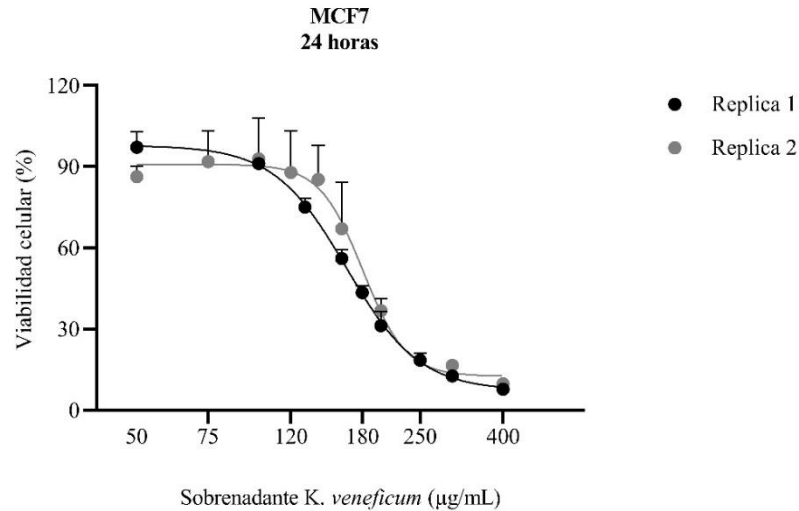
- Soletti, R. C., Pinto De Faria, G., Vernal B , Herná N Terenzi, J., Anderluh, G., Borges, H. L., Moura-Neto, V., & Gabilan, N. H. (2008). Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma cells. *Anti-Cancer Drugs*, *19*(5), 517–525.
- van Wagoner, R. M., Deeds, J. R., Satake, M., Ribeiro, A. A., Place, A. R., & Wright, J. L. C. (2008). Isolation and characterization of karlotoxin 1, a new amphipathic toxin from *Karlodinium veneficum*. *Tetrahedron Letters*, *49*(45), 6457–6461. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.08.103>
- van Wagoner, R. M., Deeds, J. R., Tatters, A. O., Place, A. R., Tomas, C. R., & Wright, J. L. C. (2010). Structure and relative potency of several karlotoxins from *Karlodinium veneficum*. *Journal of Natural Products*, *73*(8), 1360–1365. <https://doi.org/10.1021/np100158r>
- Wang, R., Wu, J., Zhou, S., Cao, R., & Chan, L. L. (2020). A preliminary study on the allelopathy and toxicity of the dinoflagellate *Karlodinium veneficum*. *Marine Pollution Bulletin*, *158*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111400>
- Waters, A. L., Hill, R. T., Place, A. R., & Hamann, M. T. (2010). The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. En *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 21, Issue 6, pp. 780–786). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.09.013>
- Wong, R. K. S., Bensadoun, R. J., Boers-Doets, C. B., Bryce, J., Chan, A., Epstein, J. B., Eaby-Sandy, B., & Lacouture, M. E. (2013). Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of acute and late radiation reactions from the MASCC Skin Toxicity Study Group. En *Supportive Care in Cancer* (Vol. 21, Issue 10, pp. 2933–2948). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00520-013-1896-2>
- World Health Organization. (2021). *World Health Statistics 2021*. <https://www.who.int/data/stories/world-health-statistics-2021-a-visual-summary>

ANEXOS

ANEXO 1. Tabla de datos obtenido de la prueba estadística ANOVA de una vía, test de comparaciones múltiples Dunnett. Línea celular cancerígena MCF7 y HCT116 expuestas durante 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Línea Celular : MCF7						
Number of comparisons per family	: 8					
Alpha	: 0,05					
ANOVA summary						
F	: 0,8177					
P value	: 0,5971					
Diferencias entre promedios (P < 0.05)	: ns					
R square	: 0,2666					
Dunnett's multiple comparisons test	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Summary	Adjusted P Value
Control vs. 3.90625 µg/mL	100,9	130,8	-29,95	-90,16 to 30,27	ns	0,587
Control vs. 7.8125 µg/mL	100,9	112	-11,09	-71,31 to 49,12	ns	0,9942
Control vs. 15.625 µg/mL	100,9	107,8	-6,943	-67,16 to 53,27	ns	0,9995
Control vs. 31.25 µg/mL	100,9	129,8	-28,9	-89,11 to 31,31	ns	0,6218
Control vs. 62.5 µg/mL	100,9	131,5	-30,57	-90,78 to 29,64	ns	0,5666
Control vs. 125 µg/mL	100,9	117,3	-16,37	-76,58 to 43,84	ns	0,9564
Control vs. 250 µg/mL	100,9	136,2	-35,26	-95,47 to 24,95	ns	0,4215
Control vs. 500 µg/mL	100,9	106,1	-5,237	-65,45 to 54,98	ns	0,9996
Línea Celular : HCT116						
Number of comparisons per family	: 8					
Alpha	: 0,05					
ANOVA summary						
F	: 2,225					
P value	: 0,0654					
Diferencias entre promedios (P < 0.05)	: ns					
R square	: 0,5003					
Dunnett's multiple comparisons test	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	95,00% CI of diff.	Summary	Adjusted P Value
Control vs. 50 µg/mL	101,5	103,6	-2,007	-15,19 to 11,18	ns	0,9978
Control vs. 100 µg/mL	101,5	109,7	-8,196	-21,38 to 4,989	ns	0,3777
Control vs. 150 µg/mL	101,5	111,3	-9,786	-22,97 to 3,399	ns	0,2134
Control vs. 200 µg/mL	101,5	110,8	-9,228	-22,41 to 3,957	ns	0,2632
Control vs. 250 µg/mL	101,5	106,8	-5,241	-18,43 to 7,944	ns	0,8076
Control vs. 300 µg/mL	101,5	117,3	-15,72	-28,91 to -2,539	*	0,0149
Control vs. 350 µg/mL	101,5	114,8	-13,27	-26,46 to -0,08548	*	0,0481
Control vs. 400 µg/mL	101,5	110,3	-8,782	-21,97 to 4,403	ns	0,3092
Control vs. 450 µg/mL	101,5	110,1	-8,531	-21,72 to 4,654	ns	0,3374

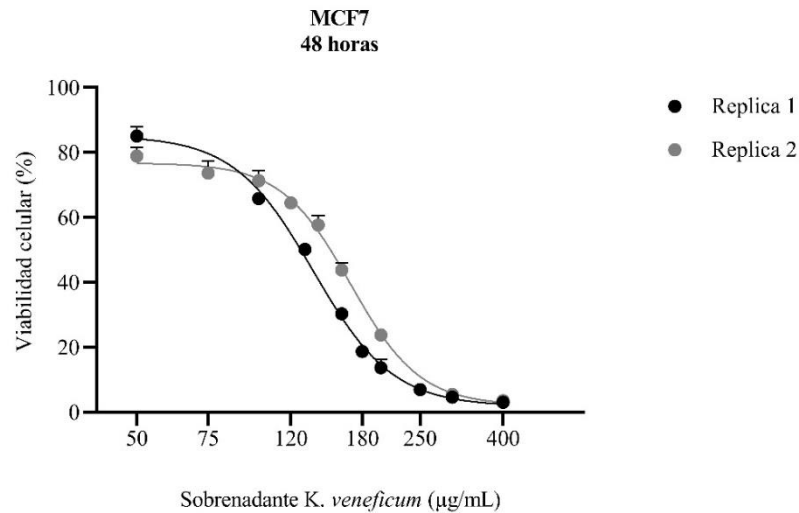
ANEXO 2. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.



ANEXO 3. Tabla de datos obtenido de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Línea Celular : MCF7		24 horas
Unpaired t test		
P value	: 0,3386	
P value summary	: ns	
One- or two-tailed P value?	: Two-tailed	
t, df	: t=0,9865, df=16	
How big is the difference?		
Mean of column A	: 48,12	
Mean of column B	: 63,8	
Difference between means (B - A) ± SEM	: 15,68 ± 15,90	
95% confidence interval	: -18,02 to 49,39	
R squared (eta squared)	: 0,05733	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	: 1,006, 8, 8	
P value	: 0,993	
P value summary	: ns	
Data analyzed		
Sample size, column A (Replica 1)	: 9	
Sample size, column B (Replica 2)	: 9	

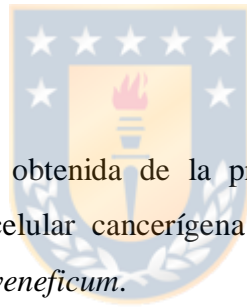
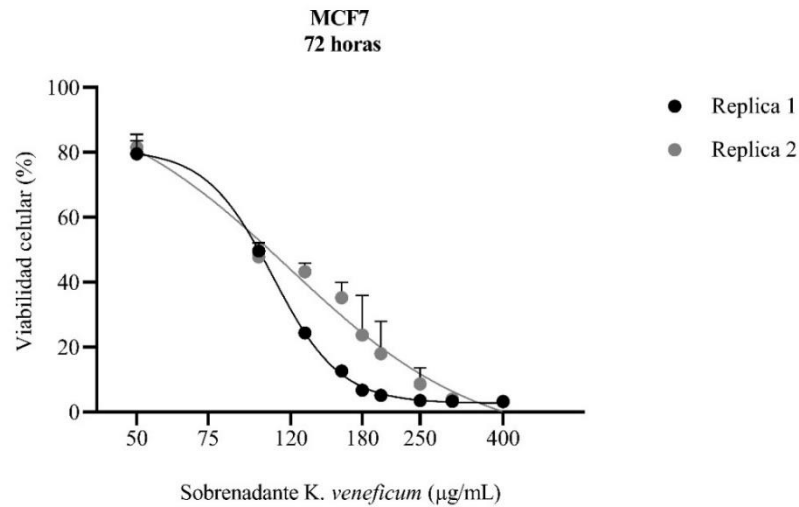
ANEXO 4. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.



ANEXO 5. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Línea Celular : MCF7		48 horas
Unpaired t test		
P value	: 0,2665	
P value summary	: ns	
One- or two-tailed P value?	: Two-tailed	
t, df	: t=1,151, df=16	
How big is the difference?		
Mean of column A	: 30,92	
Mean of column B	: 46,92	
Difference between means (B - A) ± SEM	: 15,99 ± 13,89	
95% confidence interval	: -13,46 to 45,45	
R squared (eta squared)	: 0,07651	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	: 1,016, 8, 8	
P value	: 0,9829	
P value summary	: ns	
Data analyzed		
Sample size, column A (Replica 1)	: 9	
Sample size, column B (Replica 2)	: 9	

ANEXO 6. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.



ANEXO 7. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena MCF7 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Linea Celular	: MCF7	72 horas
Unpaired t test		
P value	: 0,4953	
P value summary	: ns	
One- or two-tailed P value?	: Two-tailed	
t, df	: t=0,6979, df=16	
How big is the difference?		
Mean of column A	: 20,89	
Mean of column B	: 29,49	
Difference between means (B - A) ± SEM	: 8,596 ± 12,32	
95% confidence interval	: -17,51 to 34,71	
R squared (eta squared)	: 0,02954	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	: 1,098, 8, 8	
P value	: 0,8977	
P value summary	: ns	
Data analyzed		
Sample size, column A (Replica 1)	: 9	
Sample size, column B (Replica 2)	: 9	

ANEXO 8. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones. Comparación de la citotoxicidad producida por la exposición a 24, 48 y 72 horas del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena MCF7.

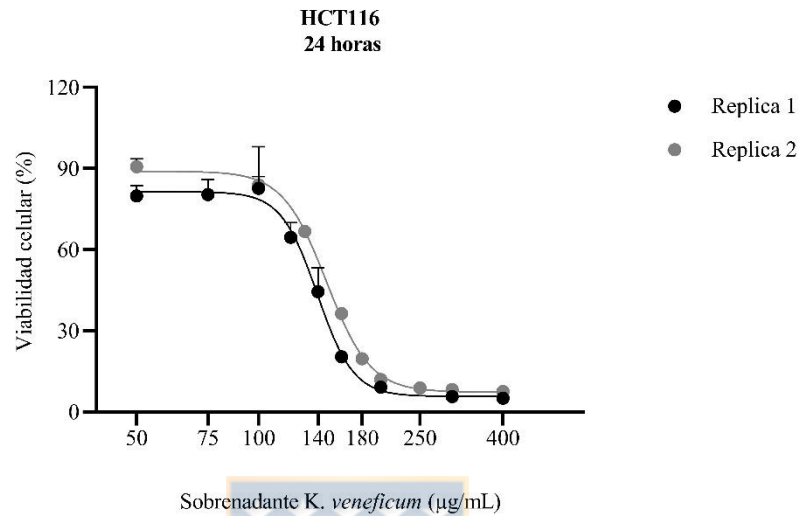
Línea Celular : MCF7				
Number of families	9			
Number of comparisons per family	3			
Alpha	0,05			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
50 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	9,769	-7,624 to 27,16	ns	0,3511
24 horas vs. 72 horas	11,22	-6,178 to 28,61	ns	0,2574
48 horas vs. 72 horas	1,446	-15,95 to 18,84	ns	0,9761
100 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	23,48	6,088 to 40,87	**	0,0072
24 horas vs. 72 horas	43,28	-25,88 to 60,67	****	<0,0001
48 horas vs. 72 horas	19,79	2,401 to 37,19	*	0,0239
130 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	24,96	0,3598 to 49,56	*	0,0463
24 horas vs. 72 horas	41,27	19,97 to 62,57	***	0,0002
48 horas vs. 72 horas	16,31	-4,992 to 37,61	ns	0,1551
160 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	24,58	7,187 to 41,97	**	0,005
24 horas vs. 72 horas	37,65	20,26 to 55,04	****	<0,0001
48 horas vs. 72 horas	13,07	-4,325 to 30,46	ns	0,1652
180 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	24,75	0,1561 to 49,35	*	0,0484
24 horas vs. 72 horas	28,23	6,930 to 49,53	**	0,0084
48 horas vs. 72 horas	3,478	-17,82 to 24,78	ns	0,9112
200 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	15,21	-2,187 to 32,60	ns	0,0938
24 horas vs. 72 horas	22,44	5,047 to 39,83	*	0,0102
48 horas vs. 72 horas	7,234	-10,16 to 24,63	ns	0,5556

Continuación de Tabla
hoja siguiente

Línea Celular		: MCF7		
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
250 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	11,52	-13,08 to 36,12	ns	0,4773
24 horas vs. 72 horas	12,33	-8,968 to 33,64	ns	0,33
48 horas vs. 72 horas	0,8125	-20,49 to 22,11	ns	0,9949
300 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	9,553	-7,840 to 26,95	ns	0,3667
24 horas vs. 72 horas	10,98	-6,410 to 28,38	ns	0,2711
48 horas vs. 72 horas	1,43	-15,96 to 18,82	ns	0,9766
400 µg/mL				
24 horas vs. 48 horas	5,455	-11,94 to 22,85	ns	0,7128
24 horas vs. 72 horas	5,518	-11,88 to 22,91	ns	0,7074
48 horas vs. 72 horas	0,06233	-17,33 to 17,46	ns	>0,9999



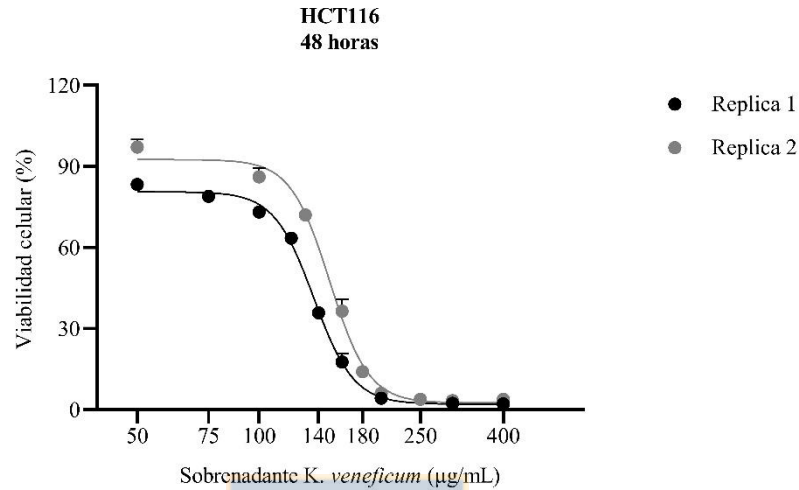
ANEXO 9. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.



ANEXO 10. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 24 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Linea Celular	: HCT116	24 horas
Unpaired t test		
P value	: 0,6932	
P value summary	: ns	
One- or two-tailed P value?	: Two-tailed	
t, df	: t=0,4017, df=16	
How big is the difference?		
Mean of column A	: 43,57	
Mean of column B	: 37,1	
Difference between means (B - A) ± SEM	: -6,467 ± 16,10	
95% confidence interval	: -40,59 to 27,66	
R squared (eta squared)	: 0,009986	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	: 1,009, 8, 8	
P value	: 0,9904	
P value summary	: ns	
Data analyzed		
Sample size, column A (Replica 1)	: 9	
Sample size, column B (Replica 2)	: 9	

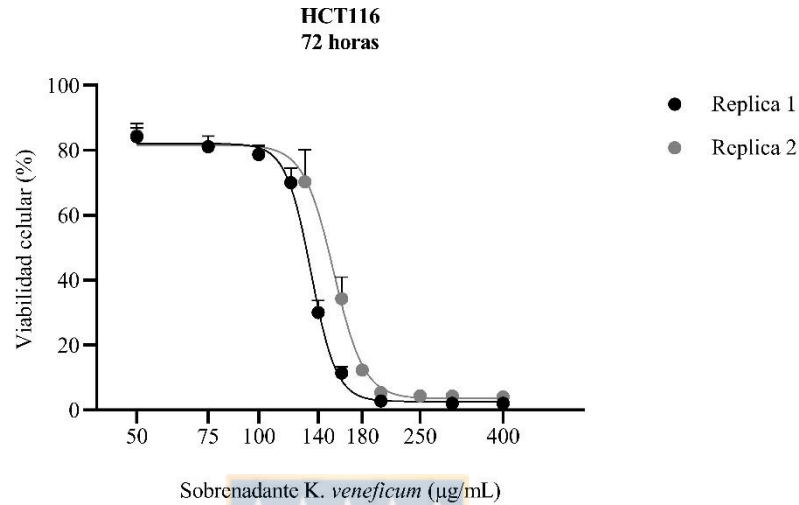
ANEXO 11. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.



ANEXO 12. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 48 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Línea Celular	: HCT116	48 horas
Unpaired t test		
P value	: 0,8098	
P value summary	: ns	
One- or two-tailed P value?	: Two-tailed	
t, df	: t=0,2447, df=16	
How big is the difference?		
Mean of column A	: 40,13	
Mean of column B	: 35,88	
Difference between means (B - A) ± SEM	: -4,252 ± 17,38	
95% confidence interval	: -41,09 to 32,59	
R squared (eta squared)	: 0,003728	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	: 1,244, 8, 8	
P value	: 0,7646	
P value summary	: ns	
Data analyzed		
Sample size, column A (Replica 1)	: 9	
Sample size, column B (Replica 2)	: 9	

ANEXO 13. Curva dosis-respuesta de las réplicas experimentales para la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.



ANEXO 14. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística T Student. Réplicas experimentales de la línea celular cancerígena HCT116 expuesta durante 72 horas al sobrenadante obtenido de *K. veneficum*.

Línea Celular	: HCT116	72 horas
Unpaired t test		
P value	: 0,6825	
P value summary	: ns	
One- or two-tailed P value?	: Two-tailed	
t, df	: t=0,4166, df=16	
How big is the difference?		
Mean of column A	: 40,26	
Mean of column B	: 33,13	
Difference between means (B - A) ± SEM	: -7,122 ± 17,09	
95% confidence interval	: -43,36 to 29,12	
R squared (eta squared)	: 0,01073	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	: 1,144, 8, 8	
P value	: 0,8537	
P value summary	: ns	
Data analyzed		
Sample size, column A (Replica 1)	: 9	
Sample size, column B (Replica 2)	: 9	

ANEXO 15. Tabla de datos obtenida de la prueba estadística ANOVA de dos vías, test Tukey de múltiples comparaciones. Comparación de la citotoxicidad producida por la exposición a 24, 48 y 72 horas del sobrenadante obtenido de *K. veneficum* sobre la línea celular cancerígena HCT116.

Línea Celular		: HCT116			
Number of families	:	12			
Number of comparisons per family	:	3			
Alpha	:	0,05			
Tukey's multiple comparisons test		Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value
50 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas		-4,985	-22,29 to 12,32	ns	0,7463
24 horas vs. 72 horas		0,8828	-16,43 to 18,19	ns	0,9907
48 horas vs. 72 horas		5,868	-11,44 to 23,18	ns	0,6684
75 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas		1,443	-23,04 to 25,92	ns	0,9876
24 horas vs. 72 horas		-0,6953	-25,17 to 23,78	ns	0,9971
48 horas vs. 72 horas		-2,138	-26,62 to 22,34	ns	0,973
100 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas		3,647	-13,66 to 20,96	ns	0,8539
24 horas vs. 72 horas		4,562	-12,75 to 21,87	ns	0,7821
48 horas vs. 72 horas		0,915	-16,39 to 18,22	ns	0,99
120 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas		1,09	-23,39 to 25,57	ns	0,9929
24 horas vs. 72 horas		-5,524	-30,00 to 18,96	ns	0,8345
48 horas vs. 72 horas		-6,614	-31,09 to 17,87	ns	0,7725
130 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas		-5,299	-29,78 to 19,18	ns	0,8465
24 horas vs. 72 horas		-3,55	-28,03 to 20,93	ns	0,9276
48 horas vs. 72 horas		1,749	-22,73 to 26,23	ns	0,9819
140 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas		8,655	-15,82 to 33,13	ns	0,6458
24 horas vs. 72 horas		14,42	-10,06 to 38,90	ns	0,3128
48 horas vs. 72 horas		5,765	-18,71 to 30,24	ns	0,8213

Continuación de Tabla
hoja siguiente

Linea Celular		: HCT116			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Summary	Adjusted P Value	
160 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas	1,281	-16,03 to 18,59	ns	0,9805	
24 horas vs. 72 horas	5,535	-11,77 to 22,84	ns	0,6981	
48 horas vs. 72 horas	4,254	-13,06 to 21,56	ns	0,8073	
180 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas	5,665	-18,81 to 30,14	ns	0,8268	
24 horas vs. 72 horas	7,417	-17,06 to 31,90	ns	0,7237	
48 horas vs. 72 horas	1,752	-22,73 to 26,23	ns	0,9818	
200 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas	5,361	-11,95 to 22,67	ns	0,7135	
24 horas vs. 72 horas	6,425	-10,88 to 23,73	ns	0,6183	
48 horas vs. 72 horas	1,064	-16,25 to 18,37	ns	0,9865	
250 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas	4,983	-19,50 to 29,46	ns	0,8629	
24 horas vs. 72 horas	4,43	-20,05 to 28,91	ns	0,8898	
48 horas vs. 72 horas	-0,5528	-25,03 to 23,93	ns	0,9982	
300 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas	4,143	-13,17 to 21,45	ns	0,8161	
24 horas vs. 72 horas	3,827	-13,48 to 21,14	ns	0,8406	
48 horas vs. 72 horas	-0,3163	-17,63 to 16,99	ns	0,9988	
400 µg/mL					
24 horas vs. 48 horas	3,276	-14,03 to 20,59	ns	0,8802	
24 horas vs. 72 horas	3,263	-14,05 to 20,57	ns	0,8811	
48 horas vs. 72 horas	-0,01325	-17,32 to 17,30	ns	>0,9999	