

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA



**EVALUACION DE LA NEUROTOXICIDAD DEL LISADO DE *KARENIA SELLIFORMIS*
CEPA CREAN Ks_02 EN ESTADIOS TEMPRANOS DE *DANIO RERIO***

CAMILA IGNACIA BARRA BARRA

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCION - CHILE

SEPTIEMBRE, 2025

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

**EVALUACION DE LA NEUROTOXICIDAD DEL LISADO DE *KARENIA SELLIFORMIS*
CEPA CREAN Ks_02 EN ESTADIOS TEMPRANOS DE *DANIO RERIO***

Por

CAMILA IGNACIA BARRA BARRA

Profesora guía

DRA. ALEJANDRA JUSTINA LLANOS RIVERA

Profesora co - guía

DRA. ALLISSON PATSY ASTUYA VILLALÓN

SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA

CONCEPCIÓN - CHILE

SEPTIEMBRE, 2025

Universidad de Concepción

Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Este Seminario de Título ha sido realizado en el Laboratorio de Toxicología Acuática (LATAC), de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.

Profesora Guía:

Dra. Alejandra Llanos Rivera
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Profesora Co-guía:

Dra. Allisson Astuya Villalón
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Leonardo Castro Cifuentes
Departamento de Oceanografía
Universidad de Concepción

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de concepción

Coordinador Seminario de título:

Dr. Fernando Cruzat Cruzat
Departamento de Oceanografía
Universidad de concepción

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este maravilloso trabajo.

Agradezco especialmente a mi profesora guía, Dra. Alejandra Llanos Rivera, por su constante apoyo, orientación y dedicación durante todo el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradezco a mi profesora co-guía, Dra. Allisson Astuya Villalón, por sus valiosos aportes y su disposición para ayudarme cuando lo necesité.

También extiendo mis agradecimientos al Laboratorio de Toxicología Acuática (LATAC) y a su encargado, Patricio Yáñez Bailey, por brindarme el espacio, los recursos y el apoyo necesario para llevar a cabo este estudio. De igual manera, agradezco al Laboratorio de Biotoxinas (LBTx) y a Victoria Alfaro Ahumada por facilitar el acceso a las muestras de microalgas necesarias para esta investigación.

A la Universidad de Concepción y a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, por mi formación académica y por las oportunidades brindadas a lo largo de mi carrera.

Finalmente, agradezco profundamente a mi madre, Jessica Barra Umaña, y a mi abuela, Marta Umaña Jara, quienes han estado para mí desde siempre, guiándome por un buen camino y brindándome su apoyo incondicional. A mis queridos abuelos que, aunque no estén presentes en estos momentos, hicieron un gran esfuerzo por formar la persona que soy hoy en día. Asimismo, agradezco a mi familia y seres queridos por su apoyo, comprensión y motivación constante durante este proceso. Su compañía fue fundamental para alcanzar este logro.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	9
INTRODUCCION	10
Floraciones algales nocivas	10
<i>Karenia selliformis</i>	10
<i>Karenia selliformis</i> cepa CREAN Ks_02.....	11
Neurotoxicidad	13
HIPOTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
1. Determinar el LC50 de células lisadas de <i>Karenia selliformis</i> en estadios tempranos de <i>Danio rerio</i> (embriones y larvas tempranas).....	15
2. Evaluar el movimiento espontaneo de la cola de los embriones expuestos a lisado de <i>Karenia selliformis</i> cepa CREAN_Ks02 en ciclos alternado de luz y oscuridad.....	15
3. Evaluar la actividad locomotora de las larvas expuestas a lisado de <i>Karenia selliformis</i> cepa CREAN_Ks02 en ciclos alternados de luz y oscuridad en exposición crónica y aguda.	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Mantenimiento de pez cebra y obtención de larvas	16
Mantenimiento de <i>Karenia selliformis</i>	16
Obtención de células lisadas de <i>Karenia selliformis</i>	16
Control Positivo	18
Control negativo	18
Determinación del LC50 de células lisadas de <i>Karenia selliformis</i> en estadios tempranos de <i>Danio rerio</i>	18
Exposición en embriones y larvas	18
Evaluación de mortalidad y edemas	19

Evaluación de la neurotoxicidad en embriones y larvas de <i>Danio rerio</i> expuestos a células lisadas de <i>Karenia selliformis</i>.....	19
Evaluación de neurotoxicidad en embriones	20
Evaluación de neurotoxicidad en larvas.....	20
Evaluación se realizó en dos grupos experimentales de larvas de 96 hpf: ¡Error! Marcador no definido.	
Experimento de exposición crónica:	21
Experimento de exposición aguda:	21
Análisis de datos	22
RESULTADOS	23
Determinación del LC50 del lisado de <i>Karenia selliformis</i> cepa Ks_02.....	24
Determinación de la toxicidad del control positivo 3,4 Dicloroanilina	23
Determinación de la neurotoxicidad del lisado de <i>Karenia selliformis</i> cepa Ks_02 en estadios temprano del <i>Danio rerio</i>.....	26
Embriones (24 hpf).....	26
Larvas de 96 hpf en exposición crónica.....	29
Evaluación de la neurotoxicidad en larvas en exposición aguda (96 hpf).	31
DISCUSION.....	34
CONCLUSION.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo del <i>Danio rerio</i> desde un embrión hasta llegar a un pez adulto.....	12
Figura 2: Desarrollo de embriones de pez cebra a diferentes tratamientos.....	13
Figura 3: Actividad de enrollamiento de la cola en embriones de pez cebra.....	20
Figura 4: Secuencia metodológica del experimento de exposición crónica..	21
Figura 5: Secuencia metodológica de experimento de exposición aguda.....	21
Figura 6: A. Embrión de <i>Danio rerio</i> de 48 hpf expuesto 3,4 dicloroanilina que presenta edema pericárdico. B. Proporción de embriones expuestos a diferentes concentraciones de 3,4 DCA que generaron edemas.....	23
Figura 7: A. Larva de <i>Danio rerio</i> de 72 hpf a una concentración 33 µL de 3,4 DCA que presenta edema pericárdico y vitelino. B. Proporción de las larvas expuestas a diferentes concentraciones de 3,4 DCA que generaron edemas.....	24
Figura 8: LC50 en embriones de 24 hpf expuestos a concentraciones de lisado de la cepa Ks_02.	24
Figura 9: Porcentaje de edemas en embriones de <i>Danio rerio</i> de 48hpf.....	25
Figura 10: LC50 en larvas de 4 dpf expuestas por 48 horas al lisado de la cepa Ks_02.....	25
Figura 11: Promedio de movimiento espontáneo de la cola en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos por 24 horas al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	26
Figura 12: Movimiento espontáneo de la cola en embriones de <i>Danio rerio</i> de 24 hpf.....	27
Figura 13: Promedio de movimiento espontáneo de la cola en embriones de <i>Danio rerio</i> de 24 hpf expuestos al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	28
Figura 14: Actividad locomotora de larvas de <i>Danio rerio</i> de 96 hpf expuestas crónicamente al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	29
Figura 15: Promedio de la actividad locomotora de larvas de <i>Danio rerio</i> de 96 hpf expuestas crónicamente al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	30
Figura 16: Grafico de barra para promedio de la actividad locomotora en larvas de <i>Danio rerio</i> de 96 hpf expuestas crónicamente al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	31
Figura 17: Promedio de actividad en acondicionamiento larvas de <i>Danio rerio</i> de 96 hpf expuestas agudamente al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	32
Figura 18: Promedio de la actividad locomotora de larvas de <i>Danio rerio</i> de 96 hpf expuestas agudamente al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	32
Figura 19: Grafico de barra para promedio de la actividad locomotora en larvas de <i>Danio rerio</i> de 96 hpf expuestas agudamente al lisado de <i>Karenia selliformis</i>	33

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de rango de concentraciones utilizadas en embriones y larvas, dependiendo del objetivo a abordar.....	17
---	----

RESUMEN

El dinoflagelado *Karenia selliformis* ha sido reconocido por causar floraciones algales nocivas (FANs) en diferentes latitudes del mundo, teniendo un efecto devastador en los ecosistemas marinos y la acuicultura. La cepa chilena CREAN Ks_02, del Archipiélago de las Guaitecas, es notable por su citotoxicidad, aunque no sintetiza las toxinas clásicas, gymnodiminas o brevetoxinas.

En el presente estudio, se investigó la toxicidad en el desarrollo y neurotoxicidad del lisado celular de *Karenia selliformis* en la etapa temprana de vida de un modelo vertebrado, el pez cebra (*Danio rerio*), que se utiliza frecuentemente para evaluar la toxicidad en el desarrollo. El valor de LC50 para los embriones de 3 horas post fecundación fue de 5.312 células*mL⁻¹ y para las larvas de 3 días post fecundación fue de 15.000 células*mL⁻¹. El umbral subletal se estableció en un valor inferior a 1.000 células/mL para medir respuestas neuroconductuales específicas.

Embriones de 24 horas post fecundación expuestos al lisado mostraron hiperactividad, mientras que en las larvas se observó que bajas concentraciones de lisado (125 - 250 células*mL⁻¹) provocan hipoactividad y una alta concentración del lisado (500 – 1.000 células*mL⁻¹) hiperactividad. En las larvas, observamos un efecto inhibitor sobre la locomoción durante la exposición aguda a concentraciones altas del lisado. Estos hallazgos indican un efecto neurotóxico complejo relacionado con la dosis y el tiempo de exposición.

La conclusión es que el lisado CREAN Ks_02 influye en la viabilidad y el desarrollo neuromotor en *Danio rerio* y hay una necesidad de realizar más estudios para examinar la identificación de su entidad tóxica para mejorar la vigilancia ambiental y preservar la biodiversidad marina en Chile.

INTRODUCCION

Floraciones algales nocivas

Las floraciones algales nocivas (FAN), comúnmente conocidas como “marea roja”, se encuentran cada vez más asociadas al cambio climático (Franco et al., 2020). Este aumento térmico favorece la proliferación de microalgas, intensificando la magnitud y frecuencia de los eventos de FAN. Posteriormente, durante la senescencia y muerte celular, la descomposición de la biomasa algal implica un elevado consumo de oxígeno disuelto, lo que genera condiciones de hipoxia o, en casos más extremos, anoxia (Gobler et al., 2017). Estos procesos no solo reducen drásticamente la disponibilidad de oxígeno para la biota marina, sino que además contribuyen a la acidificación del agua, alterando la homeostasis de los ecosistemas acuáticos (Tester et al., 2020). En consecuencia, los organismos marinos se ven afectados tanto por la ingestión directa de toxinas producidas por las microalgas, como indirectamente por la disminución del oxígeno ambiental, lo que compromete de manera significativa su supervivencia y dinámica poblacional (Puxan-Oliva. 2025)

En este contexto, no solo las alteraciones fisicoquímicas derivadas de las FAN impactan sobre los ecosistemas marinos, sino también la capacidad de diversas especies de microalgas de producir metabolitos secundarios tóxicos. Estos compuestos representan un factor de riesgo adicional, dado que pueden acumularse a lo largo de la red trófica y ejercer efectos adversos en distintos niveles biológicos, desde alteraciones celulares hasta mortalidad masiva de organismos (Tester et al., 2020). Por otro lado, las FAN tóxicas se caracterizan por la síntesis de diversas biotoxinas que han sido responsables de episodios de intoxicaciones y mortalidad en humanos, peces, aves y mamíferos marinos (Anderson, 2009). Dentro de este grupo destacan las especies ictiotóxicas, cuya acción provoca daño fisiológico severo o muerte en peces. Dichas microalgas liberan sustancias bioactivas que alteran la fisiología de los organismos expuestos, afectando procesos esenciales como, la función respiratoria y la integridad celular (Ling et al., 2010).

Karenia selliformis

Karenia selliformis pertenece a la clase Dinophyceae, orden Gymnodiniales, familia Kareniaceae. Antiguamente fue nombrada como *Gyrodinium aureolum* y *Gymnodinium mikimotoi*. En el 2004, se le denominó oficialmente como *Karenia selliformis* basándose en sus características moleculares y morfológicas (Haywood et al., 2004). Esta especie se puede encontrar en varias latitudes del mundo, incluyendo Nueva Zelanda, Kuwait, Golfo de México, Francia, Australia y Chile (Vellojin et al., 2023). Produce toxinas del tipo gimnodiminas (GYM) que se denominan como neurotóxicas, ya que actúan como bloqueadores neuromusculares y alteran los receptores nicotínicos de la acetilcolina (Assunção et al., 2017).

La primera floración de *Karenia* ssp en Chile fue en el año 1999 en las aguas de Chiloé (42°S), con densidades de 80.000 células*mL⁻¹ (Clément et al., 2001). En Chile esta especie ha mostrado una capacidad de tolerar y a adaptarse a condiciones ambientales, tales como la temperatura donde sus floraciones están asociadas con temperaturas de 13 y 15°C (Guillou et al., 2002). Se ha registrado una tasa de crecimiento de 0,41±0,03 células/día en las aguas costeras del océano Pacífico sureste, Chiloé, (42°S) y en Estrecho de Magallanes (53°S). En condiciones experimentales la cepa aislada del archipiélago de Guaitecas, Sur de Chile, (43°S), se ha mantenido con una salinidad 30 psu y temperatura de 18°C, alcanzando la abundancia máxima de 11.800±904 células*mL⁻¹ (Vellojin et al., 2023).

***Karenia selliformis* cepa CREAN Ks_02**

En marzo del 2018 se aisló la cepa CREAN Ks_02 desde el archipiélago de las Guaitecas derivado de una floración algal nociva en la región de Aysén en verano y principio de otoño. La cepa Ks_02 se caracteriza por ser citotóxica, lo que se convierte en una gran amenaza para la vida acuática marina y para las industrias salmoneras. Esta cepa CREAN Ks_02 no produce Gimnodiminas, pero se encontró dos compuestos con una transición de masa similar al brevenal, compuesto relacionado con las brevetoxinas (Mardones et al., 2020). Adicionalmente, esta cepa de *Karenia* es capaz de producir ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y especies reactivas de oxígenos (ROS) que pueden exhibir una mayor toxicidad debido a que provocan la peroxidación lipídica en presencia de las ROS (Arzul, 1995). Se hipotetiza que el nicho ambiental de *Karenia* en Chile se encuentra en aguas de mar adentro durante la temporada de verano, lo que hace que esta cepa sea única y distintiva a las demás *Karenia selliformis* que hay en otras latitudes del mundo. Debido a esto, es de gran importancia estudiar su toxicidad y condiciones de crecimiento para comprender mejor su impacto en el ecosistema marino (Mardones et al., 2020).

Aballay et al. (2025) demostró que el exudado de la cepa chilena CREAN_Ks02 tiene un efecto excitotóxico, es decir un daño celular causado por una hiperactividad de las neuronas significativo, lo que sugiere la presencia de metabolitos bioactivos activadores de los canales de sodio dependientes de voltaje con acción neurotóxica aún no caracterizados analíticamente. Además de los efectos neurotóxicos descritos en líneas celulares, se ha reportado que los exudados de *K. selliformis* CREAN_Ks02 tienen un impacto alelopático significativo sobre diversas especies de fitoplancton, afectando su crecimiento, fotosíntesis y producción de especies reactivas de oxígeno (Alfaro-Ahumada et al., 2024). Esto evidencia la versatilidad y potencia tóxica de los compuestos liberados por esta cepa chilena.

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha transformado en una de las principales especies utilizadas para evaluar la toxicidad en organismos acuáticos. Aunque en un inicio fue conocido como un pez ornamental de acuario, hoy en día es ampliamente reconocido en la investigación biomédica y ecotoxicológica gracias a las múltiples ventajas que ofrece frente a otros modelos animales. Su rápido desarrollo embrionario, la gran cantidad de descendencia, la fertilización externa y la transparencia de sus embriones y larvas permiten observar en detalle los órganos internos y los procesos biológicos desde etapas muy tempranas (Figura 1). Además, se trata de un pez pequeño, de apenas unos 4 cm en su etapa adulta, fácil de mantener y manipular en laboratorio, lo que facilita su uso en estudios experimentales. Otro aspecto clave es que, en la Unión Europea, el pez cebra cuenta con una regulación específica a través de la Directiva 2010/63/UE, la cual establece que los embriones solo son considerados animales protegidos a partir de las 120 horas post-fecundación (hpf). Esto significa que antes de ese punto su uso es más flexible, lo que ha impulsado su adopción como un modelo alternativo, ético y científicamente validado en investigaciones sobre toxicidad y neurotoxicidad (Strähle et al., 2012; European Parliament & Council of the European Union, 2010).



Figura 1: Desarrollo del *Danio rerio* desde un embrión hasta llegar a un pez adulto. Ilustración de elaboración propia (Barra Camila).

Wang et al. (2019) evaluó los efectos de células lisadas de *Karenia mikimotoi* en el desarrollo de los embriones del pez cebra, observando diferentes tipos de anomalías. La figura 2 nos entrega varios resultados de toxicidad, como deformación en los embriones expuestos al lisado, a medida que avanzan las horas (12-48 hpf). Esto indica que hay un efecto negativo en el desarrollo del embrión. Por otra parte, podemos observar anomalías específicas, como coagulación, edema del saco vitelino y retraso en el desarrollo (cola y el pericardio).

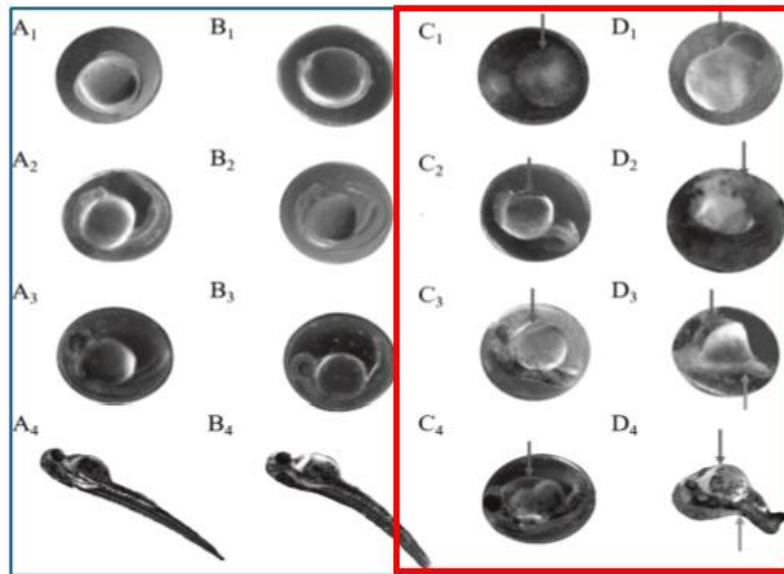


Figura 2: Desarrollo de embriones de pez cebra a diferentes tratamientos. Las columnas A y B muestran procesos normales del desarrollo (blanco y control negativo) y C-D muestran el desarrollo anormal del pez cebra (cuadro rojo). Lo que también indica los procesos de desarrollo a 12, 24, 36 y 48 hpf (1, 2, 3 y 4 respectivamente). Las flechas en la columna C y D indican coagulación en C1, edema del saco vitelino C2, C3, C4, D3 y D4, retraso de su desarrollo D2, D3 y D4; las flechas de puntos en D3 y D4 muestran la malformación en la cola. Tomada de Wang et al. (2019).

Neurotoxicidad

La neurotoxicidad es un área de estudio importante en la toxicología que se centra en los efectos adversos de sustancias químicas en el sistema nervioso de los organismos. La evaluación de la neurotoxicidad en estas fases tempranas permite identificar potenciales riesgos y efectos perjudiciales de diversas sustancias (Oliviera et al., 2021).

Para evaluar la neurotoxicidad en los estadios tempranos del pez cebra hay diferentes enfoques. Los efectos de las sustancias químicas en el desarrollo cerebral se pueden evaluar de varias formas como patrones de expresión genética, morfogénesis neuronal y perfil neuroconductual (Kalueff et al., 2013). El cambio neuroconductual es uno de los resultados más recurrentes al investigar en el pez cebra; donde se evalúa el número de movimientos espontáneos o inducidos por estimulación. En el caso de los embriones, la neurotoxicidad del desarrollo (DNT), mide el enrollamiento en su cola que es un movimiento embrionario espontaneo o inducido por el tacto e implica una flexión de izquierda a derecha y que aparece en el embrión alrededor de las 18 hpf, y que luego disminuye gradualmente (Oliviera et al (2021)). En larvas se mide con un ensayo de comportamiento denominado (Actividad

locomotora), que analiza el movimiento completo de la larva una vez que ya se ha inflado la vejiga natatoria.

Por lo tanto, aunque se ha comprobado la neurotoxicidad del *Karenia selliformis* en distintos modelos (Aballay et al., 2025; Qin yuan et al., 2018), aún es necesario profundizar en como los compuestos presentes en el lisado de esta cepa pueden afectar el desarrollo temprano de los vertebrados. El pez cebra permite detectar cambios conductuales y neuromotores que van más allá de la mortalidad o anomalías (Oliveira et al., 2021). Lo que convierte a este estudio en una herramienta novedosa para comprender mejor los efectos tóxicos del lisado de *Karenia selliformis* y aportar información útil al monitoreo de floraciones algales nocivas en Chile.

HIPOTESIS

El lisado de la cepa *Karenia selliformis* CREAN Ks_02 genera efectos neurotóxicos en los estadios tempranos de *Danio rerio*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto neurotóxico del lisado de la cepa Ks_02 de *Karenia selliformis* en embriones y larvas de *Danio rerio*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el LC50 de células lisadas de *Karenia selliformis* en estadios tempranos de *Danio rerio* (embriones y larvas tempranas).
2. Evaluar el movimiento espontaneo de la cola de los embriones expuestos a lisado de *Karenia selliformis* cepa CREAN_Ks02 en ciclos alternados de luz y oscuridad.
3. Evaluar la actividad locomotora de las larvas expuestas a lisado de *Karenia selliformis* cepa CREAN_Ks02 en ciclos alternados de luz y oscuridad en exposición crónica y aguda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de pez cebra y obtención de larvas

Los peces adultos de pez cebra tipo silvestre (TAB5 y AB) fueron mantenidos en un bioterio en una temperatura de 28°C, bajo el ciclo de iluminación de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad, con una conductividad de 500-700 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, pH entre 7,0 – 7,4 y con una alimentación de dos veces al día (en la mañana y en la tarde) de pellets micronizados de 500 μM (GEMMA Skretting). La obtención de las ovas, se realizó por medio de parideras ubicadas dentro de los estanques del bioterio, donde se encuentran los reproductores en relación de 1:2 (un macho: dos hembras). Las muestras fueron extraídas de la paridera y su contenido fue filtrado por un tamiz de 500 μM , seguido de un lavado con agua temperada del sistema, a fin de prevenir la inducción de un choque osmótico y térmico. Posteriormente, las ovas fueron depositadas en placas Petri con medio de cultivo E3 1X (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,33 mM; MgSO₄ 0,33 mM) suplementado con azul de metileno así evitar la contaminación en las ovas. La selección de las ovas se realizó basado en criterios de simetría, homogeneidad, y la presencia de un corion transparente sin deformaciones, ni residuos de materia orgánica adherida. Las placas se mantuvieron en una incubadora (VELP) configurada a una temperatura constante de $28 \pm 0,5$ °C y un fotoperiodo controlado de 14:10 horas (luz/oscuridad), donde permanecieron hasta su uso.

Mantenimiento de *Karenia selliformis*

La cepa *Karenia selliformis* CREAN_Ks02 fue aislada en el archipiélago de Guaitecas por el Dr. Jorge Mardones, y posteriormente, depositada en el Centro de Estudios de Algas Nocivas del Instituto de Fomento Pesquero (CREAN/IFOP). Posteriormente, la cepa fue mantenida en el Laboratorio de Biotoxinas Marinas de la Universidad de Concepción (LBTx-UdeC).

Los cultivos se mantuvieron en medio L1, el que fue preparado con agua de mar costera de Chile (36°31'S, 73°08'O), filtrada a 0,2 μm , esterilizada en autoclave y ajustada a una salinidad de 32 psu. Las condiciones de cultivo correspondieron a una temperatura de 17 °C, una irradiancia de 140 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad.

Obtención de células lisadas de *Karenia selliformis*

Siguiendo el protocolo descrito por Wang et al. (2019), se obtuvo el lisado celular de *Karenia selliformis* en fase exponencial desacelerada mediante un proceso de sonicación, precedido por una serie de pasos experimentales estandarizados. Se obtuvo una muestra de cultivo de 100 mL con una densidad celular no superior a 10.000 células*mL⁻¹. A partir de la muestra inicial se prepararon

diluciones seriadas con diferentes concentraciones, las cuales variaron según el objetivo experimental y la etapa biológica en evaluación. (Tabla 1)

Tabla 1: Resumen de rango de concentraciones, utilizadas en embriones y larvas dependiendo del objetivo a abordar.

Objetivo	Estadio	Concentraciones (Cél*mL⁻¹)
1 (LC50)	Embriones	10.000-5.000-2.500-1.250-625
1 (LC50)	Larvas (48 hpf)	80.000-60.000-40.000-20.000
2 (Neurotoxicidad)	Embriones	1.000-500-250-125
3 (Neurotoxicidad)	Larvas (48 hpf)	1.000-500-250-125

Una vez ajustados los volúmenes para cada concentración, las muestras se centrifugaron a 3.300g durante 10 minutos a 4 °C, con el fin de sedimentar las células y obtener el pellet. Posteriormente, cada pellet se resuspendió en 2 mL de solución E3, con el objetivo de equilibrar la salinidad del medio y prevenir choques osmóticos durante la exposición de embriones o larvas. El siguiente paso consistió en la disrupción mecánica de las células por sonicación, utilizando un disgregador ultrasónico. Se aplicaron pulsos en intervalos de 20 segundos, con un total de tres repeticiones (20×3). Las muestras se mantuvieron en un baño de hielo durante todo el procedimiento para evitar el sobrecalentamiento y la degradación térmica de los compuestos intracelulares. Finalmente, los lisados obtenidos fueron utilizados de inmediato para evitar la pérdida de actividad tóxica liberada o bien almacenados a 20 °C hasta su posterior uso.

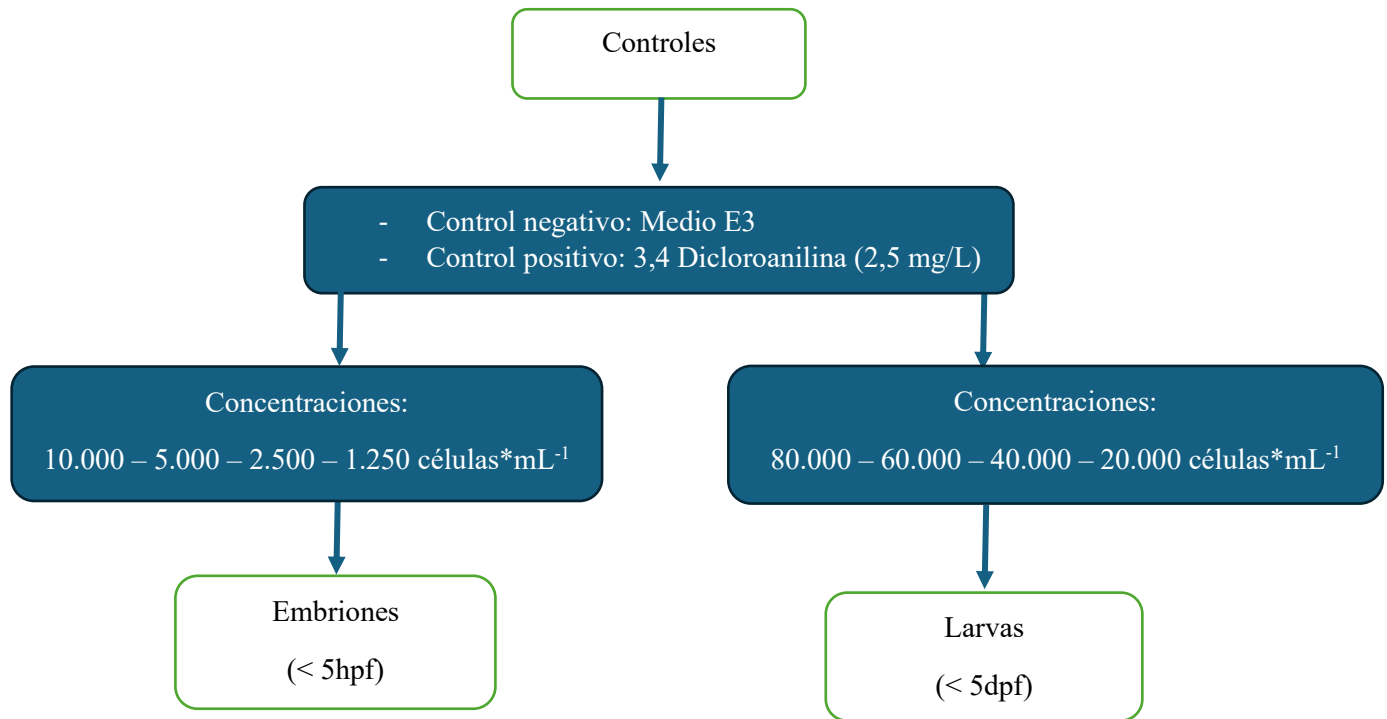
Control Positivo. El 3,4-dicloranilina (3,4-DCA) es un compuesto químico de la clase de las anilinas, caracterizado por la presencia de un grupo amino (-NH₂) enlazado a un núcleo aromático bencénico. Estudios como los de Von Hellfeld et al. (2020) han utilizado el 3,4-DCA en ensayos de toxicidad aguda, evaluando sus efectos adversos en embriones de peces, por lo que se sugiere como control positivo para evaluar toxicidad. En el caso de la evaluación de neurotoxicidad se utilizó como control positivo etanol (EtOH) dado que su efecto sobre el sistema nervioso de larvas de *Danio rerio* está ampliamente documentado (Cornet et al., 2017; Wen et al., 2008). A concentraciones en torno al 1,2 % v/v, el etanol provoca alteraciones conductuales características, como hiperactividad sostenida y pérdida de la respuesta normal a los ciclos de luz y oscuridad, lo que constituye un marcador confiable de disfunción neuronal (Pepe-Vargas et al., 2025).

Control negativo. El medio E3 se utiliza comúnmente como control negativo en bioensayos con pez cebra ya que, proporciona un entorno adecuado para el desarrollo de los embriones y larvas. Contiene nutrientes y sales que son esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de los embriones y larvas, lo que permite que se mantengan en condiciones óptimas durante el ensayo. También se incluyó la microalga *Dunaliella salina* porque es un organismo ampliamente reconocido por su inocuidad y por no producir toxinas que puedan generar efectos adversos en otros organismos. A diferencia de microalgas nocivas, *Dunaliella salina* se caracteriza principalmente por su capacidad de acumular altos niveles de β -caroteno y otros carotenoides, compuestos que cumplen un rol protector frente a condiciones de estrés y que actúan como antioxidantes naturales (Lamers et al., 2008).

Determinación del LC50 de células lisadas de *Karenia selliformis* en estadios tempranos de *Danio rerio*

Exposición en embriones y larvas.

Tanto para embriones como larvas se utilizaron 5 individuos por cada pocillo en una placa de 48 pocillos, después se agregaron las concentraciones seriadas de células lisadas con 3 réplicas cada una. Posterior a esto se incubó a 28 ± 0.5 °C con un fotoperiodo de 14:10 horas (Luz/Oscuridad), para luego ser monitoreadas a diferentes horas de exposición y así registrar mortalidad diaria y presencia de edemas.



Evaluación de mortalidad y edemas.

Con los resultados obtenidos se procedió a establecer el valor de LC50 (concentración letal media) mediante un análisis tipo sigmoideal/logístico (curva dosis-respuesta); modelo que permite estimar la concentración en el cual se produce el 50 % de mortalidad.

Evaluación de la neurotoxicidad en embriones y larvas de *Danio rerio* expuestos a células lisadas de *Karenia selliformis*.

En embriones de pez cebra, la neurotoxicidad se evaluó mediante el ensayo de enrollamiento espontáneo de la cola. Este movimiento se observa a partir de las 17 horas post-fecundación (hpf), y alcanza su máxima frecuencia alrededor de las 19 hpf; posteriormente disminuye de manera gradual. Se trata de un patrón motor generado por la actividad espontánea de redes neuronales en la médula espinal en formación, por lo que cambios en su frecuencia o amplitud constituyen indicadores sensibles de alteraciones neurotóxicas (Saint-Amant et al., 1998; Oliveira et al., 2021). En este estudio, los embriones expuestos al lisado de *Karenia selliformis* fueron analizados bajo este criterio, permitiendo detectar la neurotoxicidad en embriones en ciclos alternados de luz y oscuridad.

En larvas de pez cebra, la neurotoxicidad se midió a través de un ensayo de actividad locomotora basado en la exposición a ciclos alternados de luz y oscuridad. Este método se fundamenta en la respuesta fotomotora natural de las larvas de *Danio rerio*, caracterizada por una mayor movilidad

en condiciones de oscuridad y una reducción de la actividad durante la luz, lo que refleja un comportamiento circadiano innato. La alteración de este patrón, en presencia de compuestos tóxicos, constituye un biomarcador confiable de disfunción neuromotora (Selderslaghs et al., 2013; Manohar et al., 2019).

Evaluación de neurotoxicidad en embriones.

Para esta evaluación, se utilizaron concentraciones subletales del lisado de *Karenia selliformis* cepa CREAN Ks_02, determinadas previamente en el Objetivo 1. Las concentraciones seleccionadas fueron: 1.000, 500, 250 y 125 células*mL⁻¹. Cada tratamiento fue dispuesto en placas de 48 pocillos, utilizando 15 embriones por concentración, distribuidos en tres réplicas (5 embriones por pocillo). Tras 24 horas de exposición, se seleccionaron 12 embriones por tratamiento y se transfirieron a una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo curvo, con un volumen de 100 µL de medio E3 por pocillo (un embrión por pocillo). Esta placa fue analizada en el equipo wMicroTracker para registrar el movimiento espontáneo de la cola de los embriones durante 60 minutos, incluyendo un periodo de acondicionamiento de 20 minutos y tres ciclos de luz/oscuridad.

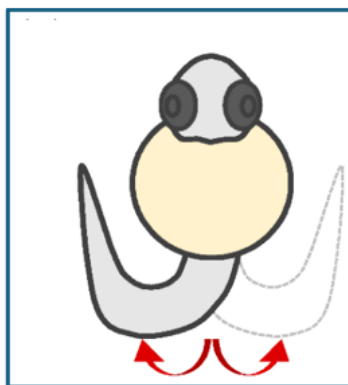


Figura 3: Actividad de enrollamiento de la cola en embriones de pez cebra. En el dibujo se muestra las direcciones de movimiento que tendrá la cola del pez. Tomada y editada de Oliveira et al., (2021).

Evaluación de neurotoxicidad en larvas.

Para evaluar los efectos neurotóxicos en larvas de pez cebra, se utilizó una metodología basada en la descrita por Manohar et al. (2019), que consiste en analizar la respuesta locomotora de las larvas frente a estímulos de luz/oscuridad. El protocolo contempló el uso de tres ciclos alternados de luz/oscuridad de 10 minutos cada uno, monitoreando la actividad locomotora mediante el equipo wMicroTracker (Phylum Tech), el cual permite registrar patrones de movimiento en tiempo real.

Experimento exposición crónica: En estos experimentos se utilizaron larvas eclosionadas desde embriones previamente expuestos al lisado de *K. selliformis* ($8.030 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$) desde 3 hpf post fecundación manteniéndose la exposición con recambios diarios de los lisados hasta las 96 hpf. Se aseguró que al momento de la evaluación las larvas presentaran la vejiga natatoria inflada completamente.

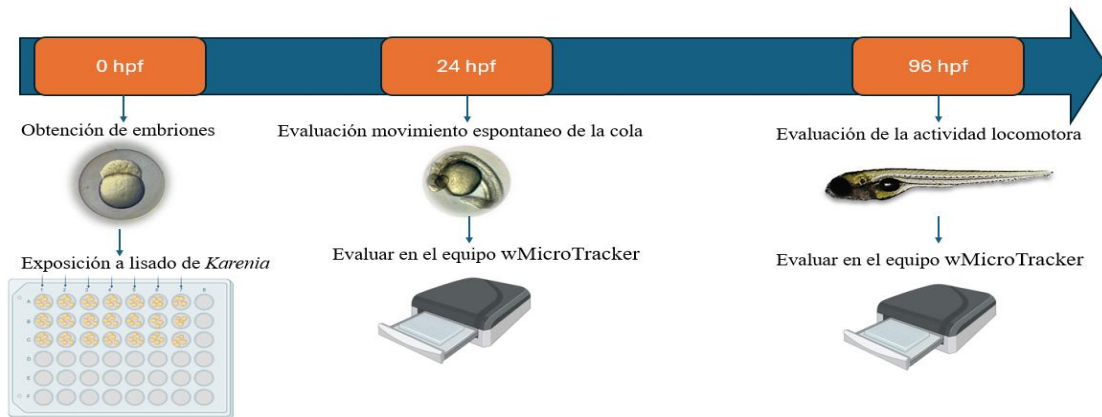


Figura 4: Secuencia metodológica del experimento de exposición crónica. A las 0 hpf se inició la exposición de los embriones al lisado de *Karenia*. A las 24 hpf se evaluó el movimiento espontáneo de la cola en embriones, mientras que a las 96 hpf se evaluó la actividad locomotora en larvas, utilizando el equipo wMicroTracker.

Experimento de exposición aguda: En estos experimentos se utilizaron larvas eclosionadas desde embriones incubados en medio E3. A las 72 hpf, se inicia la exposición al lisado de *K. selliformis* utilizando las mismas concentraciones subletales previamente establecidas para embriones.

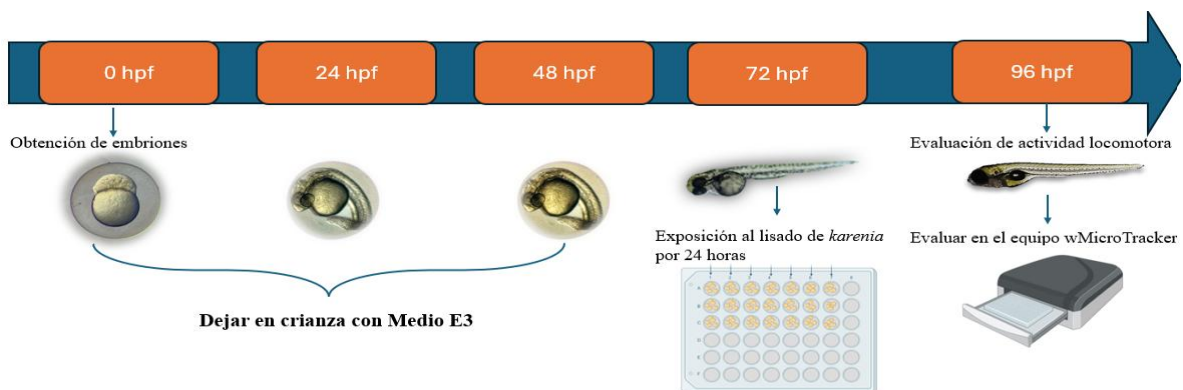


Figura 5: Diagrama de secuencia metodológica de experimento de exposición aguda de larvas de 72hpf. Todo el desarrollo embrionario ocurrió en medio E3, posterior a la eclosión fueron expuestas por 24h a distintas concentraciones de lisado de *Karenia*.

En ambos tipos de experimentos se utilizaron placas de 48 pocillos, con 15 larvas por tratamiento, distribuidas en tres réplicas (5 larvas por pocillo). A las 96 hpf, se seleccionaron al azar 12 larvas por tratamiento y se transfirieron individualmente a pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo liso, conteniendo 100 μ L de E3. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación del comportamiento locomotor durante un periodo de 60 minutos, incluyendo 20 minutos de acondicionamiento y tres ciclos alternados de luz/oscuridad.

Análisis de datos

Para evaluar la acción del lisado de *K. selliformis*, se registraron inicialmente el % de malformaciones en embriones y mortalidad en embriones y larvas de *Danio rerio*. A partir de estos datos, se trazó la curva de dosis-respuesta en el software GraphPad Prism, lo que nos proporcionó la LC50. También se calculó el EC20 utilizando la presencia de edemas para definir un nivel seguro de exposición. Esta concentración más baja se probó posteriormente en experimentos de neurotoxicidad.

Para los ensayos de comportamiento, los datos obtenidos mediante el dispositivo wMicroTracker fueron exportados a GraphPad Prism para su análisis estadístico. En los embriones se evaluó la frecuencia y movimiento espontáneo de la cola en periodos alternados de luz y oscuridad, mientras que en las larvas se analizó la actividad locomotora registrada durante los períodos de luz y oscuridad. Antes de realizar las comparaciones entre tratamientos, se verificaron los supuestos estadísticos mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas. Cuando los datos cumplieron estos criterios, se aplicó un ANOVA, seguido de la prueba post-hoc para determinar diferencias significativas entre los grupos. En los casos en que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad u homogeneidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn, contrastando cada tratamiento con el control negativo (medio E3).

RESULTADOS

Determinación de la toxicidad del control positivo 3,4 Dicloroanilina

Los resultados del bioensayo con embriones y larvas de *Danio rerio* expuestos a 3,4-dicloroanilina (DCA) mostraron un incremento en los edemas pericárdicos y del saco vitelino en los rangos de concentración de 2 mg*L⁻¹ y 3 mg*L⁻¹ de 3,4 DCA (Figura 6B). Por otra parte, a concentraciones de 4 mg*L⁻¹ y 5 mg*L⁻¹, todos los embriones murieron a las 48 horas post fecundación, mientras que aquellos expuestos al medio E3 sobrevivieron durante todo el bioensayo. En las larvas de pez cebra expuestas al 3,4 DCA a 72 hpf también se tuvo como resultado edemas pericárdicos y vitelino en concentraciones de 2 mg*L⁻¹ y 3 mg*L⁻¹ (Figura 7). Sobre la base de estos resultados se definió utilizar 2,5 mg*L⁻¹ de 3,4-dicloroanilina como control positivo, dado que a esta concentración se observan efectos tóxicos claros, como edemas pericárdicos y del saco vitelino, sin inducir una alta mortalidad antes de las 48 hpf. Los resultados obtenidos con el control positivo 3,4-DCA concuerdan con lo reportado por Von Hellfeld et al. (2020), quienes describieron efectos adversos como edemas y mortalidad embrionaria a concentraciones similares en *Danio rerio*.

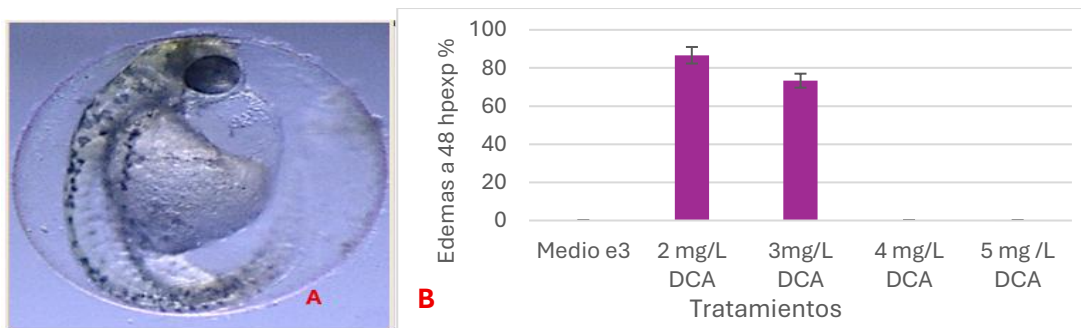


Figura 6: A. Embrión de *Danio rerio* de 48 hpf expuesto a 3,4 dicloroanilina que presenta edema pericárdico. B. Proporción de embriones expuestos a diferentes concentraciones de 3,4 DCA que generaron edemas.

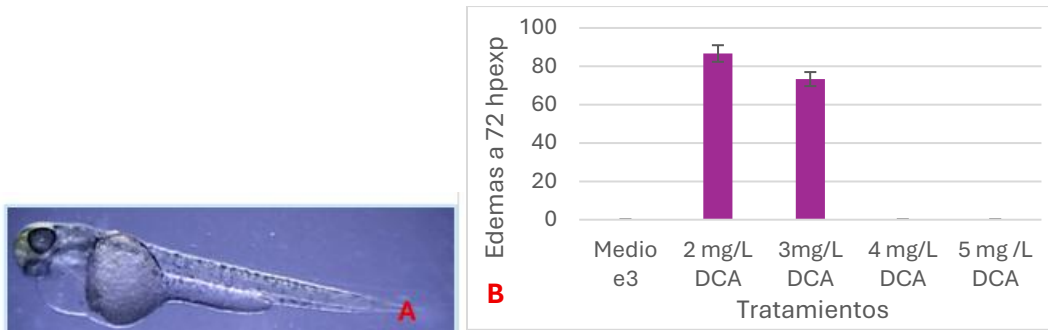


Figura 7: A. Larva de *Danio rerio* de 72 hpf expuesta a 3,4 DCA que presenta edema pericárdico y vitelino. B. Proporción de las larvas expuestas a diferentes concentraciones de 3,4 DCA que generaron edemas.

Determinación del LC₅₀ del lisado de *Karenia selliformis* cepa Ks_02

Para determinar el valor de LC₅₀ se llevaron a cabo nueve pruebas experimentales. Sin embargo, solo cuatro de ellas fueron elegibles para el análisis, ya que las otras pruebas no tuvieron calidad satisfactoria debido a variaciones técnicas o biológicas. Considerando el total de los datos se estimó que el valor de LC₅₀ fue de 5.312 células*mL⁻¹ para embriones (Figura 8) y de 15.000 células*mL⁻¹ para larvas (Figura 10).

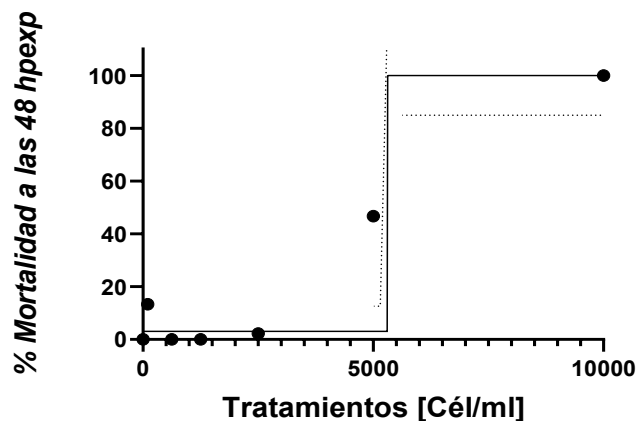


Figura 8: Porcentaje de mortalidad de embriones de pez cebra expuestos a concentraciones crecientes de lisado de la cepa Ks_02.

El registro de la presencia de edemas embrionarios mostró una concentración efectiva del 50% (EC₅₀) de 1.648 células*mL⁻¹, lo cual permitió establecer un umbral subletal por debajo de 1.000 células*mL⁻¹ para posteriores bioensayos neuroconductuales.

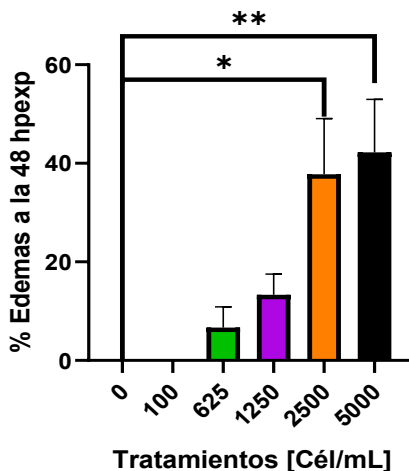


Figura 9: Porcentaje de embriones de *Danio rerio* de 48hpf con la presencia de edemas luego de 24h de exposición al lisado. La concentración de 0 cél/mL corresponde a Medio E3. *p < 0,05 y ** p <0,01.

La figura 10 presenta la relación entre la concentración del lisado de la cepa Ks_02 y el porcentaje de mortalidad en larvas de 4 días post fecundación (dpf)

Tras 48 horas de exposición. En este grafico se ilustra el efecto dosis-respuesta, evidenciando como el aumento en la concentración celular se asocia con cambios en la mortalidad de las larvas, lo que permite evaluar el potencial tóxico del tratamiento y estimar parámetros como la concentración letal media (LC50)

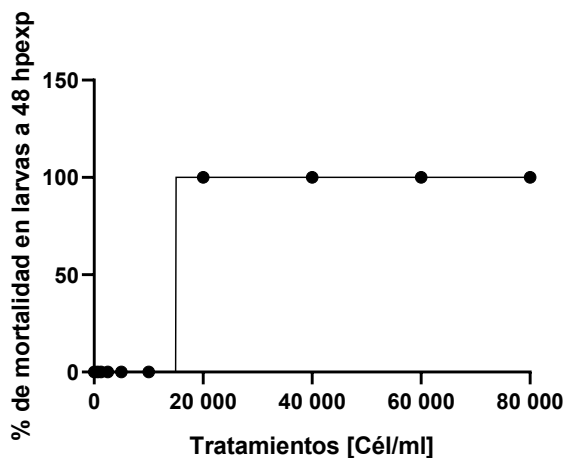


Figura 10: LC50 en larvas de 4 dpf expuestas por 48 horas al lisado de la cepa Ks_02.

Determinación de la neurotoxicidad del lisado de *Karenia selliformis* cepa Ks_02 en estadios temprano del *Danio rerio*.

Embriones (24 horas post fecundación)

En total para alcanzar este objetivo se realizaron tres experimentos. El primero y el segundo se llevaron a cabo con un batch de *Karenia* de una densidad de $8.300 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se hicieron con controles negativos E3 y control positivo de 3,4-dicloroanilina. En el tercer experimento, se incluyó un control negativo adicional: *Dunaliella*, una microalga no tóxica, sometida a los mismos pasos que el lisado de *Karenia*. Además, se modificó el control positivo (etanol) dado que se sabe que el etanol es neurotóxico. También, cabe señalar que el batch de *Karenia* utilizado en este tercer ensayo no era el mismo que en los dos anteriores ($8.083 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$). Dado que los tres experimentos mostraron las mismas tendencias se incluyen solo los resultados del último experimento.

Para caracterizar el efecto del lisado celular en los embriones se cuantificó el movimiento espontáneo de la cola por 20 minutos en oscuridad. Se observó que los embriones expuestos a las concentraciones más altas del lisado (500 y $1000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$) aumentaron de manera significativa su actividad, alcanzando valores similares al control positivo (Figura 11). Este resultado indica un claro patrón de hiperactividad asociado a la presencia del lisado, en contraste a los embriones mantenidos en el medio E3. Estos hallazgos muestran que los compuestos presentes en el lisado de *K. selliformis* inducen una respuesta del tipo excitatoria.

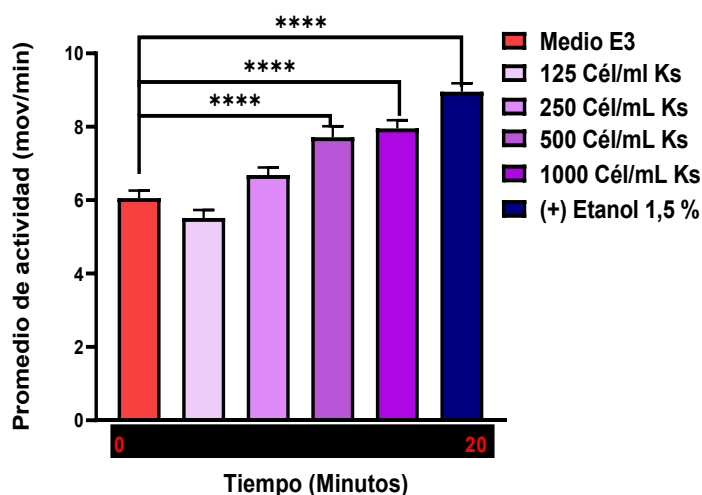


Figura 11: Promedio de movimiento espontáneo de la cola en embriones de *Danio rerio* expuestos por 24 horas al lisado de *Karenia selliformis*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas $p < 0,0001$ (****).

En estos resultados se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados. El control negativo (Medio E3) mostró una marcada diferencia respecto a las concentraciones más altas del lisado de *Karenia selliformis* (500 y 1000 células*mL⁻¹) y frente al control positivo con etanol. Asimismo, la concentración de 125 células*mL⁻¹ presentó una diferencia significativa en comparación con la concentración de 250 células*mL⁻¹, y altamente significativa frente a 500 células*mL⁻¹ y el etanol. Por su parte, la concentración de 250 células*mL⁻¹ difirió significativamente de 500 células*mL⁻¹ y de manera altamente significativa del etanol. Finalmente, la concentración de 500 células*mL⁻¹ mostró una diferencia significativa en relación con el control positivo. En resumen, los resultados del movimiento espontaneo de la cola muestran que las concentraciones más altas del lisado (500 y 1000 células*mL⁻¹) inducen un aumento significativo en el movimiento, alcanzando valores cercanos al control positivo, mientras que las concentraciones bajas no difirieron del control E3, indicando un efecto neurotóxico excitatorio dependiente de la concentración.

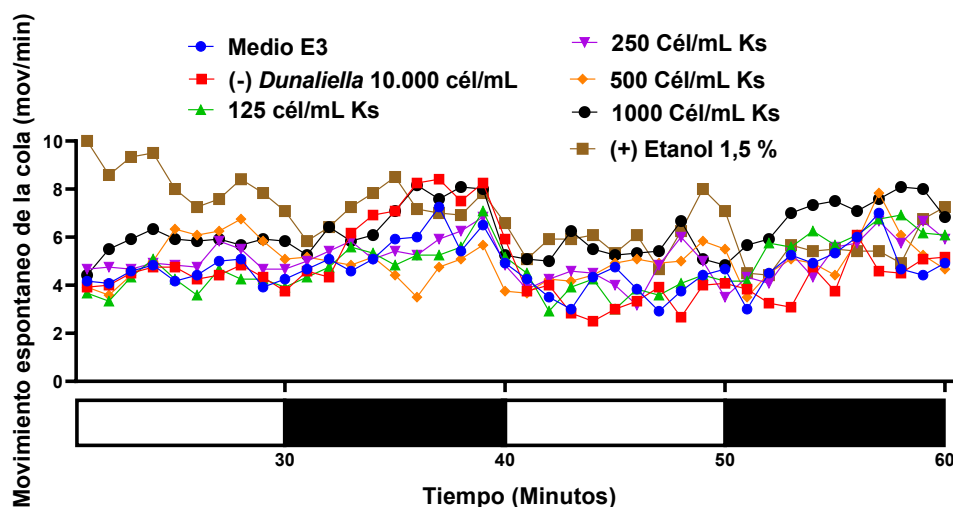


Figura 12: Movimiento espontáneo de la cola en embriones de *Danio rerio* de 24 hpf expuestos durante 60 minutos a concentraciones subletales del lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células*mL⁻¹), comparados con controles negativos (Medio E3 y *Dunaliella salina*) y positivo (Etanol 1,5 %). El registro se realizó en el equipo wMicroTracker bajo cuatro ciclos alternados de luz (barra blanca) y oscuridad (barra negra).

La Figura 12 muestra la evolución temporal de 60 min del movimiento espontáneo de la cola en embriones de *Danio rerio* expuestos a concentraciones subletales del lisado de *Karenia selliformis* durante ciclos alternados de luz y oscuridad que van cambiando a cada 10 minutos. En los controles

negativos (Medio E3 y *Dunaliella salina*) se observó un patrón típico, con menor actividad durante los periodos de luz y un aumento al inicio de la oscuridad, lo que refleja la respuesta fotomotora normal. En contraste, los embriones expuestos a concentraciones altas del lisado como 1.000 células*mL⁻¹ presentó una hiperactividad sostenida, tanto en luz como en oscuridad, alcanzando valores cercanos al control positivo con etanol. Esta alteración se evidenció de manera más clara en los momentos de transición. Cuando se apagaba la luz, los controles mostraron un incremento notorio en la actividad, mientras que los embriones tratados mantuvieron niveles elevados sin cambios marcados entre fases. A bajas concentraciones (125, 250 y 500 células*mL⁻¹), la respuesta fue más similar a los controles negativos, sin diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que el lisado de la cepa Ks_02 interfiere con la modulación normal (los embriones se ajustan o regulan su nivel de movimiento en respuesta a estímulo externo) de la actividad frente a cambios de luz/oscuridad, lo que se refleja en una hiperactividad dependiente de la dosis. Para confirmar esta tendencia, la Figura 13 presenta el análisis del promedio total de actividad, permitiendo comparar de manera estadística las diferencias entre tratamientos.

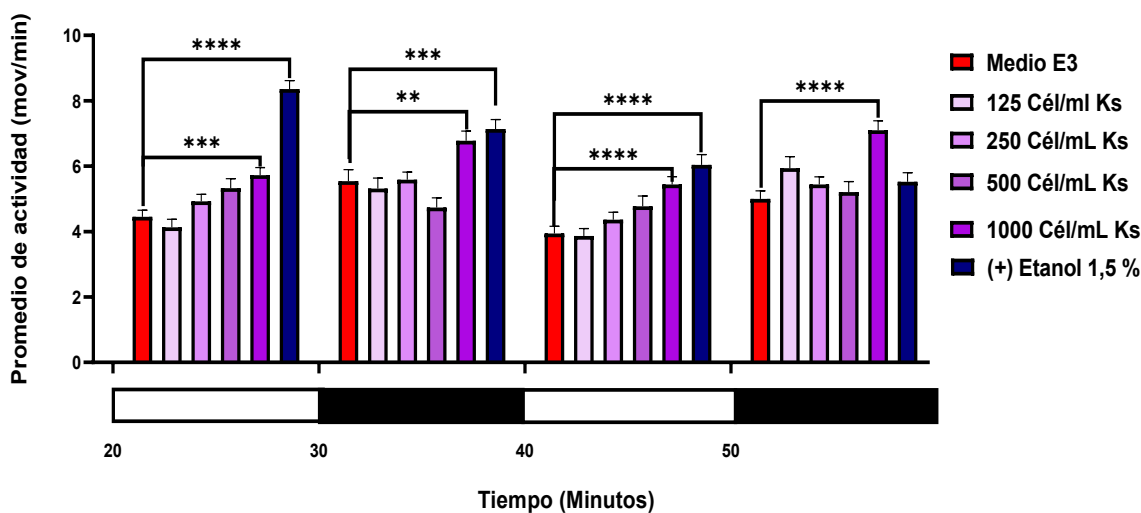


Figura 13: Promedio de movimiento espontáneo de la cola en embriones de *Danio rerio* de 24 hpf expuestos al lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células*mL⁻¹) durante ciclos alternados de luz y oscuridad. Se incluyen controles negativos (Medio E3) y positivo (Etanol 1,5 %). Los asteriscos en la figura representan las diferencias estadísticas significativas, entre los tratamientos de la cepa y el control negativo (Medio E3). **** p< 0,0001; ***p<0,001, **p< 0,01.

Al medir la actividad como el promedio del movimiento en ciclos alternados de luz y oscuridad (Figura 13); se puede observar que los controles negativos (Medio E3 y *Dunaliella salina*)

mantuvieron un patrón típico, caracterizado por una menor actividad durante la luz y un incremento en la oscuridad. En contraste, los embriones expuestos a la concentración más alta del lisado 1.000 células*mL⁻¹ mostraron un aumento significativo de la actividad en ambos periodos, alcanzando valores comparables al control positivo con etanol, lo que indica un efecto excitatorio sobre el sistema neuromotor. A concentraciones bajas (125, 250 y 500 células*mL⁻¹), la respuesta no difirió significativamente del medio E3, sugiriendo que el efecto neurotóxico del lisado es dependiente de la dosis. Estos resultados evidencian que la presencia del lisado altera la respuesta conductual normal de los embriones a los cambios de luz/oscuridad, constituyendo un indicador claro de neurotoxicidad.

Larvas de 96 horas post fecundación en exposición crónica

Para larvas también se realizaron tres experimentos tanto para exposición crónica; en el último experimento se agregó control negativo lisado de *Dunaniella* y el control positivo etanol. En la Figura 14, se observa que, tras la exposición crónica, las larvas presentaron diferencias claras en su actividad motora según la concentración del lisado. A bajas concentraciones (125 y 250 células*mL⁻¹), la actividad fue menor que en el control negativo, mientras que a concentraciones más altas como 500 células*mL⁻¹, tuvo una actividad más alta que el control, pero sin tener diferencias estadísticamente significativas. En cambio, la concentración de 1.000 células*mL⁻¹ y el etanol si hubo una diferencia significativa. Estos resultados indican que el lisado induce una hiperactividad locomotora a dosis más elevadas, lo que apunta a un impacto neurotóxico dependiente de la concentración.

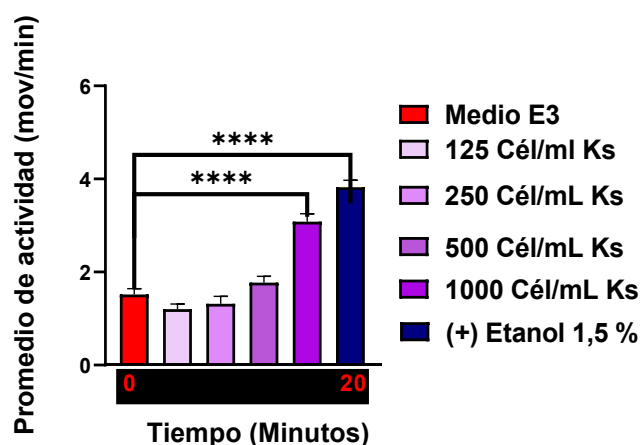


Figura 14: Actividad locomotora de larvas de *Danio rerio* de 96 hpf expuestas crónicamente al lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células*mL⁻¹), en oscuridad. Se incluyen controles negativos (Medio E3) y positivo (Etanol 1,5%). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (****p < 0,0001).

Por otra parte, en la figura 15 se observa que las larvas responden de manera distinta según la concentración del lisado. A concentraciones bajas (125 y 250 células*mL⁻¹), la actividad locomotora se mantuvo similar al control E3, con ligeras variaciones. Sin embargo, a concentraciones más altas (500 y sobre todo 1000 células*mL⁻¹) se evidenció un aumento marcado de la actividad motora durante los períodos de estimulación con luz/oscuridad, mostrando un patrón de hiperactividad. El control positivo con etanol también presentó altos niveles de movimiento, confirmando que la respuesta observada está asociada a un efecto estimulante sobre el sistema nervioso.

La figura 16 muestra que las larvas respondieron de manera distinta dependiendo tanto de la concentración del lisado como del estímulo de luz/oscuridad.

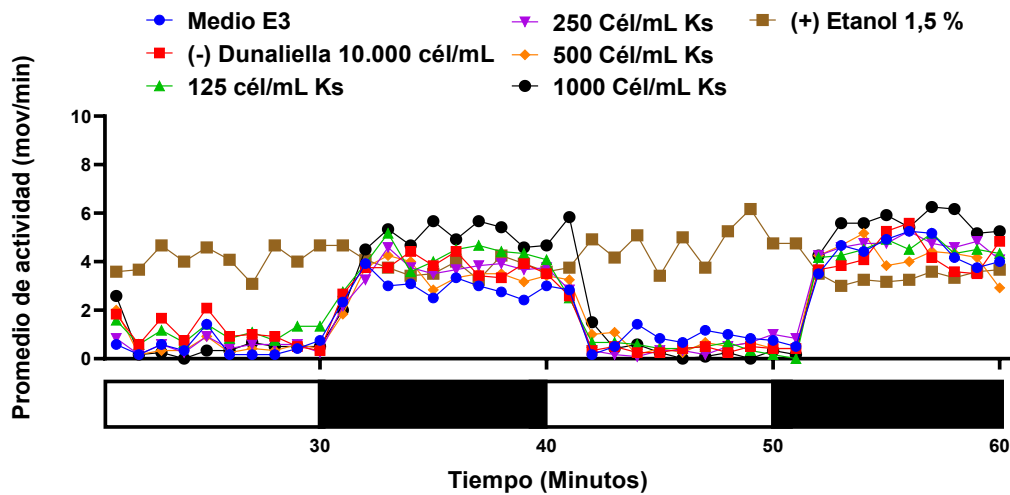


Figura 15: Promedio de la actividad locomotora de larvas de *Danio rerio* de 96 hpf expuestas crónicamente al lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células*mL⁻¹) durante 60 minutos en ciclos alternados de luz (barra blanca) y oscuridad (barra negra). Se incluyen controles negativos (Medio E3 y *Dunaliella*) y positivo (Etanol 1,5%).

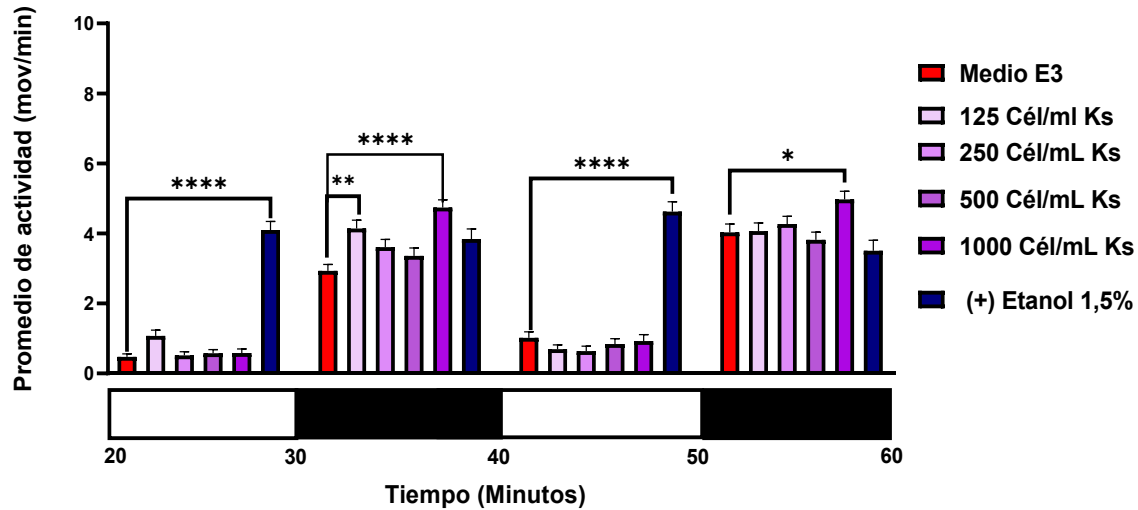


Figura 16: Promedio de la actividad locomotora en larvas de *Danio rerio* de 96 hpf expuestas crónicamente al lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células* mL^{-1}) durante 60 minutos en ciclos alternados de luz y oscuridad. Se incluyen controles negativos (Medio E3) y positivo (Etanol 1,5 %). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Durante los periodos de luz, la actividad locomotora fue baja en todos los grupos solo habiendo una diferencia significativa entre el medio E3 y etanol ($p < (0,0001)$). En los periodos de oscuridad, en cambio, las larvas expuestas a la concentración más altas mostraron un aumento significativo en comparación del medio E3; tanto en el primer ($p < 0,0001$) como segundo ciclo de oscuridad ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la exposición crónica al lisado puede inducir hiperactividad locomotora dependiente de la dosis, especialmente bajo condiciones de oscuridad.

Evaluación de la neurotoxicidad en larvas en exposición aguda (96 hpf).

En este experimento los embriones fueron mantenidos en medio E3 y luego de la eclosión las larvas fueron expuestas por 24h al lisado (Figura 5). Durante el periodo inicial de acondicionamiento, se observó que las larvas expuestas a bajas concentraciones del lisado (125 y 250 células* mL^{-1}) mostraron un leve incremento en su actividad en comparación con el control E3. En contraste, a concentraciones más altas (500 y 1000 células* mL^{-1}), la actividad locomotora disminuyó notablemente, quedando por debajo incluso del control positivo etanol.

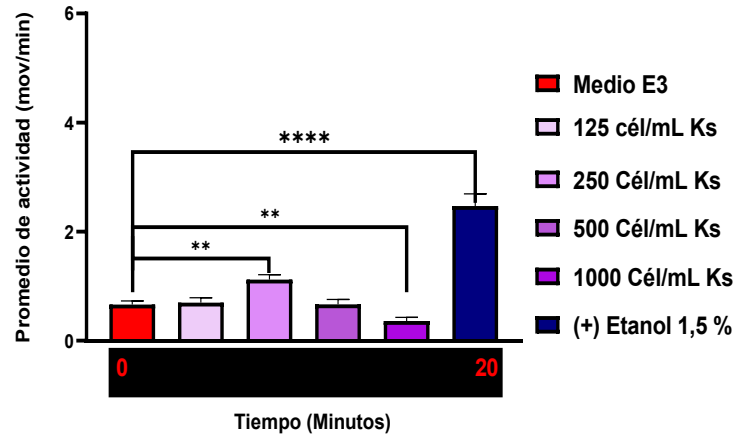


Figura 17: Promedio de actividad en larvas de *Danio rerio* de 96 hpf expuestas agudamente al lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células* mL^{-1}). Se incluyen controles negativos (Medio E3) y positivo (Etanol 1,5%). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas únicamente en la comparación de cada tratamiento con el control E3. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Este patrón indica que la exposición aguda al lisado genera respuestas diferenciadas según la dosis. Mientras las concentraciones bajas parecen estimular el movimiento, las más elevadas provocan una inhibición significativa de la actividad motora, lo que apunta a un posible efecto neurotóxico temprano. Estos resultados indican que las larvas en exposición aguda al lisado respondieron de manera distinta a aquellas con exposición temprana.

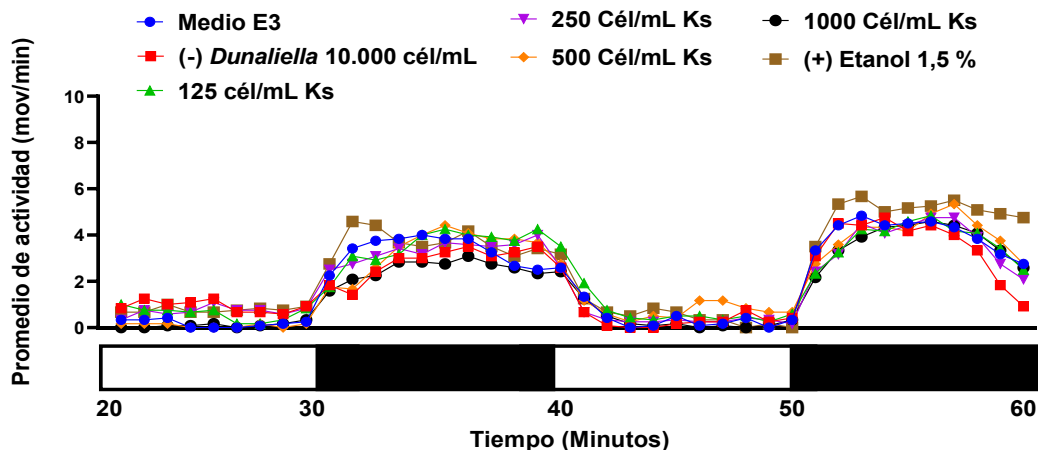


Figura 18: Promedio de la actividad locomotora de larvas de *Danio rerio* de 96 hpf expuestas agudamente al lisado de *Karenia selliformis* (125, 250, 500 y 1000 células* mL^{-1}) durante

60 minutos en ciclos alternados de luz (barra blanca) y oscuridad (barra negra). Se incluyen controles negativos (Medio E3 y *Dunaliella*) y positivo (Etanol 1,5%).

Durante los minutos 20-30, las concentraciones bajas (125 y 250 células*mL⁻¹) mostraron un leve aumento en la actividad en comparación con el control (-), mientras que las concentraciones altas (500 y 1000 células*mL⁻¹) mantuvieron valores más bajos. En los siguientes ciclos, la actividad tendió a estabilizarse, sin grandes diferencias entre los tratamientos y el control (+). Sin embargo, hacia en el segundo ciclo de oscuridad (50 - 60 min), se observó un incremento significativo en la actividad en el grupo tratado con etanol (control positivo), lo que refuerza la sensibilidad del ensayo para detectar cambios en el comportamiento. Esto indica que la exposición aguda al lisado puede provocar efectos sutiles y dependientes de la concentración, con cierta estimulación a bajas dosis y un efecto más inhibitor a dosis elevadas.

La Figura 19 muestra la actividad locomotora promedio de larvas de *Danio rerio* expuestas agudamente al lisado de *Karenia selliformis* en ciclos alternados de luz y oscuridad. Se puede observar que casi no hubo diferencias significativas entre tratamiento excepto en el primer ciclo de luz donde se registraron diferencias significativas entre el control negativo y la concentración de 250 células*mL⁻¹. Estos resultados sugieren que la exposición aguda al lisado puede inducir efectos neuroconductuales transitorios en las larvas, ya que muestra una alteración en la actividad solo por un periodo breve de tiempo, sin que esa alteración se mantenga en el tiempo de forma prolongada o permanente.

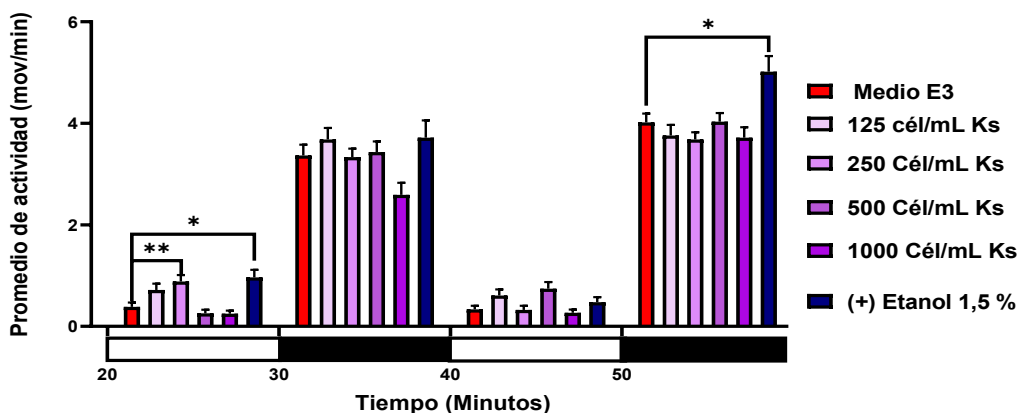


Figura 19: Promedio de la actividad locomotora en larvas de *Danio rerio* de 96 hpf expuestas agudamente al lisado de *Karenia selliformis*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas únicamente en la comparación de cada tratamiento con el control E3. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el lisado de *Karenia selliformis* cepa CREAN Ks_02 ejerce una toxicidad significativa en estadios tempranos de *Danio rerio*. Se estimó un LC_{50} de $5.312 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ para embriones y de $15.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ para larvas, evidenciando que las etapas más tempranas del desarrollo son más sensibles a la acción del lisado. Estos valores concuerdan con lo descrito por Mardones et al. (2020) y Aballay-González et al. (2025), quienes demostraron la citotoxicidad de esta cepa en cultivos celulares, asociada a la producción de metabolitos intracelulares no caracterizados que inducen a la excitotoxicidad. Sin embargo, mientras en células el efecto se limita a respuestas bioquímicas específicas, en organismos completos como *Danio rerio* se observa un espectro más amplio de consecuencias, desde mortalidad hasta alteraciones conductuales, lo que resalta el valor del pez cebra como modelo más sensible y ecológicamente relevante.

Las concentraciones que produjeron mortalidad y efectos subletales en este estudio se encuentran dentro del rango documentado en floraciones naturales de *Karenia* en Chile ($>10.000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$ Clément et al., 2001), lo que refuerza la pertinencia ambiental de los resultados. Estos hallazgos confirman que la cepa CREAN Ks_02 representa un riesgo real para peces nativos y especies de importancia acuícola expuestas a FANs intensas.

La inclusión de controles adecuados permitió validar los resultados obtenidos. La 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) provocó efectos adversos conocidos en embriones de *Danio rerio*, como edemas y malformaciones, confirmando su utilidad como control positivo de toxicidad (Von Hellfeld et al., 2020). El etanol, empleado como control positivo de neurotoxicidad, indujo hiperactividad sostenida y pérdida de la respuesta al ciclo luz/oscuridad, en concordancia con lo descrito en la literatura (Wen et al., 2008; Cornet et al., 2017; Pepe-Vargas et al., 2025). *Dunaliella salina*, utilizada como control biológico, no generó alteraciones en embriones ni larvas, lo que reafirma su inocuidad y permite descartar que los efectos se deban al procedimiento de lisado (Lamers et al., 2008). Finalmente, el medio E3 actuó como control negativo confiable, garantizando condiciones óptimas para el desarrollo normal de embriones y larvas (Westerfield, 2000; Selderslaghs et al., 2013).

En relación con los edemas observados en embriones, se obtuvo un EC_{50} de $1.648 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, con formación de edemas pericárdicos y vitelinos como biomarcadores tempranos de toxicidad embrionaria. Estos resultados concuerdan con los descritos por Wang et al. (2019) en embriones de pez cebra expuestos a lisados de *Karenia mikimotoi* de $1.6 \cdot 10^5 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, donde se reportaron coagulación, retraso en el desarrollo, edema del saco vitelino y deformaciones de la cola. La similitud en los biomarcadores entre especies distintas de *Karenia* sugiere mecanismos comunes de toxicidad,

posiblemente asociados a metabolitos intracelulares que afectan procesos de osmorregulación y desarrollo cardíaco. No obstante, en este trabajo los edemas se manifestaron con mayor claridad, lo que refuerza la hipótesis de que la cepa chilena CREAN Ks_02 posee un efecto particularmente potente sobre la fisiología embrionaria.

En cuanto a la neurotoxicidad en embriones, se observó un aumento significativo en la frecuencia del movimiento espontáneo de la cola a concentraciones altas (500–1.000 células*mL⁻¹), alcanzando niveles similares al control positivo (etanol). Este efecto excitatorio concuerda con lo descrito por Aballay et al. (2025), quienes evidenciaron excitotoxicidad en cultivos neuronales expuestos al exudado de CREAN Ks_02, atribuida a la activación de canales de sodio dependientes de voltaje. De esta forma, nuestros resultados in vivo respaldan los hallazgos in vitro, mostrando que los compuestos presentes en el lisado inducen hiperactividad neuronal en estadios tempranos del pez cebra.

En larvas de 96 hpf, los resultados evidenciaron un patrón neurotóxico dependiente de la concentración y del régimen de exposición. En la exposición crónica, bajas concentraciones (125–250 células*mL⁻¹) redujeron la actividad locomotora, mientras que dosis más elevadas (500–1.000 células*mL⁻¹) provocaron hiperactividad, alcanzando valores cercanos al control positivo. Este patrón bifásico indica que la toxicidad del lisado modula la plasticidad neuromotora y altera la respuesta típica a los ciclos de luz/oscuridad. En contraste, en la exposición aguda se observó que las concentraciones bajas tendieron a estimular levemente la locomoción, mientras que las concentraciones altas provocaron una inhibición significativa, reflejando un efecto inhibitor sostenido. Estas diferencias resaltan la importancia del tiempo de exposición en la manifestación de la neurotoxicidad. A nivel interespecífico, Liu et al. (2023) reportaron que la exposición directa e indirecta a *K. selliformis* redujo significativamente la velocidad de nado en *Oryzias melastigma*, además de incrementar eventos de congelación, lo que sugiere un impacto neuromuscular similar al observado en nuestro modelo.

La comparación entre ensayos en células y en organismos completos revela una diferencia clave: los modelos celulares permiten identificar mecanismos moleculares específicos (ej. excitotoxicidad mediada por canales iónicos), pero carecen de la complejidad de un organismo vivo. En *Danio rerio*, los efectos del lisado se manifestaron en alteraciones neuroconductuales dinámicas (hiperactividad e hipoactividad), que integran la acción de múltiples redes neuronales, neurotransmisores y circuitos motores. Por ello, medir neurotoxicidad en animales completos no solo valida los resultados celulares, sino que amplía la comprensión del riesgo ecotoxicológico real.

Es importante destacar que la cepa CREAN Ks_02 no solo ejerce toxicidad en peces, sino también efectos alelopáticos sobre otras microalgas. Alfaro et al. (2024) demostraron que los exudados de esta

cepa inhiben el crecimiento y la fotosíntesis de especies fitoplanctónicas, además de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno. Esta doble acción ictiotóxica y alelopática potencia el impacto ecológico de las floraciones, alterando no solo la supervivencia de peces y organismos superiores, sino también la estructura y dinámica de las comunidades fitoplanctónicas. En consecuencia, CREAN Ks_02 puede modificar la red trófica y favorecer su propia dominancia en el ecosistema.

En este contexto, el pez cebrá se confirma como un modelo sensible y robusto para la evaluación de toxicidad y neurotoxicidad de microalgas nocivas. Su capacidad para detectar efectos subletales y neuroconductuales, que no serían evidentes en otros modelos, lo convierte en una herramienta clave para el monitoreo ecotoxicológico de floraciones algales nocivas y para la identificación temprana de riesgos en ecosistemas marinos (Selderslaghs et al., 2013; Manohar et al., 2019).

En conjunto, nuestros resultados confirman que el lisado de *K. selliformis* CREAN Ks_02 ejerce efectos neurotóxicos y citotóxicos complejos, dependientes de la concentración y del régimen de exposición, en estadios tempranos de *Danio rerio*. Además, complementan los hallazgos in vitro de Mardones et al. (2020); Aballay et al. (2025), validan la presencia de biomarcadores descritos por Wang et al (2019). Este conjunto de evidencias refuerza el rol del pez cebrá como un modelo robusto para comprender y anticipar los impactos de floraciones nocivas de *Karenia* en ecosistemas marinos y en la acuicultura.

Finalmente, los resultados obtenidos respaldan y permiten afirmar que la hipótesis planteada en este estudio se acepta. El lisado de la cepa CREAN Ks_02 de *Karenia selliformis* generó efectos neurotóxicos claros en estadios tempranos de *Danio rerio*, tanto a nivel de mortalidad como de alteraciones conductuales (hiperactividad e hipoactividad), confirmando que los metabolitos liberados por esta cepa tienen un fuerte potencial para alterar el desarrollo neuromotor en organismos acuáticos.

CONCLUSIONES

1. El lisado de la cepa CREAN Ks_02 de *Karenia selliformis* tiene un fuerte potencial tóxico y neurotóxico para las etapas tempranas de vida de *Danio rerio*.
2. El valor de LC₅₀ en embriones (5,312 células*mL⁻¹) y larvas (15,000 células*mL⁻¹) muestran la sensibilidad estadio específica frente al lisado de la cepa CREAN Ks_02.
4. Esta investigación entrega evidencias del efecto nocivo de las microalgas asociadas a FANs en estadios tempranos de peces.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aballay-González, A., Panes-Fernández, J., Alves-de-Souza, C., Krock, B., Gallardo-Rodríguez, J. J., Espinoza-Rubilar, N., Fuentealba, J., & Astuya-Villalón, A. (2025). Deciphering the Neurotoxic Effects of *Karenia selliformis*. *Toxins*, *17*(2), 92. <https://doi.org/10.3390/toxins17020092>
- Alfaro-Ahumada, V., Jara-Toro, S., Alves-de-Souza, C., Rivera-Latorre, A., Mardones, J. I., Gallardo-Rodríguez, J. J., & Astuya-Villalón, A. (2024). Allelopathic Effect of a Chilean Strain of *Karenia selliformis* (Gymnodiniales, Dinoflagellata) on Phytoplankton Species. *Microorganisms*, *12*(9), 1834. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091834>
- Anderson, D. M. (2009). Approaches to monitoring, control, and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean & Coastal Management*.
- Anderson, D. M., Fensin, E., Gobler, C. J., Hoeglund, A. E., Hubbard, K. A., Kulis, D. M., et al. (2021). Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States: History, current status, and future trends. *Harmful Algae*, *102*.
- Arzul, G., Gentien, P., Bodennec, G., Toularastel, F., Youenou, A., Crassous, MP, (1995). Comparison of toxic effects in *Gymnodinium cf. nagasakiense* polyunsaturated fatty acids. págs. 395–400
- Assunção, J., Guedes, A. C., & Malcata, F. X. (2017). Biotechnological and pharmacological applications of biotoxins and other bioactive molecules from dinoflagellates. *Marine Drugs*.
- Carreto, J.I.; Montoya, N.G.; Carignan, M.O. (2008). Floraciones de algas tóxicas. In Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino; Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable: Buenos Aires, Argentina, 2008; pp. 1–11.
- Clément, A., Seguel M., Arzul G., Guzmán L., Alarcón C (2001). Widespread outbreak of a haemolytic, ichthyotoxic *Gymnodinium* sp. in Chile. In: Hallegraeff et al. (ed), *Harmful Algal Bloom*.
- Cornet, C., Calzolari, S., Miñana-Prieto, R., Dyballa, S., Van Doornmalen, E., Rutjes, H., Savy, T., D'Amico, D., & Terriente, J. (2017). ZeGlobalTox: An Innovative Approach to Address Organ Drug Toxicity Using Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4), 864. <https://doi.org/10.3390/ijms18040864>

- European Parliament, & Council of the European Union. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L 276, 33–79. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>
- Franco, B.C., Defeo, O., Piola, A.R. (2020). Climate change impacts on the atmospheric circulation, ocean, and fisheries in the southwest South Atlantic Ocean: a review. *Climatic Change* 162, 2359–2377. <https://doi.org/10.1007/s10584-020-02783-6>
- Gobler, Christopher J., et al. (2017). Ocean Warming Since 1982 Has Expanded the Niche of Toxic Algal Blooms in the North Atlantic and North Pacific Oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 19, mayo de 2017, pp. 4975-4980. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619575114>
- Guillou L., Nézan E., Cueff V., Erard-Le Denn E., Cambon-Bonavita M., Gentien P., Barbier G., (2002) Genetic Diversity and Molecular Detection of Three Toxic Dinoflagellate Genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French Coasts, *Protist*, Volume 153, Issue 3, <https://doi.org/10.1078/1434-4610-00100>.
- Haywood, A. J., Steidinger, K. A., & Truby, E. W. (2004). Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three new species of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand. *Phycologia*.
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., et al. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10, 70–86.
- Lamers, Packo P., Janssen, Marcel., De Vos, Ric C.H., Bino, Raoul J., Wijffels, René H. (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications doi: 10.1016/j.tibtech.2008.07.002
- Ling, C., & Trick, C. G. (2010). Expression and standardized measurement of hemolytic activity in *Heterosigma akashiwo*. *Harmful Algae*, 9(5), 522-529.
- Manohar Basnet, R., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., & Memo, M. (2019). Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*, 7(1), 23. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>
- Mardones, J. I., Norambuena, L., Paredes, J., Fuenzalida, G., Dorantes-Aranda, J. J., Lee (2020). Unraveling the *Karenia selliformis* complex with the description of a non-

gymnodimine producing Patagonian phylotype, *Harmful Algae*, Volume 98, <https://doi.org/10.1016/j.hal.2020.101892>.

Oliveira, A. A. S., Brigante, T. A. V., & Oliveira, D. P. (2021). Tail coiling assay in zebrafish (*Danio rerio*) embryos: Stage of development, promising positive control candidates, and selection of an appropriate organic solvent for screening of developmental neurotoxicity (DNT). *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Pepe-Vargas P., P. Yañez-Bailey, N. Zambrano, J. F. De la Paz, F. Cruzat-Cruzat, B.Krock & A. Llanos-Rivera, (2025). Immersion exposure to okadaic acid triggers neurotoxic and hepatotoxic responses in zebrafish larvae (*Danio rerio*), *Marine Environmental Research*, Volume 211, 107412, <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2025.107412>.

Puxan-Oliva, M. (2025). Narrar la marea roja o floraciones algales nocivas como cambio climático: usos de las temporalidades en Mugre rosa de Fernanda Trías y en informes científicos y de gobernanza. *Theory Now. Journal of Literature, Critique, and Thought*, 8(2), 162–185. <https://doi.org/10.30827/tn.v8i2.32041>

Qin-yuan, L., Chen, Z., Li, D., Li, A., Ji, Y., Li, H., & Yang, W. (2018). Toxicity and potential underlying mechanism of *Karenia selliformis* to the fish *Oryzias melastigma*. *Aquatic Toxicology*.

Saint-Amant L, Drapeau P. (1998) Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol.* Dec;37(4):622-32.

Selderslaghs, I. W., Hooyberghs, J., Blust, R., & Witters, H. E. (2013). Assessment of the developmental neurotoxicity of compounds by measuring locomotor activity in zebrafish embryos and larvae. *Neurotoxicology and Teratology*, 37, 44–56.

Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., & Braunbeck, T. (2012). Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments – A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.06.121>

Tester, Patricia A., R. Wayne Litaker, Elisa Berdalet. (2020). Climate Change and Harmful Benthic Microalgae. *Harmful Al-gae*, vol. 91, p. 101655. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101655>

- Vellojin, J. P., Mardones, J. I., Vargas, V., Leal, P. P., Corredor-Acosta, A., & Iriarte, J. I. (2023). Potential effects of climate change on the growth response of the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis* from Patagonian waters of Chile. *Harmful Algae*. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2022.102956>
- Von Hellfeld, R., Brotzmann, K., Baumann, L. (2020). Adverse effects in the fish embryo acute toxicity (FET) test: a catalogue of unspecific morphological changes versus more specific effects in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Environ Sci Eur* 32, 122.
- Wang, X., Feng, X., Zhuang, Y., Lu, J., Wang, Y., Gonçalves, R., Li, X., Lou, Y., Guan, W. (2019). Effects of ocean acidification and solar ultraviolet radiation on physiology and toxicity of dinoflagellate *Karenia mikimotoi*, *Harmful Algae*, Volume 81.
- Wen L., Wei W., Gu W, Huang P., Ren X., Zhang Z., Zhu Z., Lin S., Zhang B., (2008). Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish, *Developmental Biology*, Volume 314, Pages 84-92, <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.012>.